

Sommaire

SOMMAIRE	2
TABLE DES ABREVIATIONS	5
INTRODUCTION	10
1 L'HERPESVIRUS HUMAIN 8 (HHV-8)	11
1.1 DECOUVERTE ET HISTORIQUE DU VIRUS HHV-8	11
1.2 STRUCTURE ET GENOME DU VIRUS	12
1.3 CYCLE VIRAL DU VIRUS HHV-8 : PHASE DE LATENCE ET PHASE LYTIQUE.....	14
1.3.1 Phase de latence	14
1.3.2 Phase lytique	15
1.4 ENTREE DU VIRUS, REPLICATION ET PRODUCTION DE PARTICULES INFECTIEUSES.....	17
1.5 CELLULES HOTES ET TROPISME CELLULAIRE	19
1.6 MODELES D'ETUDE IN VITRO.....	20
1.7 MODELES ANIMAUX	22
2 EPIDEMIOLOGIE ET PATHOLOGIES ASSOCIEES AU VIRUS HHV-8	24
2.1 DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE ET MODES DE TRANSMISSION DU VIRUS HHV-8	24
2.2 LES PRINCIPALES PATHOLOGIES ASSOCIEES AU VIRUS HHV-8	26
2.2.1 La maladie de Kaposi (KS)	26
2.2.2 Le lymphome primitif des séreuses (PEL).....	29
2.2.3 La maladie de Castleman multicentrique associée au virus HHV-8.....	31
2.2.4 KSHV inflammatory cytokine syndrome (KICS).....	33
2.3 FACTEURS DE RISQUES ASSOCIES A L'INFECTION PAR LE VIRUS HHV-8	34
2.3.1 Altération du système immunitaire et VIH	34
2.3.2 Risques de transmission du virus HHV-8	34
3 MECANISMES IMPLIQUES DANS LA PATHOGENESE INDUITE PAR LE VIRUS HHV-8	37
3.1 LE CARACTERE ONCOGENIQUE DU VIRUS HHV-8.....	37

3.2	LES MECANISMES DE L'ONCOGENESE VIRALE.....	39
3.2.1	Les protéines de latence	39
3.2.2	Les protéines lytiques.....	44
3.2.3	Interaction entre expression génique virale latente et lytique	48
4	DIAGNOSTIC ET STRATEGIES THERAPEUTIQUES DES CANCERS ASSOCIES A L'HHV-8.....	50
4.1	MALADIE DE KAPOSI.....	50
4.1.1	Diagnostic.....	50
4.1.2	Stratégies thérapeutiques.....	50
4.2	MALADIE DE CASTLEMAN MULTICENTRIQUE ASSOCIEE A L'HHV-8.....	55
4.2.1	Diagnostic.....	55
4.2.2	Stratégies thérapeutiques.....	55
4.3	LYMPHOME PRIMITIF DES SEREUSES	56
4.3.1	Diagnostic.....	56
4.3.2	Stratégies thérapeutiques.....	56
5	L'INDUCTION DE LA MORT CELLULAIRE PAR APOPTOSE : UNE STRATEGIE ANTI-TUMORALE.....	58
5.1	LE VIRUS HHV-8 ET L'APOPTOSE.....	58
5.1.1	Apoptose et cancer	58
5.1.2	Le virus HHV-8 et l'inhibition de l'apoptose	61
5.2	LE VIRUS HHV-8 ET LES DERIVES OXYGENES (ROS)	64
5.2.1	ROS et cancer.....	64
5.2.2	ROS et antioxydants : stratégies thérapeutiques anti-tumorales	65
5.2.3	HHV-8, ROS et stress oxydatif	68
	OBJECTIFS DE LA THESE	70
	RÉSULTATS	73
	ARTICLE.....	74
	CONCLUSION, DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	125
	TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	138
	ANNEXES.....	140

BIBLIOGRAPHIE	158
REMERCIEMENTS.....	172
RESUME.....	174
ABSTRACT	174



Table des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AKT : Activating protein kinase B

ARN : Acide ribonucléique

ASK1 : Apoptosis signal-regulating kinase

ATF6 : Activating Transcription Factor 6

BEC : Blood endothelial cells

cART: Combination antiretroviral therapy

Caspase : Cysteine-aspartic protease

Cdk6 : Cellular cyclin dependant kinase 6

Chemsex : Chemical sex, sexe sous produits chimiques

CHOP : C/EBP homologous protein ou GADD153, growth arrest and DNA-damage-inducible 153

DC-SIGN : Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin

EBV : Virus d'Epstein-Barr

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

ERK : Extracellular-signal-regulated kinase

Fas/CD95 : Fas cell surface death receptor

FDA : Food and Drug Administration

GSH : Glutathion réduit

GSK-3 β : Glycogen synthase kinase 3 β

H₂O₂ : Hydrogène peroxydé

HAART : Traitements antirétroviraux hautement actifs

HCMV : Cytomégalovirus humain

HHV-8 : Herpèsvirus humain 8

HHV-8-MCD : Maladie de Castleman associée au virus HHV-8

HIF : Hypoxia-inducible factor

HPCs : Cellules souches hématopoïétiques

HPV : Human papilloma virus

HSH : Hommes ayant des relations sexuelles avec les hommes

HSV : Herpèsvirus simplex

HVS : Herpèsvirus saimiri ou virus du singe

IAPs : Inhibitor of apoptosis proteins

IFNs I : Interférons de type I

IFN- α : Interféron- α

IFN- γ : Interféron- γ

IKK γ : Inhibitor of κ B kinase- γ

IL-6 : Interleukine-6 (cellulaire)

IMiDs : Médicaments immunomodulateurs

IRE1 α : Inositol-Requiring Enzyme 1 α

IRFs : Interferon regulatory factors

IRIS : Immune reconstitution inflammatory syndrome

I κ B- α : Inhibitor of κ B- α

JAK : Janus kinase

JNK : c-Jun N-terminal kinase ou stress-activated protein kinase

KICS : KSHV inflammatory cytokine syndrome

KS : Kaposi's sarcoma ou maladie de Kaposi

KSHV : Kaposi sarcoma-associated herpesvirus

LANA : Latency-associated nuclear antigen

LEC : Lymphatic endothelial cells

LUR : Long unique region

MAF : musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homologue

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MCD : Maladie de Castleman multicentrique

MEK : MAPK/ERK kinase

mi-ARNs : micro-ARNs

MSCs : Cellules souches mésenchymateuses

mTOR : Mechanistic target of rapamycin

NAC : *N*-acétylcystéine

NF- κ B : Nuclear factor - κ B

NOD : Non obese diabetic

O₂⁻ : Radicaux superoxydes

OH• : Radicaux hydroxylés

ORF : Open reading frame ou cadre de lecture ouvert

ori-P : Origin of plasmid replication

OSGIN1 : Oxidative stress-induced growth inhibitor 1

p53 : Tumor protein 53

PD1 : Programmed cell death protein 1

PDGF : Platelet-derived growth factor

PDL1 : Programmed cell death 1 ligand 1

PEL : Primary effusion lymphoma ou lymphome primitif des séreuses

PERK : PKR-like endoplasmic reticulum kinase

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PKC : Protein kinase C

PROX1 : Prospero homeobox protein 1

Rb : Protéine du rétinoblastome

ROS : Reactive oxygen species ou dérivés réactifs de l'oxygène

RTA : Replication and transcription activator, molécule transactivatrice de la phase lytique

SASP : Sulfasalazine

SCID : Severe Combined ImmunoDeficiency

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise

siRNA : Small interfering RNA

SODs : Superoxide dismutases

STAT : Signal transducer and activator of transcription proteins

Tat : Trans-Activator of Transcription

TGF- β : Transforming growth factor - β

Thérapie ABV : doxorubicine, bléomycine, vincristine

Thérapie CHOP : Cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine et prednisolone

Thérapie EPOCH : Cyclophosphamide, doxorubicine, étoposide, vincristine et prednisone

TNFR : Tumor necrosis factor receptor

TPA : 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate

TPM1 : Tropomyosin 1

TRAF2 : TNF-receptor-associated factor 2

TRAIL : TNF-related apoptosis inducing ligand

TWEAKR : TNF-like weak inducer of apoptosis receptor

v-CCLs : Viral CC-chemokine ligands

v-Cycline : Cycline virale

VEGF : Vascular endothelial growth factor

v-FLIP : Viral Fas-associated with death domain (FADD)-like interleukin-1 β -converting enzyme (FLICE)/caspase 8-inhibitory protein

v-GPCR : Viral G protein-coupled receptor

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

v-IL-6 : Interleukine-6 virale

v-IRFs : Viral interferon regulatory factors

VZV : Virus varicelle-zona

xCT : Cystine-glutamate transporter

Introduction

1 L'Herpèsvirus Humain 8 (HHV-8)

1.1 Découverte et historique du virus HHV-8

La maladie de Kaposi (KS) fut d'abord décrite en 1872 par le médecin Hongrois Moritz Kaposi, comme un néoplasme atypique de la peau (*Idiopathic multiple pigmented sarcoma*) chez des hommes âgés d'origine méditerranéenne. Dans les années 50, bien que moins de 500 cas n'aient été répertoriés en Europe et en Amérique, le KS représentait déjà 9% de tous les cancers existant en Afrique Equatoriale. L'incidence de cette pathologie augmenta de façon drastique dans les années 80 avec l'arrivée du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) dans des populations de jeunes hommes ayant des relations sexuelles avec des hommes (HSH) de New-York et de Los Angeles, devenant alors l'un des principaux indicateurs de la pandémie dévastatrice du VIH. L'origine de ce cancer qui s'étendait majoritairement au sein de ces populations HSH demeurait inconnue. C'est sur la base de rapports cliniques et épidémiologiques que l'implication d'un nouvel agent infectieux, sexuellement transmissible et indépendant du VIH, fut suggérée. C'est finalement en 1994 qu'une équipe de scientifiques de l'Université de Columbia à New-York pu identifier dans des biopsies de lésions de KS de patients atteints du VIH, des fragments d'ADN d'un nouvel herpèsvirus humain, le *Kaposi sarcoma-associated herpesvirus* (KSHV) ou *human herpesvirus 8* (HHV-8) (1-4).

Depuis la découverte de son implication dans la pathogénèse de la maladie de Kaposi, le virus HHV-8 a été associé à diverses pathologies lymphoprolifératives à cellules B. Le lymphome primitif des séreuses (PEL) et la maladie de Castleman multicentrique (MCD) en sont les principales entités cliniques, mais on le retrouve également impliqué dans des lymphomes à larges cellules B, des syndromes lymphoprolifératifs germinotropes et autres troubles lymphoïdes prolifératifs (5,6). Il a été associé plus récemment à un syndrome très inflammatoire appelé KICS (*KSHV inflammatory cytokine syndrome*) (7).

De nombreuses investigations réalisées ultérieurement ont permis de mettre en évidence les propriétés oncogéniques du virus, le plaçant ainsi comme un agent infectieux cancérigène de classe I par le Centre international de recherche sur le Cancer (1).

1.2 Structure et génome du virus

Le virus HHV-8 est le 8^{ème} membre de la famille des *Herpesviridae* et appartient à la sous-famille des γ -herpesvirus, au sein duquel son principal homologue humain est l'EBV (Epstein Barr virus) (8).

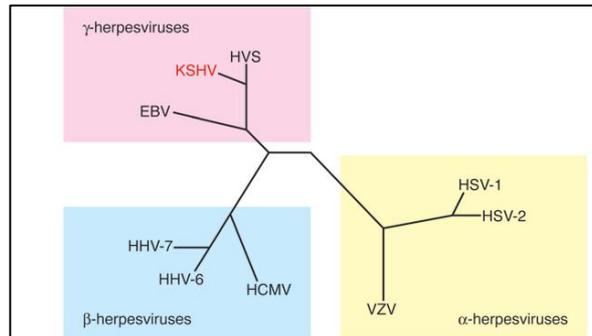


Figure 1. Arbre phylogénétique des principaux herpes virus. EBV, Virus d'Epstein-Barr ; HSV, herpesvirus simplex ; VZV, virus varicelle-zona; HCMV, cytomégalovirus humain; HHV, herpesvirus humain; HVS, herpesvirus saimiri (un virus du singe) (9).

Tout comme les autres membres de la famille des herpesvirus, le virus HHV-8 est formé d'un long ADN bicaténaire, entouré d'une capsid icosaédrique et d'une enveloppe dérivant des membranes nucléaires et intracytoplasmiques. L'ensemble constitue la particule virale ou virion.

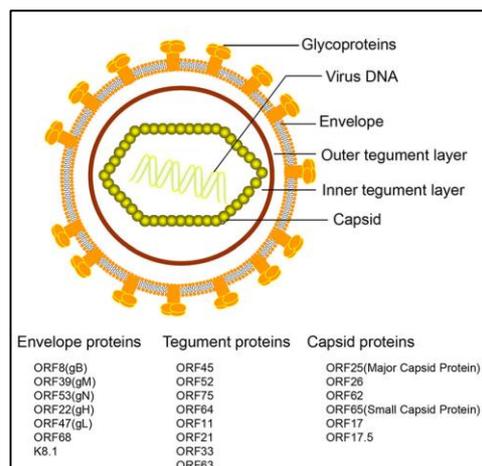


Figure 2. Représentation schématique de la structure virale de l'HHV-8. Les virions de l'HHV-8 sont formés d'une nucléocapside icosaédrique entourée d'une enveloppe constituée d'une bi-couche lipidique. Entre la capsid et l'enveloppe se trouve une couche morphologiquement amorphe appelé le tégment. Les protéines virales retrouvées dans la capsid, le tégment et l'enveloppe sont listées en dessous (11).

Son ADN double-brin, d'une taille d'environ 165-175 kpb, se présente dans la cellule soit sous forme épisomale (en phase de latence) soit sous forme linéaire (en phase lytique). L'organisation génomique du virus HHV-8 est similaire à celle de l'EBV, avec une région appelée *long unique region* (LUR) d'environ 140 kpb qui contient 90 gènes/ORFs (*Open reading frame*) codant pour les différentes protéines du virus, ainsi que 25 mi-ARNs (micro-ARNs). S'il partage une grande partie de ses gènes (66 ORFs) avec les autres herpesvirus, le virus HHV-8 possède 15 gènes qui lui sont propres (désignés avec le préfixe « K » : ORF K1 à K15), lesquels jouent de multiples fonctions dans l'infection virale. De plus, parmi les 90 ORFs du virus HHV-8, certaines (au moins 14) codent pour des gènes homologues de gènes cellulaires (incluant v-IL-6, v-BCL-2, v-FLIP, v-Cycline), qui interviennent dans divers processus oncogéniques de l'HHV-8, tels que la régulation du cycle cellulaire, l'inhibition de l'apoptose ou encore la prolifération cellulaire (2,3,6,9).

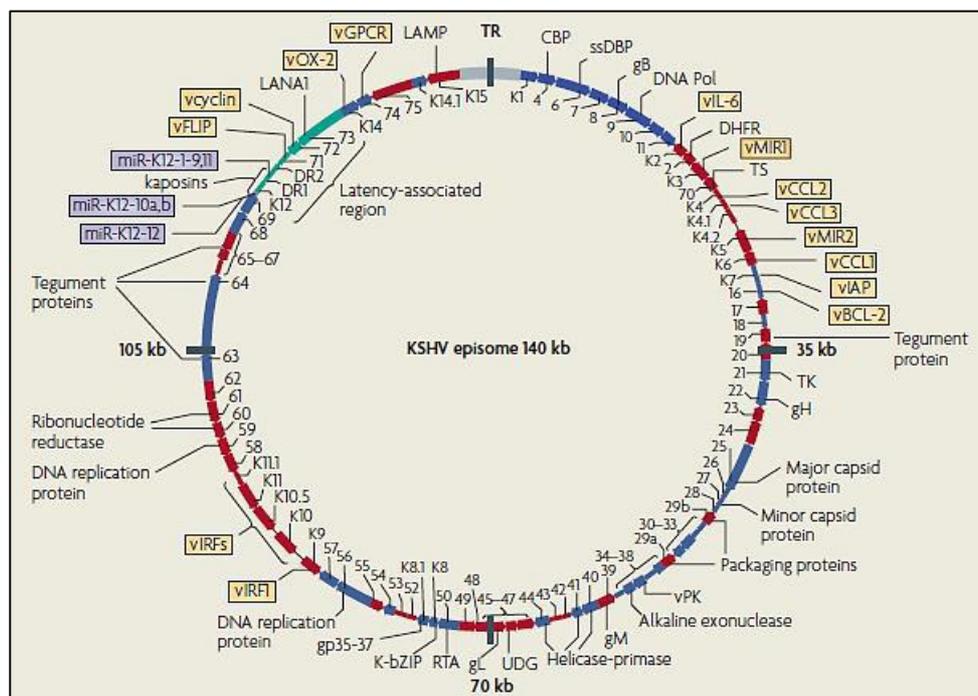


Figure 3. Carte du génome de l'HHV-8. Le virus HHV-8 code pour près de 90 *open reading frames* (ORFs) et 25 micro-ARNs (en violet). Une caractéristique majeure de l'HHV-8 est le nombre (au moins 14) d'ORFs codant pour des gènes homologues aux gènes cellulaires. Les ORFs identifiés et leurs protéines associées sont indiqués sur la figure. Durant la latence, le virus n'exprime qu'un nombre limité de transcrits latents (indiqués en vert). Les gènes homologues aux gènes cellulaires sont indiqués en jaune. La direction de transcription est indiquée par les flèches (3).

1.3 Cycle viral du virus HHV-8 : phase de latence et phase lytique

Comme la plupart des autres membres de la famille des herpèsvirus, le virus HHV-8 présente deux modes d'infections distinctes qui se différencient par des profils d'expression génique complexes mais caractéristiques : une infection latente qui représente son mode d'infection par défaut, et des épisodes de réactivations lytiques conduisant à la production de particules infectieuses et à la mort de la cellule hôte. Dans la grande majorité des cellules tumorales du KS, PEL ou MCD, le virus HHV-8 est retrouvé dans un état de latence persistant qui lui permet d'avoir une durée de vie chez l'hôte très importante et indique le rôle essentiel des protéines virales de latence dans le développement de ces tumeurs. Cependant, une petite proportion des cellules hôtes infectées subit des réactivations virales lytiques spontanées (< 3% chez les cellules KS, <1% chez le PEL, 10-15% chez la MCD), résultant en l'expression des protéines virales lytiques et à la production de virions. Bien que plus rarement exprimées, ces protéines virales lytiques contribuent également, au travers de mécanismes très différents de ceux empruntés par les protéines de latence, à la pathogénèse des cancers associés à l'HHV-8 (2,3,8,10). Le rôle de ces protéines virales et les mécanismes sous-jacents à la pathogénèse des cancers associés à l'HHV-8 seront détaillés dans la partie « Mécanismes impliqués dans la pathogénèse induite par le virus HHV-8 ».

1.3.1 Phase de latence

En état de latence, l'épisome viral se présente sous la forme d'un minichromosome circulaire (épisome) non-intégré dans le noyau et attaché aux chromosomes de la cellule hôte, qui se réplique lors de chaque division cellulaire pour être distribué dans chacune des cellules filles. Il s'agit d'une répllication non productive n'aboutissant ni à la production de virions infectieux ni à la lyse de la cellule hôte (2).

Durant cette phase, seuls quelques gènes sont exprimés, incluant les gènes de latence LANA (*Latency-associated nuclear antigen*), v-Cycline et v-FLIP (*Viral Fas-associated with death domain (FADD)-like interleukin-1 β -converting enzyme (FLICE)/caspase 8-inhibitory protein*), suffisants pour ce mode de répllication. Ce nombre restreint de protéines virales latentes lui permet d'échapper au système immunitaire, tout en assurant le maintien du génome dans les cellules en division, aboutissant à une infection latente persistante. Un autre mécanisme mis en place par le virus pour maintenir la latence est la suppression ou l'atténuation de

l'expression des gènes viraux lytiques (11). C'est le cas tout particulièrement du gène lytique RTA (*Replication and transcription activator*, molécule transactivatrice de la phase lytique), dont l'expression est inhibée par le gène LANA en se fixant sur son promoteur. Ces protéines de latence vont également pouvoir moduler divers processus oncogéniques, comme la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire, permettant la transformation et l'immortalisation de la cellule, et ainsi induire les diverses caractéristiques phénotypiques tumorales que l'on observe dans les cancers associés au virus HHV-8 (10,12–15).

1.3.2 Phase lytique

La latence du virus est son état par défaut. Les stimuli physiologiques permettant une réactivation lytique ne sont pas bien définis. Pour autant, il est certain que le virus HHV-8 subit de façon sporadique des réactivations lytiques spontanées tout au long de sa durée de vie chez l'hôte. Divers stimuli environnementaux ou physiologiques pouvant réactiver son génome au repos ont été observés, incluant le déséquilibre de la production de cytokines inflammatoires, l'immunosuppression, l'hypoxie, le stress oxydatif, des co-infections virales, ou certains traitements tels que l'IL-6, l'IFN- γ (Interféron- γ), le n-butyrate ou le TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) (2).

L'épisome viral relâche alors sa structure compacte, permettant l'expression séquentielle de tous ses gènes viraux et son entrée en réplication lytique, conduisant à la production de particules virales capables d'infecter les cellules avoisinantes (10). Ces états de réactivation virale lytique sont intermittents et généralement asymptomatiques (9). Cependant, dans la MCD, où le pourcentage de réactivations virales lytiques est bien plus important, il est certain que ces réactivations jouent un rôle important dans la croissance tumorale, étant donné la forte corrélation entre la charge virale et l'évolution ou la sévérité de la maladie (2).

Dans le processus lytique, les gènes s'expriment en cascade : les gènes lytiques « très précoces » exprimés immédiatement après une primo-infection ou lors d'une réactivation virale spontanée, codent pour des protéines de régulation et sont essentiels à l'initiation de la transcription virale. Le RTA tout particulièrement, principal gène lytique « très précoce », est suffisant et essentiel pour permettre la transition entre phase de latence et réactivation virale lytique. Réprimé par la protéine virale de latence LANA durant la latence, ce blocage est levé durant la réactivation virale, lui permettant de réguler et d'activer de nombreux gènes viraux

lytiques qui permettent la mise en place de l'ensemble du programme lytique. Les gènes « précoces » comprennent notamment K-bZIP, vIRF-1, vIL-6, les vCCLs et vGPCR. Et enfin, les gènes « tardifs » qui codent pour des protéines de l'enveloppe et de la capside (2,10). Plusieurs de ces protéines virales lytiques, certes exprimées par une petite proportion de cellules tumorales, induisent la production de cytokines et de facteurs de croissance sécrétés qui vont agir sur les cellules avoisinantes, contribuant ainsi à l'environnement angiogénique et inflammatoire des cancers associés à l'HHV-8 (3,16).

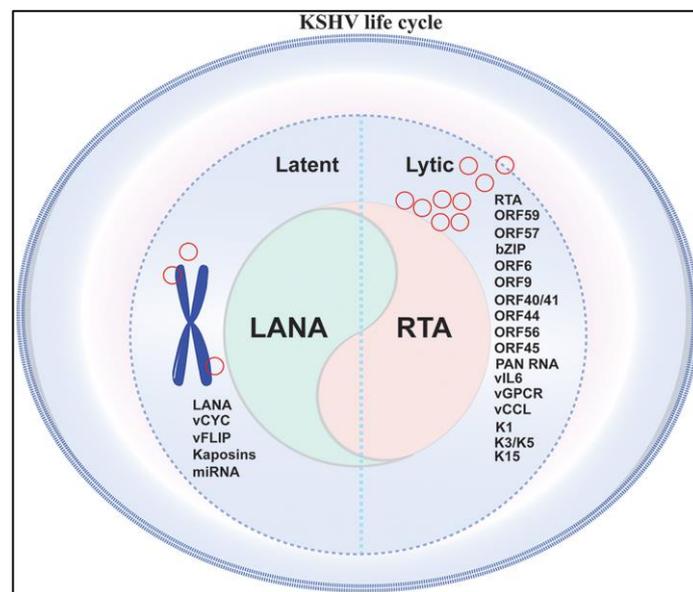


Figure 4. Représentation schématique du cycle de vie de l'HHV-8 chez une cellule infectée. Le cycle de vie du virus HHV-8 comprend deux phases d'infection, une courte phase lytique et une phase latente prédominante. Le maintien d'un équilibre entre ces deux phases permet la persistance de l'infection chez l'hôte, et les protéines virales exprimées à partir de ces deux profils d'expressions géniques contribuent à la pathogénèse des cancers associés à l'HHV-8 (10).

1.4 Entrée du virus, réplication et production de particules infectieuses

L'entrée du virus dans la cellule cible se fait en plusieurs étapes. La première étape consiste en l'attachement du virus à la cellule hôte grâce aux interactions entre les glycoprotéines de l'enveloppe virale et des récepteurs de la surface cellulaire, tels que l'héparan sulfate, l' $\alpha3\beta1$ intégrin, xCT (*cystine-glutamate transporter*) ou DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*). Lors de la deuxième étape, le virus entre directement dans la cellule par fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire ou par endocytose. Le virus est alors transporté dans le cytoplasme, puis décapsidé afin de libérer son génome viral dans le noyau (17). Dès son entrée dans le noyau, l'ADN linéaire viral se circularise pour être maintenu sous une forme épisomale, attaché aux chromosomes cellulaires *via* sa protéine de latence LANA (qui permet l'établissement de la latence), ce qui permet au génome viral d'être répliqué avec le génome de la cellule hôte lors des divisions cellulaires et ainsi d'être distribué aux cellules filles (10-150 copies du génome par cellule infectée) (16). Parallèlement à cela, le virus HHV-8 active la reprogrammation de la transcription de certains gènes de la cellule hôte, impliqués dans la régulation de mécanismes tels que l'apoptose, le cycle cellulaire, les réponses inflammatoires et l'angiogenèse (17). A ce stade, l'infection est latente, sans production de particules virales infectieuses (11).

En cas de réactivation virale, le génome viral se linéarise et enclenche l'expression séquentielle de l'ensemble de ses gènes ainsi que la réplication de son ADN viral. La réplication de l'ADN viral se fait à partir de multiples origines de réplication (*ori-P*) grâce à l'intervention de la machinerie de réplication cellulaire ainsi que des enzymes virales nouvellement synthétisées (ADN polymérase virale). Les brins d'ADN viral individualisés seront ensuite assemblés et encapsidés au sein du noyau. Les particules virales infectieuses (matures) migrent alors du noyau vers la surface de la cellule, où elles obtiennent leur enveloppe par bourgeonnement à la membrane de la cellule hôte. Vient ensuite la libération des virions entraînant la lyse de la cellule hôte (11,16).

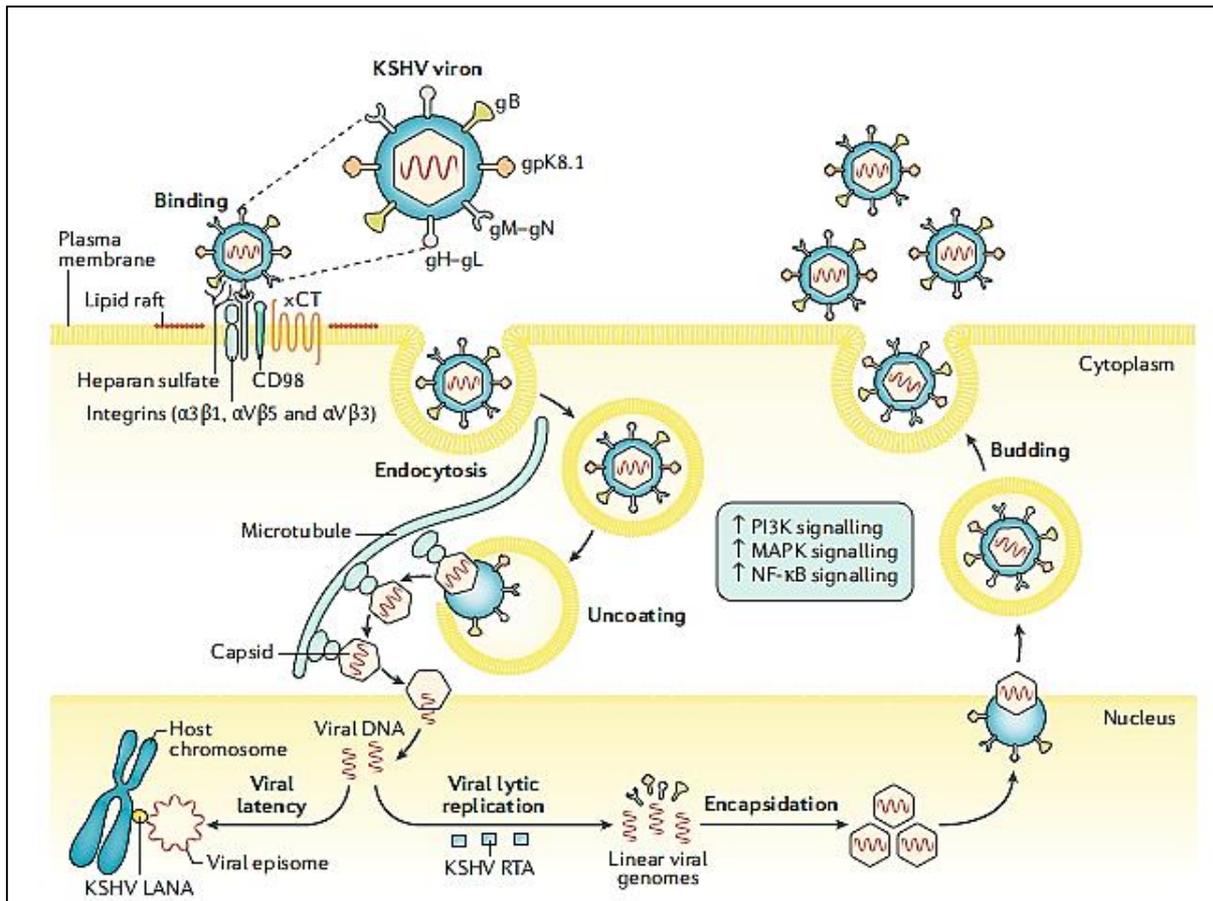


Figure 5. Cycle viral de l'HHV-8. Le virus HHV-8 se fixe aux récepteurs présents à la surface de la cellule (tels que l'héparan sulfate, les intégrines, l'*xCT* (*cystine-glutamate transporter*), et le CD98) *via* les glycoprotéines (telles que gpK8.1, gB, gM-gN et gH-gL) présentes sur son enveloppe. Cette fixation résulte, dans la plupart des cas, à l'endocytose du virion dans la cellule. Le virion se libère de son enveloppe dans le cytoplasme et la capside contenant le génome viral se dirige dans le noyau. Dans le noyau, le génome viral peut demeurer latent sous la forme d'un épisode circulaire attaché aux chromosomes de l'hôte *via* sa protéine virale de latence LANA, ou il peut entrer en phase lytique, se répliquer et produire de nouveaux virions enveloppés qui seront libérés de la cellule par bourgeonnement (16).

1.5 Cellules hôtes et tropisme cellulaire

Tout comme l'EBV, le virus HHV-8 présente un tropisme spécifique pour les lymphocytes B et les cellules de type endothélial (13).

Dans le KS, le virus HHV-8 a pu être mis en évidence dans différents types cellulaires, majoritairement dans les *spindle cells* ou cellules fusiformes, cellules caractéristiques des lésions de kaposi et moteur de la pathogénèse du KS. Ces cellules fusiformes dérivent vraisemblablement de la lignée des cellules endothéliales (12). En revanche, la nature lymphatique ou vasculaire de ces *spindle cells* est encore à ce jour sujet à débat. En effet, ces cellules expriment des marqueurs à la fois de cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques (VEGF, CXCR4, CD34, CD31, podoplanin, etc.) et possèdent des caractéristiques phénotypiques à la fois d'endothéliums lymphatique et vasculaire, mais leur profil d'expression génique ne représente fidèlement aucune de ces deux lignées endothéliales (1,3,12). Diverses études *in vitro* ont observé un phénomène de reprogrammation transcriptionnelle et de dédifférenciation de cellules endothéliales vasculaires infectées en cellules lymphatiques (1,9,12). Ces données semblent donc orienter vers l'hypothèse d'une nature endothéliale lymphatique des *spindle cells* (7). Certaines études ont également observé la présence du génome du virus chez les monocytes infiltrant les lésions de kaposi, ou chez les lymphocytes B des amygdales et du sang périphérique des patients KS. Il a aussi été rapporté que les cellules souches mésenchymateuses (MSCs) ainsi que les cellules souches hématopoïétiques (HPCs) pouvaient être des réservoirs pour le virus HHV-8 (2,9,18,19).

Chez le PEL et la MCD, on retrouve principalement le virus HHV-8 dans des cellules appartenant à la lignée des lymphocytes B (à un stade de différenciation tardif). Chez la MCD, il peut également être détecté dans des cellules endothéliales des ganglions lymphatiques, mais aussi dans des cellules mononucléaires du sang périphérique (8,20,21).

1.6 Modèles d'étude *in vitro*

L'existence d'un tropisme relativement restreint du virus HHV-8 *in vivo* contraste avec son comportement *in vitro*, où il a la capacité d'infecter un large panel de cellules humaines, incluant des cellules endothéliales, épithéliales, kératinocytes, fibroblastes et monocytes (22).

Bien que le virus HHV-8 code pour de multiples gènes oncogéniques, certains mécanismes impliqués dans l'oncogenèse du virus demeurent encore à ce jour non élucidés, ceci en partie de par la difficulté à mettre au point des modèles *in vitro* adaptés, permettant d'étudier la transformation tumorale de cellules primaires (23). De nombreux modèles d'infection virale de cellules endothéliales primaires (lymphatiques ou vasculaires) par le virus HHV-8 ont été décrits. Ces modèles cellulaires présentaient en effet des modifications cellulaires morphologiques et transcriptionnelles caractéristiques de ce qui peut être observé chez le KS, comme l'acquisition du phénotype de *spindle cells*, le prolongement de la durée de vie, l'établissement d'un état de latence caractérisée par l'expression du gène de latence LANA, ou dans de très rares cas, la présence de réactivations virales lytiques (variant entre 1-10% selon les modèles).

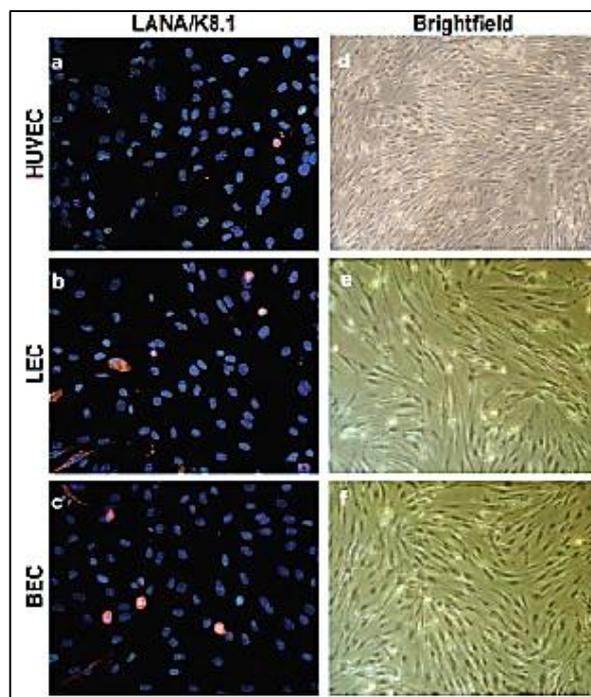


Figure 6. L'infection de cellules endothéliales par le virus HHV-8 entraîne la formation de *spindle cells*. Les cellules primaires HUVEC (*Human umbilical vein endothelial cells*), LEC (*Lymphatic endothelial cells*) et BEC (*Blood endothelial cells*) sont représentées ici. (a-f) les cellules endothéliales ont été incubées avec une solution virale d'HHV-8 pendant 2h avant d'être rincée et remplacée par du milieu neuf. (a- c) LANA marqué en vert, K8.1 en rouge et DAPI en bleu. Les images ont été prises 3 jours post-infection (52).

En revanche, ces modèles ne parviennent pas à reproduire fidèlement les caractéristiques oncogéniques clés que l'on retrouve chez les cellules des lésions de kaposi, comme une prolifération indépendante ou une persistance de l'infection sur la durée s'expliquant par la perte de l'épisome viral (3,18,24–26). De la même façon, les *spindle cells* provenant de lésions de kaposi remises en culture, perdent leur épisome viral après seulement quelques passages (18). Le fait de ne pas retrouver les caractéristiques oncogéniques de ce virus *in vitro* peut s'expliquer par l'existence *in vivo* d'autres mécanismes «transformants», tels qu'un microenvironnement inflammatoire ou un programme d'expression génique du virus bien spécifique et qui seraient essentiels à l'oncogénicité du virus *in vivo*, mais qui ne seraient pas reproduits dans ces systèmes de cultures cellulaires *in vitro* (8).

Il existe des lignées cellulaires chroniquement infectées par le virus HHV-8 établies à partir de cellules tumorales provenant de PEL. Il s'agit notamment des lignées BCP-1, BC-3 et BCBL-1. Ces cellules sont largement utilisées pour des tests de sérologie en diagnostic, mais également pour la caractérisation moléculaire du virus et l'évaluation de molécules thérapeutiques (26). Dans ces cellules cultivées *in vitro*, le virus HHV-8 se trouve majoritairement à l'état de latence, tout comme chez l'Homme. Néanmoins, il peut facilement être réactivé par un traitement au sodium butyrate ou au TPA, permettant ainsi la production de particules virales infectieuses qui peuvent être utilisées pour infecter d'autres types cellulaires (8). Il est important de préciser que le profil d'expression des transcrits viraux latents et les mécanismes oncogéniques mis en œuvre par le virus HHV-8 pour établir et maintenir la latence, sont très similaires entre différents types cellulaires, que ce soit chez les cellules primaires endothéliales néo-infectées, chez les cellules KS ou chez les lignées lymphoïdes PEL (18,27,28). Ces résultats soutiennent le fait que les lignées PEL représentent des modèles pertinents dans un contexte de recherche thérapeutique destinée à cibler l'infection latente du virus pour le traitement des diverses pathologies tumorales associées au virus HHV-8 (3).

1.7 Modèles animaux

Depuis la découverte du virus, plusieurs modèles animaux (principalement de souris et de rats) ont été développés afin d'étudier les mécanismes de tumorigenèse associés au virus HHV-8 et d'évaluer l'effet anti-tumoral de nouvelles molécules thérapeutiques. Par exemple, des modèles de souris transgéniques, exprimant une ou plusieurs protéines oncogéniques du virus HHV-8 (tels que LANA, v-FLIP ou v-Cycline), ont participé à la compréhension du rôle fonctionnel de chacune de ces protéines dans le développement tumoral. En revanche, il n'est pas encore possible de faire exprimer chez ces souris transgéniques l'ensemble des acteurs participant à la tumorigenèse du virus (15).

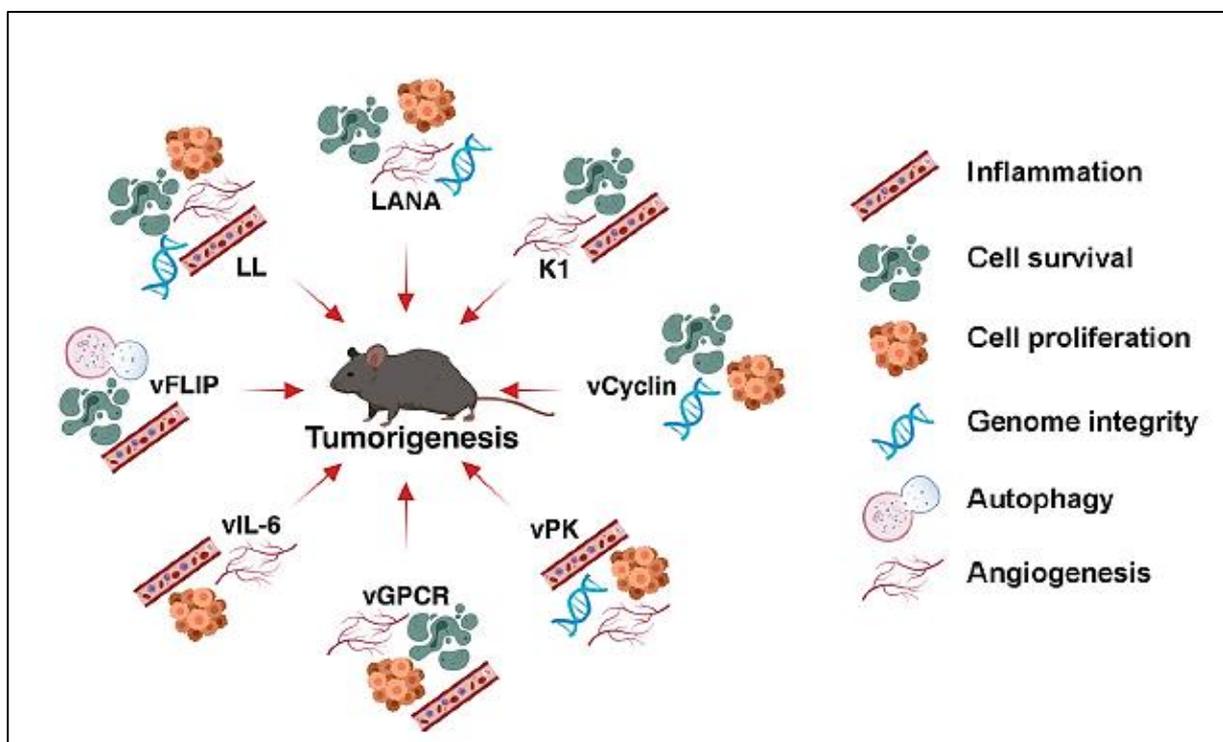


Figure 7. Oncoprotéines virales et leur implication dans la pathogénèse associée au virus HHV-8 chez des souris transgéniques (15).

Il n'existe pas à ce jour de véritable modèle *in vivo* de la maladie de Kaposi. L'équipe de Jones et al. a pu tout de même observer que l'infection par le virus HHV-8 de cellules souches mésenchymateuses métanéphriques embryonnaires de rat pouvait induire chez des souris *nude* un développement tumoral présentant des caractéristiques d'angiogenèse et d'inflammation similaires à celles observées dans le KS chez l'Homme (11,23).

Actuellement, les modèles les plus couramment utilisés pour caractériser l'efficacité anti-tumorale de nouvelles molécules sont les modèles de PEL chez des souris NOD/SCID ayant reçu une xéno greffe de lignées cellulaires PEL. Ces modèles présentent l'avantage de reproduire des caractéristiques pathologiques très similaires à celles observées chez l'Homme, incluant la formation d'ascite tumorale, la présence des gènes viraux de latence chez toutes les cellules tumorales ainsi que de cytokines inflammatoires (29,30). Cependant, il faut prendre en compte, lors de leur utilisation, que ces modèles ne reproduisent pas à l'identique le processus tumoral tel qu'observé chez l'Homme. Ceci est notamment liée au fait que le virus HHV-8 est un pathogène strictement humain. Ainsi, certains facteurs, tels que les facteurs de croissance ou le microenvironnement tumoral, pourraient contribuer différemment au développement tumoral chez la souris et chez l'Homme (15,29).

2 Epidémiologie et pathologies associées au virus HHV-8

2.1 Distribution géographique et modes de transmission du virus HHV-8

Comparé à d'autres herpèsvirus, tels que l'EBV, qui infectent un grand nombre d'individus sains dans la plupart des régions du monde, la séroprévalence du virus HHV-8 est géographiquement assez restreinte et varie selon la région du monde étudiée. En effet, l'HHV-8 est plutôt endémique en Afrique sub-saharienne (taux de séroprévalence de plus de 40%), et relativement fréquent dans les régions méditerranéennes et dans certains pays d'Amérique du Sud (10-30%). Il reste par contre peu fréquent en Europe du nord, Asie et Etats-Unis (moins de 10%), excepté chez la population HSH où le taux d'infection est de 20-30% chez les personnes VIH-négatif mais peut atteindre jusqu'à 60% chez les VIH-positif dans certains pays occidentaux et au Japon (4,6,7,16) (*voir Figure 8*).

Le virus HHV-8 présente 7 sous-types majeurs (A, B, C, D, E, F et Z), dont la répartition diffère selon les régions du monde : En Afrique (sous-types B et A5), dans les régions méditerranéennes (sous-type C), en Europe du Nord, Amérique du Nord et du Sud (sous-type A) et en Extrême-Orient (sous-type D) (3,31). Le sous-type E a été décrit chez des Amérindiens du Brésil (32,33), le sous-type F chez quelques individus en Ouganda et plus récemment dans une population d'HSH résidant en France (34,35) et enfin le sous-type Z dans une petite cohorte d'enfants au Zambie (36).

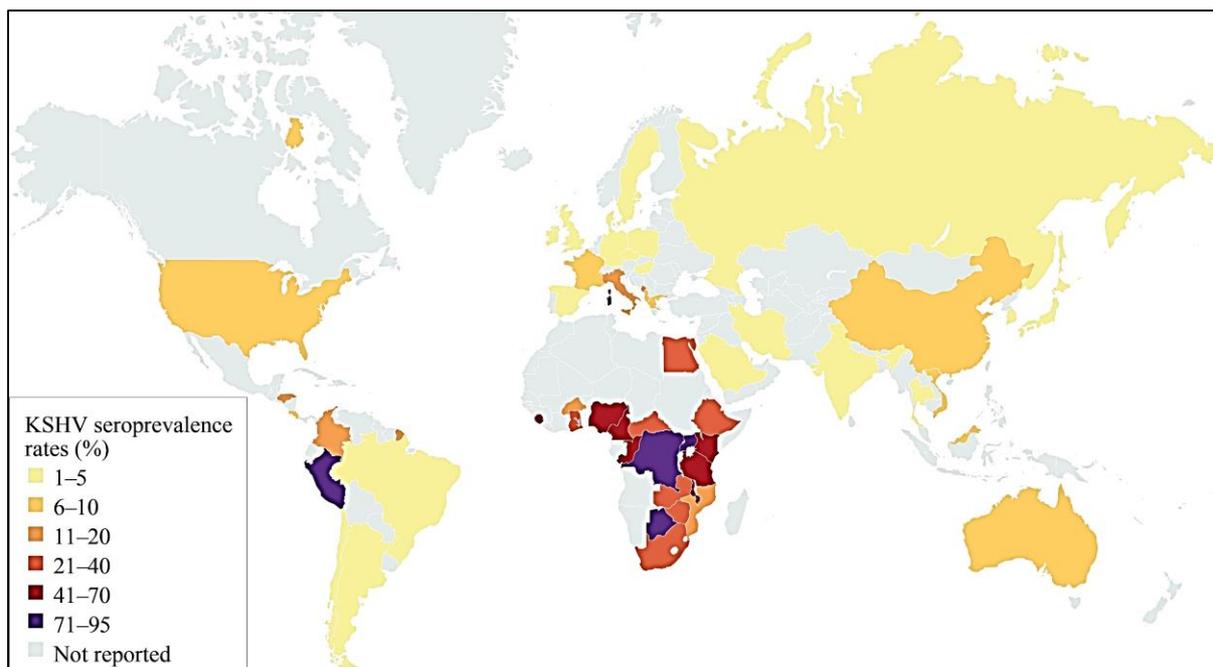


Figure 8. Taux de séroprévalence du virus HHV-8. La séroprévalence des infections par le virus HHV-8 en Europe du nord, Asie et Etats-Unis est < 10%, mais est > 40% dans la plupart des pays d’Afrique sub-Saharienne. Les régions de la Méditerranée (telles que l’Italie, la Sicile et la Sardaigne) présentent une séroprévalence moyenne, comprise entre 10 et 30% (16).

Le principal mode de transmission du virus HHV-8 se fait par la salive, notamment lors de la transmission verticale de mère à enfant ou autres enfants, mais également lors des rapports sexuels. En effet, il a été montré que c’était dans la cavité orale que le titre viral de l’HHV-8 était le plus haut (37,38). Le virus HHV-8 peut également être transmis par le biais des transfusions sanguines, d’injection de drogues ou dans un contexte de transplantation d’organe (3,4,9).

2.2 Les principales pathologies associées au virus HHV-8

2.2.1 *La maladie de Kaposi (KS)*

La maladie de Kaposi demeure encore aujourd'hui l'un des principaux cancers viro-induits affectant l'Homme et la plus fréquente pathologie induite par le virus HHV-8.

Quatre principales formes épidémiologiques et cliniques du KS sont reconnues. La forme du KS initialement identifiée par Moritz Kaposi est celle dite classique. Elle est retrouvée en majorité chez des hommes âgés dans le pourtour du bassin méditerranéen et en Europe de l'Est. Non-associée à une infection au VIH, les signes cliniques de celle-ci sont principalement des lésions cutanées. On retrouve également la forme dite endémique, apparue en Afrique dès les années 50 bien avant la pandémie du VIH, qui demeure dans certaines zones de l'Afrique centrale et de l'Est l'un des cancers les plus courants. Elle inclut une forme cliniquement plus agressive chez les enfants, qui se caractérise par une lymphadénopathie généralisée. La forme dite iatrogénique fut mise en évidence dans les années 70, et survient chez des patients présentant une immunodéficience iatrogénique, telle qu'observée chez les patients sous traitements immunosuppresseurs après transplantation d'organes. Le tableau clinique de cette forme de KS peut aller d'une simple atteinte cutanée à des atteintes viscérales sévères. Le risque de développer cette forme est majoritaire dans les deux ans suivant la greffe (39). La forme du KS associée au SIDA est dite épidémique et a émergé aux Etats-Unis dans les années 80 lors de l'épidémie du VIH. Cette forme de KS particulièrement agressive représente encore aujourd'hui le principal cancer pouvant survenir chez les patients VIH-positif. La mise en évidence d'un KS reste d'ailleurs un des critères de diagnostic du SIDA. Une 5^{ème} forme épidémiologique a été récemment rapportée chez des HSH VIH-négatif. Elle se distingue de la forme classique du KS n'étant observé que chez des HSH, plutôt jeunes, et présentant un tableau clinique peu sévère (7).

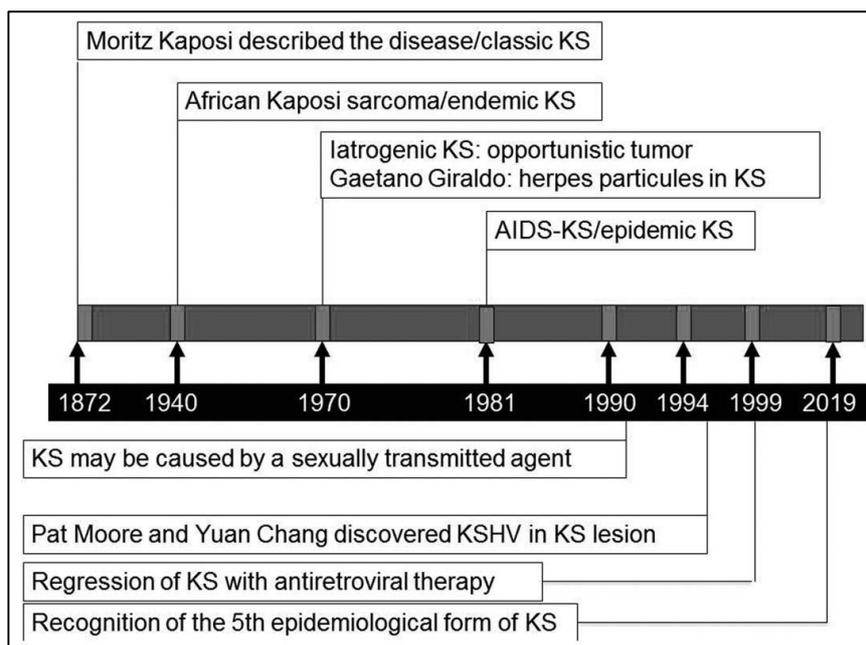


Figure 9. Les principales étapes de découverte des cinq formes épidémiologiques de la maladie de Kaposi. Depuis les premiers cas décrits en 1872 par Moritz Kaposi de ce qu'on considère aujourd'hui comme la forme classique de la maladie de Kaposi, furent décrites quatre autres formes à travers le monde. La forme endémique dans les années 30-40 en Afrique sub-Saharienne, la forme iatrogénique décrites dans les années 70 chez des patients transplantés, révélant pour la première fois le caractère opportuniste du virus HHV-8. La maladie de Kaposi passa sur le devant de la scène dans les années 80 lors de l'épidémie dévastatrice du VIH, et de nombreuses études biologiques, cliniques et épidémiologiques furent menées à partir de ces années. Enfin, la cinquième forme décrite chez des patients HSH non infectés par le VIH, fut récemment reconnue comme telle (7).

Bien que ces différentes formes de Kaposi diffèrent de par leur distribution géographique, leur agressivité et la localisation des symptômes associés, il est certain que l'infection par le virus HHV-8, combinée à une immunité altérée de l'hôte, sont à l'origine de leur développement. En effet, une infection par le virus HHV-8 est systématiquement mise en évidence avant la survenue d'un KS et son génome est retrouvé dans toutes les lésions de kaposi. Aux Etats-Unis, la survenue d'un KS est 20 000 fois plus fréquente chez les patients présentant un SIDA que dans la population générale (16). Un schéma similaire de risque de survenue d'un KS se retrouve également en Europe. Aussi, la séroprévalence du virus HHV-8 est plus forte chez les groupes à risque qui présentent fréquemment un KS (30-60% chez les patients SIDA) et plus faible chez les groupes où la survenue d'un KS est rare (2-4%) (2,9). Une étude de 2017 faite sur 200 000 patients dans 57 pays a permis d'avoir une vision

d'ensemble sur l'incidence du KS pour 100 000 habitants-années, très forte en Afrique du sud, forte en Amérique du nord et Amérique latine, moyenne en Europe et faible en Asie-Pacifique (voir Figure 10.) (16).

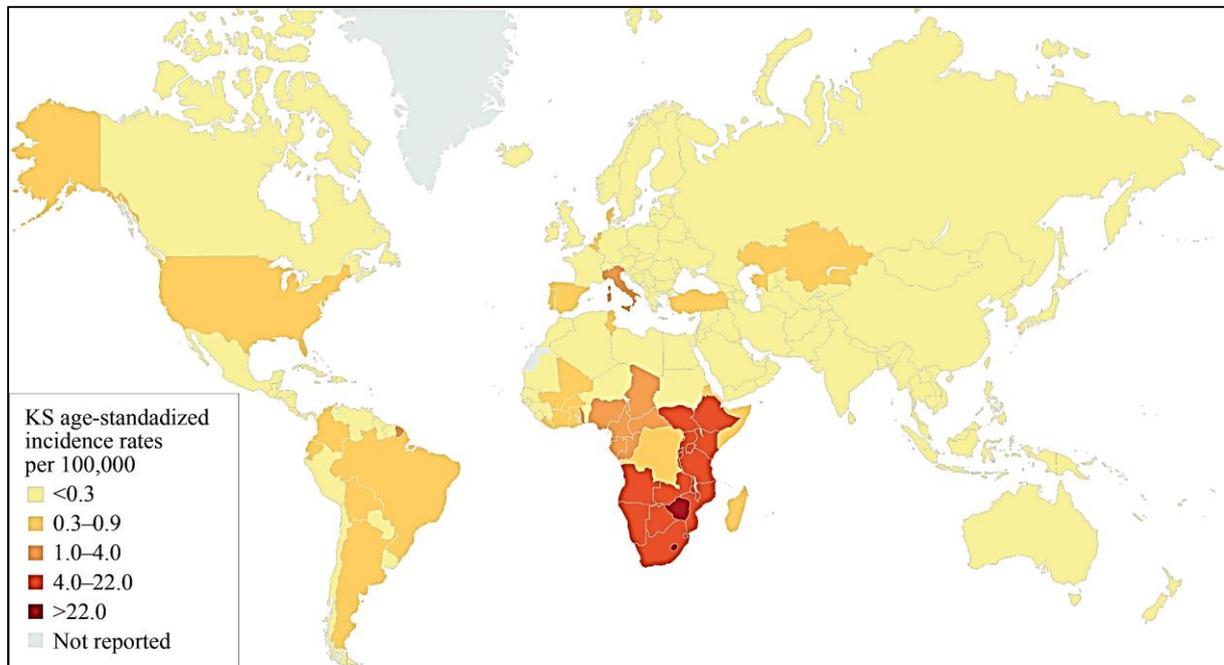


Figure 10. Taux d'incidence du KS par 100 000 hommes (standardisé selon l'âge). Les taux d'incidence de la maladie de Kaposi (KS) ont été obtenus à partir des ressources de l'Agence Internationale pour la Recherche contre le Cancer (IARC), de l'Observatoire mondial du cancer (*Global Cancer Observatory*), et du SEER (*Surveillance, Epidemiology and End Results*) (16).

Le KS est une tumeur hautement vascularisée, dont les caractéristiques histopathologiques sont particulièrement complexes. En effet, les lésions de kaposi présentent une population cellulaire très hétérogène, dont les proportions varient avec le stade de la maladie. Si leur principal élément néoplasique est la présence de cellules très prolifératives, d'aspect fusiforme allongé, appelées *spindle cells*, elles se caractérisent également par de nombreux infiltrats inflammatoires lympho-plasmocytaires, entourés de vaisseaux sanguins anormalement denses et irréguliers. La très grande majorité des *spindle cells* est infectée par le virus en stade de latence (2,9,24).

D'un point de vue clinique, les lésions de kaposi de la peau apparaissent généralement au niveau des extrémités inférieures. Elles peuvent avoir différents aspects (tâches, plaques,

nodules) suivant l'évolution et la composition cellulaire de la tumeur. Leur couleur violacée est due à la migration des globules rouges dans les tissus environnants. Dans les formes les plus agressives du kaposi, les lésions peuvent s'étendre au niveau des muqueuses, des viscères ou des ganglions lymphatiques (*voir Figure 11*). Des symptômes tels que des œdèmes, ulcérations, saignements et infections secondaires, peuvent causer une morbidité importante. De par la présence de ces stigmates très visibles, une détresse psychologique peut ainsi survenir chez certains patients (1,40).

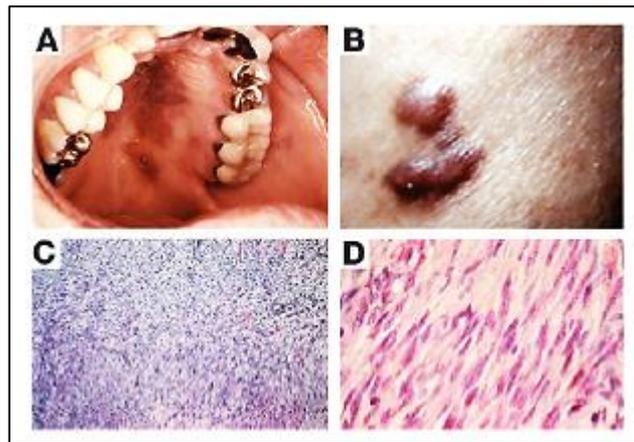


Figure 11. Caractéristiques cliniques et histologiques de la maladie de Kaposi. (A) Lésions macroscopiques de Kaposi au niveau du palais d'un patient ayant le SIDA. (B) Lésion cutanée nodulaire observée dans le KS. (C) Histopathologie d'une lésion nodulaire de KS, montrant des faisceaux de cellules fusiformes allongées (*spindle cells*) et de nombreux espaces néovasculaires. (D) Image de *spindle cells* du KS (9).

2.2.2 Le lymphome primitif des séreuses (PEL)

Décrit tout d'abord en 1989 comme un lymphome associé au VIH chez un groupe de patients qui présentaient un épanchement pleural tumoral, c'est en 1995 que Cesarman *et al.* identifia le virus HHV-8 au sein des cellules tumorales, puis en 1996 que l'équipe de Nador *et al.* désigna ce type de lymphome associé au virus HHV-8, le lymphome primitif des séreuses (PEL). Le PEL est un lymphome non-hodgkinien de haut grade, très rare et très agressif, présentant sans traitement une médiane de survie d'environ 6 mois. Il se caractérise par un épanchement tumoral au sein d'une ou plusieurs cavités des séreuses (péricarde, plèvre, péritoine), généralement sans masse tumorale solide associée. Ces épanchements entraînent des symptômes tels qu'une dyspnée et une ascite (6,41).

La population la plus touchée par le lymphome primitif des séreuses est celle des HSH infectés par le VIH. Il représente 2-4% des lymphomes non-hodgkiniens chez les patients infectés par le VIH. Associé à un état d'immunodépression, certains cas de PEL ont également été répertoriés chez les personnes transplantées ou âgées. De plus, un tiers des patients avec un PEL développe également un KS, et un diagnostic antérieur de KS est un facteur de risque de développement d'un PEL (6,21).

Les cellules du PEL sont des cellules monoclonales, plus larges que les lymphocytes B normaux. Elles présentent des caractéristiques morphologiques variées, ressemblant à celles des larges cellules immunoblastiques ou plasmablastiques ou encore des cellules anaplastiques. Bien qu'elles soient d'origine lymphocytaire B, elles n'expriment généralement pas d'immunoglobulines ni les marqueurs de surface caractéristiques de ces cellules (tels que le CD19 ou CD20). En revanche, elles expriment ceux retrouvés chez les cellules plasmocytaires (tels que CD38 et CD138), suggérant qu'elles sont à un stade de différenciation avancé, proche de celui des plasmablastes (*voir Figure 12*). Ces cellules sécrètent par ailleurs, des interleukines (h-IL-6 et v-IL-6, IL-10) ainsi que des facteurs de croissances, qui contribuent à leur pathogénèse (8,40,41).

Le virus HHV-8 est systématiquement détecté dans les cellules tumorales du PEL (50 à 100 copies de son génome par cellule) et est considéré comme un critère de diagnostic pour le PEL, permettant de le distinguer d'autres lymphomes du même type. Son profil d'expression génique est très similaire à celui retrouvé chez les cellules de kaposi, à savoir principalement latent (2,6,41). Enfin, en plus d'être infectées par le virus HHV-8, les cellules tumorales du PEL sont fréquemment co-infectées par l'EBV (chez environ 80% des patients). L'implication précise de l'EBV dans la pathogénèse du PEL est à ce jour incertaine, mais étant donné l'expression limitée de ses gènes au sein des cellules tumorales, il est plus vraisemblable que le virus HHV-8 y joue le rôle principal (14,41).

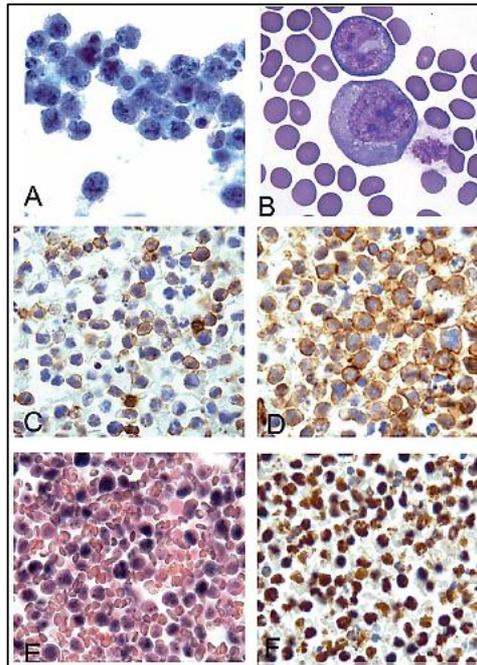


Figure 12. Histopathologie du lymphome primitif des séreuses. (A, B) Les cellules du lymphome sont larges et pléomorphes avec des formes de noyau variables. (C, D) Les cellules tumorales expriment fréquemment (90%) le marqueur des cellules hématolymphoïdes CD45 et expriment toujours le marqueur lié aux cellules plasmocytaires CD38. (E, F) Les cellules tumorales sont très fréquemment infectées par le virus EBV et par définition, elles sont positives pour le gène de latence HHV-8 LANA-1 (6).

2.2.3 La maladie de Castleman multicentrique associée au virus HHV-8

La maladie de Castleman est une maladie lymphoproliférative B, dont on distingue deux formes cliniques: la maladie de Castleman unicentrique et la maladie de Castleman multicentrique (MCD). La MCD est une pathologie systémique inflammatoire rare et très agressive. Elle se caractérise par une lymphadénopathie généralisée (présence de multiples ganglions lymphatiques d'une taille anormalement importante), une hépatosplénomégalie et par divers symptômes inflammatoires, qui évoluent par poussées entrecoupées de périodes de rémission de durée variable (6,40).

C'est en 1995 que le virus HHV-8 fut découvert comme étant l'agent étiologique responsable d'une forme de MCD associée au virus HHV-8 (HHV-8-MCD), survenant en grande majorité

chez des patients infectés par le VIH (~ 90%) ainsi que chez des patients transplantés. En effet, une MCD chez cette population est associée à la présence du virus HHV-8 dans près de 100% des cas. En revanche, chez les patients immunocompétents, la survenue d'une HHV-8-MCD ne représente que 50% des cas de MCD, et n'est principalement observée que dans les populations ayant une forte prévalence pour les infections au virus HHV-8 (HSH ou populations d'Afrique sub-Saharienne et centrale). On note par ailleurs que la HHV-8-MCD présente un tableau clinique plus agressif que la MCD non liée à l'HHV-8 (2,6,21).

Il a de plus été observé que les patients atteints de HHV-8-MCD développent fréquemment un KS (dans 75% des cas). D'ailleurs, cette maladie, que l'on nomme aussi « hyperplasie angiofolliculaire », se caractérise également par une prolifération vasculaire (au niveau des ganglions lymphatiques), ce qui rappelle les caractéristiques histologiques du KS (21).

Chez les patients atteints d'une HHV-8-MCD, le virus HHV-8 est détecté dans les lymphocytes B, de morphologie plasmablastique, présents au niveau de la zone du manteau des follicules lymphoïdes (détection du gène de latence LANA-1 du HHV-8) (6).

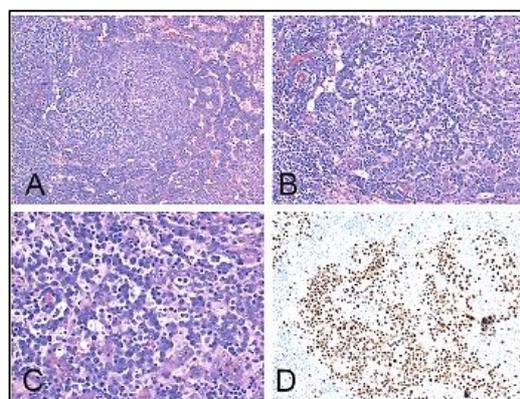


Figure 13. La maladie de Castleman multicentrique associée à l'HHV-8 avec des agrégats plasmablastiques. (A-D) Un agrégat de plasmablastes entourant un centre germinatif. (D) les plasmablastes sont positifs pour le gène LANA-1 (6).

Au niveau du compartiment sanguin, on mesure une augmentation de la charge virale HHV-8 lors des poussées inflammatoires, qui diminue en cas de succès thérapeutique ou lors des périodes de rémission (21,40).

L'état très inflammatoire et la symptomatologie clinique observés chez les patients sont vraisemblablement induits par un excès de cytokines, en particulier l'human-IL-6 (h-IL-6) et son homologue viral, la v-IL-6. L'h-IL-6 et la v-IL-6 contribuent toutes deux à la différenciation plasmablastique des lymphocytes B infectés que l'on retrouve au niveau des ganglions lymphatiques atteints. Par ailleurs, les gènes viraux lytiques sont plus fréquemment exprimés dans les cellules de la HHV-8-MCD (10-15%) qu'ils ne le sont dans les cellules du KS ou du PEL, suggérant que cette réplication virale lytique soit une des composantes de la pathogénèse de la HHV-8-MCD (6,14,21,40).

2.2.4 *KSHV inflammatory cytokine syndrome (KICS)*

Un nouveau syndrome a récemment été rapporté chez des patients infectés par le virus HHV-8 et manifestant des symptômes inflammatoires similaires à ceux observés chez la HHV-8-MCD, sans pour autant retrouver les atteintes histologiques classiquement retrouvées dans la MCD. Ce syndrome a été appelé *KSHV inflammatory cytokine syndrome* (KICS). Il se caractérise par une charge virale HHV-8 particulièrement élevée ainsi qu'un fort taux en cytokines dans le sérum (IL-6, IL-10). Les patients touchés par le KICS présentent de multiples symptômes inflammatoires très graves et un fort risque de mortalité avec un taux de survie inférieur à 60%. Nombre d'entre eux présentent également un KS et/ou un PEL et sont co-infectés par le VIH (6,7,40).

2.3 Facteurs de risques associés à l'infection par le virus HHV-8

2.3.1 Altération du système immunitaire et VIH

Dans la population générale, l'infection par le virus HHV-8 seul n'aboutit que rarement à la formation de cancers associés à ce virus. Il est aujourd'hui bien établi que l'altération du système immunitaire augmente drastiquement le risque de développer un des cancers associés au virus HHV-8 chez les patients infectés. Cette altération du système immunitaire peut être observée lors d'une infection par le VIH, d'une immuno sénescence liée à un âge avancé du patient, ou encore chez les individus présentant une immunosuppression iatrogénique. Lors d'une infection par le VIH, l'altération progressive du système immunitaire conduit à l'apparition de maladies opportunistes traduisant le stade SIDA de la maladie. Dans ce contexte, différentes infections peuvent apparaître, incluant les virus oncogènes tels que le virus HHV-8, l'EBV et l'HPV (*Human papillomavirus*) et entraîner la formation des pathologies tumorales associées (2,16).

Bien que l'infection par le VIH ne soit pas indispensable au développement du KS et autres cancers associés au virus HHV-8, il a été montré que parmi les patients infectés par le virus HHV-8, le risque de développer ces cancers est bien plus important chez les patients co-infectés par le VIH-1, que chez ceux présentant d'autres formes d'immunosuppression. Cela suggère que le VIH pourrait être un co-facteur et avoir une action directe sur la pathogénicité du virus HHV-8. Il a en effet été montré qu'au niveau moléculaire, le VIH pouvait avoir une action directe sur la réactivation virale du virus HHV-8 et donc sur la progression de la maladie, notamment par l'induction de cytokines inflammatoires par l'intermédiaire de la protéine virale Tat (*Trans-Activator of Transcription*) du VIH. Par ailleurs, il a été observé que l'interaction entre la protéine RTA, issue d'un gène viral lytique du virus HHV-8 et la protéine Tat du VIH-1 pouvait induire l'augmentation de la susceptibilité cellulaire à l'infection par le VIH-1 (2,3,16).

2.3.2 Risques de transmission du virus HHV-8

Si le lien entre le virus HHV-8 et les cancers qui lui sont associés est établi, de nombreuses questions demeurent encore non élucidées, concernant d'une part la distribution particulièrement hétérogène du virus HHV-8 dans le monde, très inhabituelle pour un

herpèsvirus, et d'autre part, le risque de développer ou pas une tumeur associée. En effet, mis à part dans les cas d'immunosuppression, il est impossible de savoir pourquoi un patient infecté par le virus HHV-8 développera ou non une tumeur associée à l'HHV-8. Diverses suggestions de facteurs de risques associés à l'infection au virus HHV-8 ont été rapportées dans la littérature.

L'une d'entre elles concerne certaines pratiques associées à la transmission salivaire. En effet, le virus HHV-8, considéré comme un pathogène sexuellement transmissible, voit sa transmission particulièrement élevée chez les populations HSH aux Etats-Unis et en Europe de l'ouest. Etant principalement excrété dans la salive, de façon intermittente mais fréquente, sans symptômes cliniques apparents, des études ont montré que l'exposition à la salive représentait un facteur de risque à l'acquisition du virus HHV-8 parmi les populations HSH. La transmission salivaire est également responsable d'une augmentation de la transmission verticale de la mère à son enfant (mastication de la nourriture par la mère) dans les régions les plus endémiques d'Afrique (7,19,37,38). Concernant la population HSH, divers autres facteurs de risques à caractère sexuel ont été rapportés dans la littérature (42), avec notamment, l'utilisation de drogues *chemsex*. En effet, l'utilisation de ces drogues qui accentuent les pratiques sexuelles à risque (augmentation du nombre de partenaires, du nombre de rapports non protégés), pourrait favoriser la transmission du virus, tout particulièrement lorsque celui-ci est excrété dans la salive (43). Il a également pu être observé chez cette population que l'inhalation de *poppers*, pouvait favoriser l'excrétion d'HHV-8 dans la cavité orale, en stimulant les cellules infectées (44,45). Dans un travail expérimental réalisé au laboratoire, nous avons montré *in vitro* que le traitement au *poppers* de lignées cellulaires PEL infectées par HHV-8 stimulait la production extracellulaire de particules infectieuses, ce qui pourrait expliquer une plus forte transmission du virus parmi la population HSH consommatrice de ce type de drogues ([voir article en Annexes](#) (43)).

Par ailleurs, une prédisposition génétique de l'hôte a également été évoquée pour expliquer le maintien de la présence du virus HHV-8 chez certaines populations endémiques. L'existence d'un gène récessif sur le chromosome 3p22 prédisposant à une infection au virus HHV-8 chez l'enfant dans les populations endémiques a notamment été suggérée (4,7).

Enfin, diverses études ont mentionné l'implication de certains facteurs environnementaux pouvant favoriser la transmission ou la pathogénèse associées au virus HHV-8, comme la consommation de molécules chimiques issues de végétaux qui pourraient agir sur la

réactivation du virus, la présence du parasite responsable du paludisme ou encore l'absorption par la peau d'oxyde de fer retrouvés en grande quantité dans les sols volcaniques de certaines régions du monde (4,46–48).

3 Mécanismes impliqués dans la pathogénèse induite par le virus HHV-8

3.1 Le caractère oncogénique du virus HHV-8

Le virus HHV-8 est l'un des 7 virus humains à caractère oncogénique reconnus (10). La modulation des voies cellulaires par les protéines virales oncogéniques de l'HHV-8 permet non seulement à la cellule infectée d'outrepasser les signaux suppresseurs de tumeurs et apoptotiques et de permettre sa prolifération et son immortalisation, mais également d'induire d'autres caractéristiques que l'on retrouve chez tout type de cancer, qui sont notamment l'angiogenèse, l'inflammation et l'échappement à la surveillance immunitaire. En effet, les voies cellulaires modulées par le virus pour maintenir la cellule en vie sont très similaires à celles décrites dans les cellules tumorales. Aussi, si le but premier du virus HHV-8 est de maintenir la survie de la cellule et donc sa propre survie et ainsi d'assurer sa persistance au sein de l'organisme hôte, la conséquence en est la formation d'une tumeur (2,15).

Il a été démontré aux niveaux clinique, histopathologique et expérimental que la présence en continue du HHV-8 dans les cellules infectées était nécessaire pour initier et maintenir la croissance tumorale. En effet, la perte des gènes viraux de latence dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de KS ou de PEL refreine indéniablement la progression tumorale (41,49). Concernant la MCD, malgré le peu d'études *in vitro* ou *in vivo* réalisées, il est bien établi que la sévérité de la maladie est corrélée avec la charge virale retrouvée dans le sang périphérique (4). Chez le PEL, les cellules tumorales ne présentent que très rarement d'altérations structurales liées aux gènes transformant (oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs) impliqués dans la lymphomagenèse (8,21,50). Il est donc bien établi que c'est le virus HHV-8, par le biais de ses gènes viraux, qui joue un rôle transformant chez les cellules du PEL. Par exemple, le gène v-FLIP induit l'expression d'un grand nombre de gènes cibles du NF- κ B, impliqués dans la signalisation des cytokines, la mort cellulaire, l'adhésion cellulaire, l'inflammation et la réponse immunitaire (41). Chez la MCD, il est montré que l'IL-6 et la v-IL-6, induites en grande quantité par le HHV-8, sont responsables de l'état inflammatoire et de la symptomatologie retrouvés chez les patients (6).

L'oncogenèse en rapport avec le virus HHV-8 dans la maladie de kaposi est plus complexe. En effet le KS ne se présente pas, du moins au stade précoce, comme un sarcome typique, mais plutôt comme une angio-hyperplasie inflammatoire. Elle résulte en fait de la prolifération des

spindle cells et de la production de cytokines inflammatoires et de facteurs angiogéniques médiées par l'infection HHV-8 (19). D'ailleurs le KS se distingue des autres types de cancer de par la nature polyclonale ou oligoclonale de ses lésions tumorales. Par ailleurs, les cellules isolées de lésions précoces de KS et implantées chez des souris n'induisent généralement pas de formation de tumeurs. De même, les *spindle cells* isolées et remises en culture ne présentent pas les caractéristiques de cellules tumorales transformées, à savoir une prolifération autonome et soutenue (1). De plus, bien que le virus HHV-8 code pour plusieurs oncogènes qui pourraient potentiellement induire un phénotype tumoral, l'infection au HHV-8 chez la population générale mène rarement à un KS (3). Tous ces éléments soulignent l'importance de cofacteurs, tel que la déficience immunitaire, à l'œuvre dans le processus de développement tumoral associé à l'HHV-8 (4).

Néanmoins, bien que la nature tumorale de la maladie de Kaposi soit assez complexe, le profil cancéreux, monoclonal, sans équivoque des formes avancées de Kaposi, et l'association de l'HHV-8 avec deux types d'hémopathies lymphoïdes, le PEL et la MCD, confèrent au virus HHV-8 une réelle nature oncogénique.

3.2 Les mécanismes de l'oncogenèse virale

Les protéines virales de latence jouent un rôle majeur dans le potentiel prolifératif et de transformation tumorale du virus HHV-8, étant donné que c'est dans cet état de latence que le virus est principalement retrouvé dans toutes les cellules tumorales. Cependant, il est apparu que les deux phases du cycle viral étaient impliquées dans l'initiation et la progression tumorale, et que plusieurs protéines virales lytiques possédaient également des fonctions régulatrices et oncogéniques (10,15). Le traitement des patients par des antiviraux dirigés contre l'HHV-8, tels que le ganciclovir, montrant une diminution de la charge virale, a permis notamment de mettre en évidence l'importance de ces gènes lytiques dans la tumorigenèse associée à l'HHV-8 (4). Le rôle fonctionnel de chacune des protéines virales impliquées dans l'oncogenèse du virus a été mis en évidence dans divers systèmes expérimentaux artificiels, *in vitro* d'une part, notamment dans des lignées cellulaires des tumeurs dans lesquelles les gènes viraux sont naturellement exprimés, dans des modèles d'infection par le virus HHV-8 de cellules endothéliales primaires, ou encore par des méthodes d'inhibition de l'expression de certains de ces gènes viraux dans des lignées cellulaires infectées. D'autre part, il a été mis en évidence dans des modèles *in vivo*, notamment dans des modèles de souris transgéniques n'exprimant qu'une ou quelques protéines virales, ou encore par l'inhibition de certains gènes viraux dans des modèles de souris PEL ayant reçu une xéno greffe (15,18,19,22,23,27,29,51–54). Il est important de noter toutefois qu'aucun modèle à ce jour ne permet d'appréhender dans son ensemble les mécanismes oncogéniques de ces gènes tels qu'observés chez l'Homme. Les fonctions essentielles de ces protéines virales impliquées dans la biologie de base et dans l'oncogenèse du virus HHV-8 sont détaillées ci-dessous.

3.2.1 Les protéines de latence

Les principaux gènes codant pour les protéines de latence sont regroupés dans une même région du génome, et contribuent fortement à l'établissement de l'infection latente. Il s'agit des gènes LANA (ORF73), v-Cycline (ORF72), v-FLIP (ORF71/K13), les kaposines A, B et C (K12), et 12 pré mi-ARNs distincts. Ces protéines virales de latence jouent conjointement un rôle dans le fonctionnement biologique du virus, et possèdent la capacité d'activer constitutivement et/ou transitoirement des voies de signalisations cellulaires qui sont essentielles à la transformation tumorale et à la survie des cellules infectées. Elles participent

également à la production de signaux pro-angiogéniques et pro-inflammatoires impliqués dans la pathogénèse des cancers associés à l'HHV-8 (3,12).

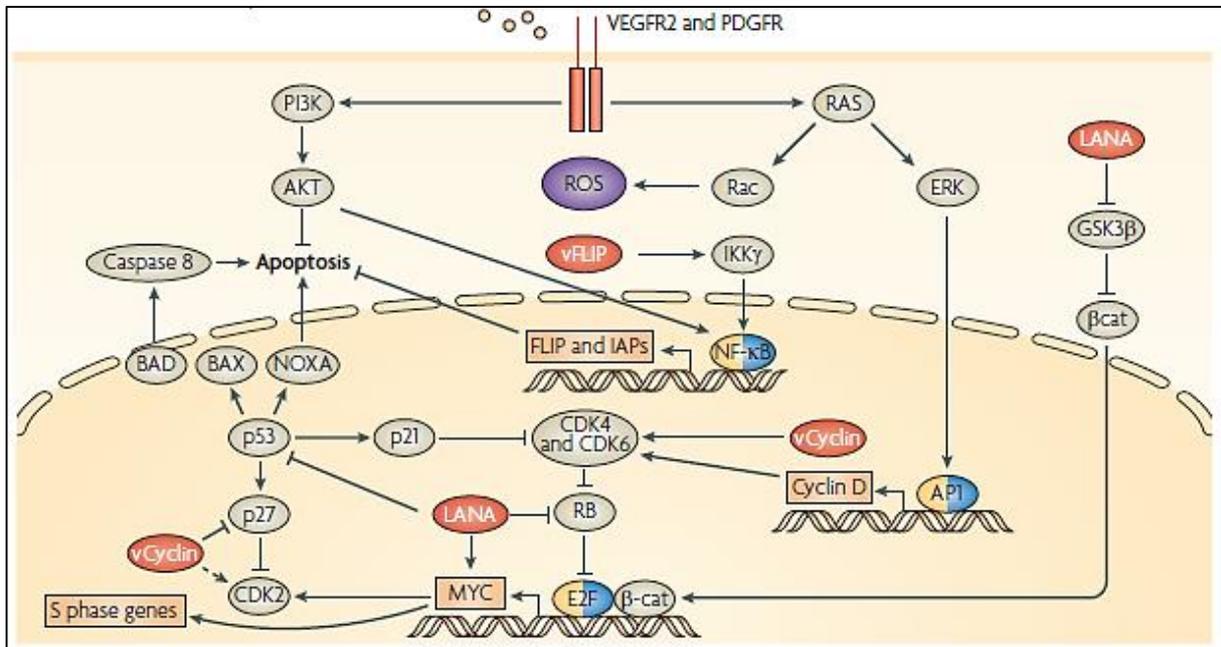


Figure 14. Mécanismes impliqués dans l'oncogénèse du virus HHV-8 en phase de latence. Certains facteurs sécrétés stimulent les récepteurs présents à la surface des cellules infectées par le virus en latence selon un mécanisme paracrine, complétant le système autocrine (comme la sécrétion de cytokines par la protéine virale v-FLIP) et les activités pro-oncogéniques directes des gènes latents du virus HHV-8, tels que v-FLIP, v-cycline et LANA, ainsi que les mi-ARNs codés par l'HHV-8. β-cat, β-catenin ; CDK, cyclin-dependent kinase ; GSK3β, glycogen synthase kinase 3β, HIF, hypoxia-inducible factor; IAPs, inhibitor of apoptosis proteins; NF-κB, nuclear factor-κB; PKC, protein kinase C; PLC, phospholipase C; ROS, reactive oxygen species (3).

a) LANA

LANA (*Latency-Associated Nuclear Antigen*) est la protéine virale de latence majeure. On la retrouve fortement exprimée et de manière constitutive dans toutes les cellules infectées des trois principales pathologies tumorales associées à l'HHV-8, le KS, le PEL et la MCD.

La protéine virale LANA est suffisante et essentielle pour le maintien du virus sous forme **épissomale**, mais aussi pour la **réplication** et la ségrégation du génome viral lors de la division cellulaire. En effet, en interagissant avec les protéines de la chromatine, elle permet l'attachement du génome viral au génome de la cellule hôte, assurant ainsi le maintien d'un

petit nombre de copies d'ADN viral dans chaque cellule fille. LANA peut également interférer sur la progression du cycle cellulaire et l'**apoptose**, notamment par l'inhibition du facteur de transcription p53 (*tumor protein 53*) ou de la voie suppresseur de tumeur Rb-E2F. La protéine LANA joue aussi un rôle important dans l'activation des voies de **prolifération/transformation** de la cellule infectée, en interagissant par exemple avec GSK-3 β (*glycogen synthase kinase-3 β*), une kinase ciblant diverses protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. Ainsi, en inhibant la GSK-3 β , elle induit la stabilisation d'une de ses cibles, la β -catenin, promouvant ainsi la prolifération et la transformation cellulaire. LANA contribue également à l'**angiogenèse**, en permettant notamment la stabilisation du régulateur transcriptionnel HIF1 α (*Hypoxia-inducible factor 1 α*), conduisant à la transcription de ses gènes cibles impliqués dans l'angiogenèse et la croissance tumorale. LANA jouerait également un rôle dans l'**immortalisation** cellulaire, en augmentant l'expression de la télomérase, prolongeant ainsi la durée de vie de la cellule infectée. Enfin, LANA régulerait négativement la transcription des gènes viraux lytiques durant l'établissement de la latence. Il a ainsi été montré que LANA avait la capacité de se lier directement au promoteur du gène viral lytique **RTA** et ainsi d'inhiber son activité (3,10,11).

b) v-Cycline

La v-Cycline est un homologue viral de la Cycline D2 cellulaire qui fonctionne de façon similaire en formant un complexe avec la Cdk6 (*cellular cyclin dependant kinase 6*). Son rôle est donc essentiellement de réguler la progression du cycle cellulaire, et ainsi de favoriser la **prolifération cellulaire**. Pour se faire, elle active de façon constitutive la kinase cellulaire Cdk6. Le complexe v-Cycline-Cdk6 assure alors la phosphorylation et l'inactivation de protéines inhibitrices du cycle cellulaire telles que p21 et p27, conduisant ainsi à une transition accélérée de la phase G1/S du cycle cellulaire (3,11).

c) v-FLIP

La protéine v-FLIP (*viral Fas-associated protein with death domain-like interleukin-1 β -converting enzyme/caspase-8-inhibitory protein*) est un homologue de la protéine FLIP cellulaire (c-FLIP). L'une de ses principales fonctions est d'activer de façon constitutive les

voies classique et alternative du NF- κ B, voies clés de la survie et de la prolifération cellulaire, en se liant directement à son inhibiteur, l'IKK γ (*Inhibitor of κ B kinase- γ*). L'activation constitutive de cette voie durant la latence joue un rôle important dans l'oncogenèse du virus HHV-8, en favorisant la **survie** et la **prolifération cellulaire**, mais aussi en induisant la production de nombreuses **cytokines** et chimiokines inflammatoires et de protéines inhibitrices de l'**apoptose** (tels que BCL-2 et BCL-X_L). v-FLIP a également un effet protecteur contre l'activation des voies apoptotiques médiées par les récepteurs de mort (Fas/CD95 et TNFR (*tumor necrosis factor receptor*)) en empêchant le recrutement des caspases-8. Il a été montré *in vitro*, que l'inhibition de v-FLIP par des ARN interférents réduisait fortement l'activité de NF- κ B et induisait la mort par apoptose des lignées PEL. En plus de son activité anti-apoptotique, la voie du NF- κ B prévient la réactivation virale lytique, indiquant alors que v-FLIP contribue au **maintien de la latence**. Enfin, la protéine v-FLIP est également responsable de la transformation morphologique des cellules endothéliales en *spindle cells in vitro* (3,4,10,14,21,49).

d) Les Kaposines

Les protéines Kaposines A, B et C sont exprimées dans la majorité des *spindle cells* de Kaposi et possèdent un potentiel **transformant**. Il a été démontré que la Kaposine A pouvait induire la transformation cellulaire de fibroblastes de rat *in vitro*, indiquant son potentiel oncogénique dans l'induction de la transformation phénotypique (11). La Kaposine B est directement impliquée dans la reprogrammation des cellules endothéliales infectées par HHV-8. En effet, elle permet la stabilisation de l'ARNm codant pour la protéine PROX1 (*Prospero homeobox protein 1*), la principale protéine régulatrice de la différenciation des cellules endothéliales. L'augmentation de l'expression de PROX1 permet la reprogrammation des cellules endothéliales vasculaires qui acquièrent alors des marqueurs de cellules du système lymphatique, un processus que l'on pense majeur dans le développement tumoral du KS (49). Par ailleurs, tout comme v-FLIP, les Kaposines A et B sont reconnues pour leur capacité à contribuer au **microenvironnement inflammatoire** des cellules infectées par le virus HHV-8 en permettant la production de cytokines pro-inflammatoires. Peu d'études existent à ce jour concernant les fonctions de la Kaposine C (3,10).

e) Les micro-ARNs

Les micro-ARNs (mi-ARNs) sont des ARNs simple brins non-codants d'environ 19-23 nucléotides, qui régulent la traduction des ARN messagers (ARNm) en se liant directement aux régions complémentaires de cet ARNm. A ce jour, 12 pré mi-ARNs codant pour 25 mi-ARNs ont été identifiés chez le virus HHV-8, nommés miR-K12-1 à miR-K12-12 (49). Ces mi-ARNs, fortement exprimés dans les cellules infectées en latence, sont mis en évidence dans les tissus de patients KS, PEL ou MCD et peuvent également être détecté directement dans les particules virales (11). En ciblant et inhibant de nombreuses gènes cellulaires et viraux, les mi-ARNs contribuent sur de multiples plans à la pathogénèse du virus. En effet, certains d'entre eux ont la capacité de **réprimer la réplication virale lytique** et de **maintenir la latence**. Plusieurs groupes de recherche ont notamment identifié les miR-K12-3, miR-K12-5, miR-K12-9 et miR-K12-11 qui participent à l'inhibition de l'expression du gène lytique RTA, permettant ainsi le maintien de la latence. La réplication virale est également limitée au travers de l'inhibition d'un inhibiteur du NF- κ B, l' $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ (*Inhibitor of κ B α*), par le miR-K12-1. En réduisant la production virale, le virus peut ainsi contourner d'avantage la surveillance immunitaire de l'hôte (49). L'HHV-8 code également pour le miR-K12-1 qui en interagissant directement avec p21, une protéine inhibitrice du cycle cellulaire, peut ainsi induire la **prolifération** de la cellule infectée. Certains mi-ARNs ont également un effet **anti-apoptotique**, comme le miR-K12-10 qui inhibe la voie de signalisation de l'apoptose associé au TGF- β (*transforming growth factor β*). De plus, il a été montré que l'expression du miR-K10 chez les cellules infectées induisait la répression de TWEAKR (*TNF-like weak inducer of apoptosis receptor*), ayant alors pour effet de prévenir l'apoptose et la production de **cytokines pro-inflammatoires**. L'échappement à la **surveillance immunitaire** du virus HHV-8 passe également par le contrôle de voies de signalisation des interférons par le miR-K12-11, ayant pour conséquence de supprimer l'immunité antivirale, et ainsi d'établir une latence persistante. Les mi-ARNs du virus HHV-8 jouent également un rôle important dans l'**angiogenèse** et le développement tumoral. C'est notamment le cas des miR-K2 et miR-K5 qui en inhibant le suppresseur de tumeur tropomyosin 1 (TPM1) favorise l'angiogénèse. Par ailleurs, certains mi-ARNs viraux tels que les miR-K12-6 et miR-K12-11, en ciblant le facteur de transcription oncogène MAF (*musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homologue*), agiraient sur la **reprogrammation** et la **différenciation** des cellules endothéliales infectées, contribuant ainsi au développement du KS. Le virus HHV-

8, par l'expression du miR-K12-11, peut également initier la **transformation** des lymphocytes B (3,9–11,49).

3.2.2 *Les protéines lytiques*

Tout comme les protéines de latence, les protéines virales lytiques peuvent contribuer à la tumorigenèse de l'HHV-8. Cependant, alors que les protéines de latence s'expriment dans toutes les cellules infectées, les protéines lytiques quant à elles ne sont produites que par une petite proportion de cellules tumorales. Malgré tout, ces protéines lytiques qui ne s'expriment ou qui ne sont fortement induites que pendant la réplication lytique, conduisent non seulement au maintien de l'infection virale chez l'hôte grâce à la production de nouvelles particules infectieuses et à l'échappement au système immunitaire, mais surtout, à la production de cytokines et de facteurs de croissance qui, par le biais de mécanismes paracrine et autocrine, peuvent influencer les cellules environnantes en établissant un environnement inflammatoire et angiogénique favorable à la progression tumorale (1–3,9,26).

Le passage de l'état latent à l'état lytique est initié par divers stimuli qui induisent l'expression de la protéine clé de la réactivation virale lytique, le RTA (codé par l'ORF50). L'expression de RTA est suffisante pour enclencher tout le programme lytique, menant à l'expression en cascade des protéines virales. Plusieurs voies cellulaires se coordonnent avec le RTA pour permettre l'induction d'une réactivation virale lytique, incluant la voie du NF- κ B, de la PKC (*protein kinase C*), les voies MEK/ERK (*MAPK/ERK kinase/extracellular-signal-regulated kinase*), de JNK (*c-Jun N-terminal kinase ou stress-activated protein kinase*) et des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) telles que la p38 (2).

Lors de la réactivation virale lytique, le pattern de gènes viraux exprimés est bien plus important que durant la phase de latence. Parmi les protéines virales lytiques impliquées dans la pathogénicité du virus HHV-8, on retrouve notamment K1, v-IL-6 (K2), v-BCL2 (codé par l'ORF16), v-GPCR (codé par l'ORF74, *viral G-protein coupled receptor*), v-IRFs 1-4 (*viral interferon regulatory factors 1-4*, codés par la région génomique englobant les ORFs K9 à K11), vCCL-1, -2 et -3 (*viral-encoded chemokines 1-3*, codés par les ORFs K6, K4 et K4.1 respectivement) et v-IAPs (K7, *viral inhibitor of apoptosis proteins*). Beaucoup d'entre elles sont des homologues de protéines cellulaires (comme v-IL-6, v-BCL-2, vIRFs et vCCLs), et

certaines (comme K1, vGPCR ou v-IL-6) peuvent agir sur la stimulation de la prolifération cellulaire ou exercer des fonctions anti-apoptotiques (2,3,14,26).

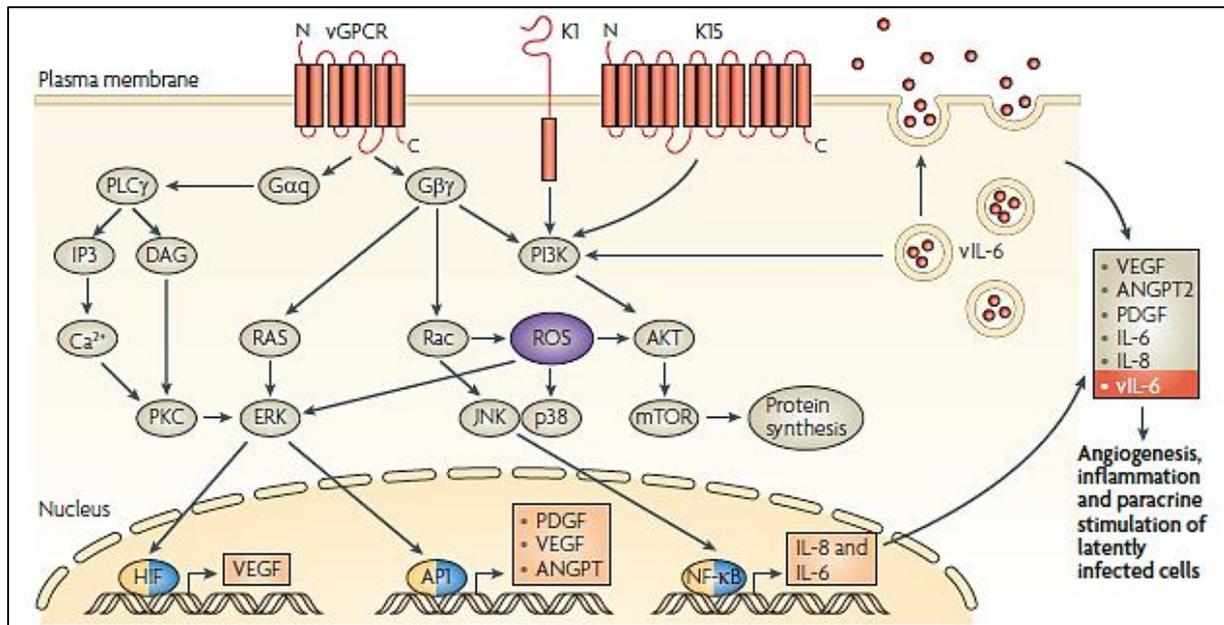


Figure 15. Mécanismes impliqués dans l'oncogenèse du virus HHV-8 en phase lytique. Dans les cellules infectées par le virus en phase lytique, le virus HHV-8 code pour divers gènes lytiques précoces, tels que le v-GPCR, le K1, la v-IL-6, ou encore K15, qui vont agir sur les voies de signalisations de la cellule hôte, menant à l'expression et à la sécrétion de facteurs angiogéniques, inflammatoires et prolifératifs, incluant le VEGF (*vascular endothelial growth factor*), le PDGFB (*platelet-derived growth factor-β*), et les interleukines IL-6 et IL-8 (3).

a) K1

L'une des principales fonctions de la protéine virale K1 est de favoriser la **survie** des cellules infectées en activant la voie anti-apoptotique PI3K-AKT (*phosphoinositide 3-kinase-protein kinase B*), conduisant à la production de facteurs de croissance tels que le VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), qui vont agir de façon paracrine et autocrine. Il a été rapporté que la principale fonction de ces protéines inhibitrices de l'apoptose est de retarder l'apoptose, fournissant ainsi au virus le temps d'assembler ses particules infectieuses avant la lyse de la cellule (3).

b) v-GPCR

La protéine virale lytique v-GPCR peut activer constitutivement diverses voies de signalisations cellulaires (telles que les voies des MAPKs, AKT et NF- κ B), *in vitro* ou dans des modèles de souris, entraînant la production de facteurs **pro-inflammatoires** (comme les cytokines IL-6, IL-8) et **pro-angiogéniques** (comme le facteur de croissance VEGF). Ainsi, à travers l'activation de ces voies cellulaires, le v-GPCR peut stimuler l'activation et la **prolifération** des cellules endothéliales, et ainsi promouvoir de façon paracrine la progression tumorale (49). Il a par ailleurs été observé que l'expression de v-GPCR chez des souris transgéniques entraînait la formation de lésions angioprolifératives typiques des lésions de Kaposi. Le facteur de croissance VEGF, très exprimé dans les cellules du KS et du PEL, a également été retrouvé dans les épanchements tumoraux des patients atteints de PEL, lui suggérant un rôle important dans la formation de ces épanchements. Ainsi, le vGPCR, produit par une petite minorité de cellules infectées en réactivation virale spontanée, peut induire la sécrétion de cytokines cellulaires favorisant le développement tumoral. Les protéines K1 et v-GPCR ont également la capacité **d'immortaliser et de transformer** les cellules endothéliales et les fibroblastes, respectivement (3,9,14,16,49).

c) v-IL-6

La v-IL-6 est un homologue de l'IL-6 humaine. Elle est induite rapidement pendant la phase lytique mais également faiblement pendant la phase de latence. Si la v-IL-6 se comporte comme un facteur de croissance autocrine des lignées PEL, elle contribuerait plutôt à la croissance du KS et de la MCD par des voies de signalisation paracrine. La v-IL-6 agit par le biais de la sous-unité gp130 du récepteur cellulaire de l'IL-6 pour activer les voies de signalisations des lymphocytes B, incluant les voies JAK-STAT, MAPK-ERK, et PI3K-AKT. L'activation de ces voies conduit à la sécrétion de **cytokines inflammatoires** telles que l'IL-6 humaine et de **facteurs angiogéniques** tels que le VEGF, qui pourront alors aller moduler de façon paracrine, la **prolifération** et la **survie** des cellules infectées, l'angiogenèse (principalement *via* le VEGF) mais aussi recruter et activer d'autres cellules non-infectées. Ces facteurs inflammatoires et angiogéniques induits par la v-IL-6 participeraient au développement initial du KS, et jouent un rôle majeur dans la physiopathologie de la MCD. En effet chez la MCD, il est reconnu que la sévérité de la maladie est corrélée avec le taux en IL-6. D'ailleurs de façon intéressante, il a

été observé que les souris transgéniques exprimant la v-IL-6 développaient une tumeur très similaire à la MCD (16,49). De plus, il a été montré également que la v-IL-6 contribuait à la **reprogrammation lymphatique** des cellules endothéliales infectées, via l'activation des voies STAT3 et AKT (4).

d) v-CCLs

Les trois chemokines du virus HHV-8, v-CCL-1, v-CCL-2 et v-CCL-3 (viral CC-chemokine ligands -1, -2, -3) partagent des analogies de séquences avec certaines chemokines cellulaires, mais se distinguent cependant de celles-ci par leurs propriétés. Elles participent à **l'échappement au système immunitaire**, comme c'est le cas pour la v-CCL-2 qui a la capacité de se lier sur plusieurs récepteurs de chemokines de type CCR- et CXCR- et ainsi d'inhiber l'activité des chemokines cellulaires. Ces chemokines virales présentent également des fonctions **angiogéniques** chez le KS et le PEL, en partie *via* l'induction du VEGF. Contrairement à la plupart des protéines virales (non-sécrétées), ces chemokines virales ont la capacité d'agir de façon paracrine sur la **survie** des cellules infectées de manière latente ou non-infectées, contribuant ainsi à la pathogénèse du virus HHV-8. Il a d'ailleurs été observé que v-CCL-1 et v-CCL-2 augmenteraient la survie de lignées PEL en culture. Un autre aspect de leur activité pro-survie passe par la stimulation de la **réplication** virale au moyen de la voie autocrine cette fois-ci (49).

e) v-IRFs

Les v-IRFs (*viral Interferon Regulatory Factors*) du virus HHV-8, homologues des IRFs cellulaires, sont des protéines virales lytiques capables d'inhiber la production et la signalisation des interférons de type I (IFNs I). Le génome du virus HHV-8 code pour quatre v-IRFs (numérotés de 1 à 4) qui s'expriment durant la phase lytique, bien que les v-IRF-1 et -3 aient été retrouvés exprimés chez les cellules PEL en phase de latence. Les IRFs cellulaires sont une famille de facteurs de transcription qui, entre autres, conduisent à l'expression des IFNs I. La fonction principale des v-IRFs est de cibler les IRFs cellulaires afin d'interférer avec la signalisation des IFNs I, et ainsi de réduire les **défenses immunitaires** qui ciblent les primo-infections et la réplication virale productive (3,9,49).

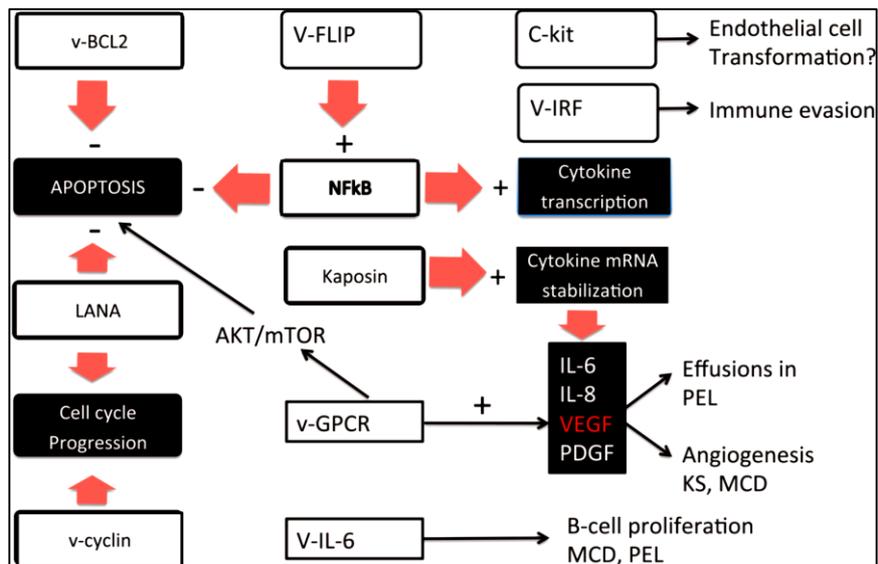


Figure 16. Représentation schématique de la pathogénèse du KS, PEL et MCD associés à l'HHV-8. Effets des principales protéines virales sur les diverses caractéristiques de la pathogénèse du KS, PEL et MCD associés au virus HHV-8 (14).

3.2.3 Interaction entre expression génique virale latente et lytique

La frontière entre phase de latence et phase lytique n'est pas aussi évidente qu'il était supposé. Il est bien intégré aujourd'hui l'idée selon laquelle il existe des interactions entre les deux phases du cycle, et que l'expression de certains transcrits viraux se chevauche sur les deux phases (11,55).

En effet, il a été observé que les cellules infectées de façon latente par le virus exprimaient parfois un faible niveau de gènes lytiques sans pour autant entraîner de réplication virale lytique. D'ailleurs, une analyse transcriptomique des gènes viraux *in vitro* a permis de montrer qu'une infection *de novo* par le virus HHV-8 s'accompagnait immédiatement d'un bref pic d'expression des gènes viraux lytiques (qui disparaissait dès 8h post-infection) (22). Ces pics d'expression de gènes lytiques apparaissent comme essentiels à l'établissement de la latence et au maintien de l'infection virale chez l'Homme. C'est également ce que l'on observe avec v-IL-6. L'expression de ce gène viral était initialement associée uniquement à une réactivation virale lytique. Or, l'on sait maintenant que le v-IL-6 s'exprime à faible niveau durant la latence

des cellules PEL et qu'il est impliqué, de façon paracrine, dans la croissance et la survie de ces cellules (49).

Une autre interaction entre gènes latents et lytiques s'observe par l'interaction entre le gène lytique RTA et le gène de latence LANA : tandis que LANA inhibe la réplication virale lytique en réprimant l'expression du RTA, celui-ci en retour contribue à l'établissement de la latence, en activant, très tôt post-infection, l'expression de LANA (2).

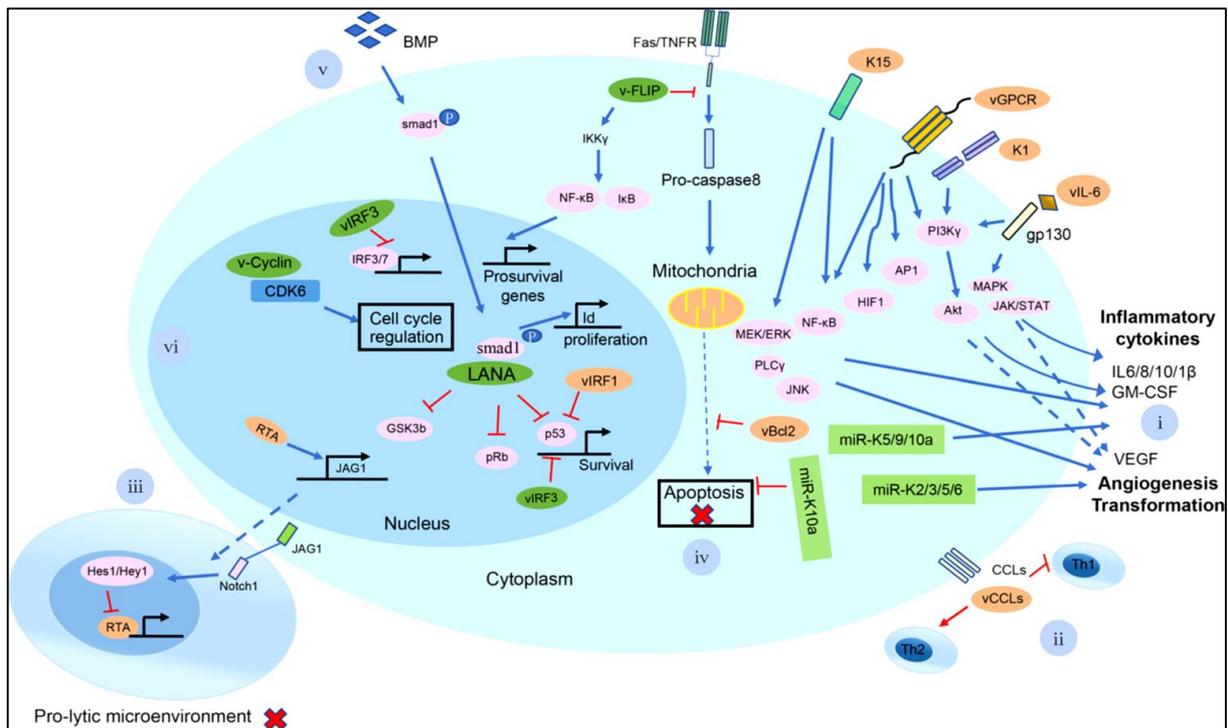


Figure 17. Résumé des mécanismes cellulaires impliqués dans la pathogénèse associée au virus HHV-8. Sur cette figure, les protéines virales lytiques sont représentées en orange et les protéines de latence en vert. (i) les protéines lytiques v-GPCR, K1, K15 et v-IL-6 activent les voies cellulaires PI3K/AKT, MAPK, JAK/STAT, NF-κB, MEK/ERK/JNK permettant à la cellule infectée de sécréter des cytokines et chimiokines, telles que IL-6/-8/-10/1β, GM-CSF, et VEGF. Certains mi-ARNs viraux induisent également la sécrétion de cytokines ou de facteurs angiogéniques tel que le VEGFA. (ii) Le virus code pour des vCCLs lui permettant de réprimer les réponses immunitaires de l'hôte. (iv) v-FLIP a la capacité d'inhiber l'activation des pro-caspases -8 et d'induire l'expression de protéines anti-apoptotiques via l'activation du NF-κB qui up-régule l'expression de gènes pro-survie. v-Bcl-2 inhibe l'apoptose en se liant à des protéines pro-apoptotiques. miR-K10a bloque la voie apoptotique médiée par TWEAK. (vi) LANA se lie et bloque l'activité transcriptionnelle du p53 permettant l'inhibition de la mort cellulaire induite par p53. LANA inactive également pRb, et ainsi lève l'inhibition d'arrêt du cycle cellulaire par pRb. LANA se lie au GSK-3β et agit ainsi sur le cycle cellulaire. v-Cycline régule le cycle cellulaire et la prolifération cellulaire en activant constitutivement la cdk6 cellulaire. v-IRF-3 agit comme un activateur transcriptionnel des gènes contrôlés par IRF-3 et IRF-7 cellulaires. v-IRF-3 régule également négativement le p53 conduisant ainsi à l'inhibition de la transcription de p21 médiée par p53 (11).

4 Diagnostic et stratégies thérapeutiques des cancers associés à l'HHV-8

La confirmation d'une infection au virus HHV-8 se base principalement sur des analyses sérologiques et de biologie moléculaire permettant la détection de ses gènes viraux. Ces tests sont essentiels pour l'étude épidémiologique du virus, la gestion clinique des patients infectés par le HHV-8 mais également pour évaluer le risque de survenue d'une tumeur associée au virus HHV-8 lors des transplantations d'organes (56).

Comme pour les autres herpèsvirus, un traitement permettant l'éradication de l'HHV-8 n'existe pas. Un grand nombre de médicaments utilisés dans le traitement des pathologies associées à l'HHV-8 a été développé avant même que l'HHV-8 soit considéré comme l'agent étiologique clé de ces pathologies. Si les avancées réalisées ces dernières années sur la compréhension de son rôle dans la pathogénèse ont permis l'introduction de nouvelles thérapies plus ciblées, la stratégie thérapeutique pour les cancers associés à l'HHV-8 repose encore essentiellement sur l'administration de chimiothérapies, ainsi que sur des traitements visant le rétablissement du système immunitaire lorsque cela est possible.

4.1 Maladie de Kaposi

4.1.1 Diagnostic

Le diagnostic du KS, principalement basé sur la clinique, est établi en premier lieu par la recherche de lésions au niveau des muqueuses orales et de la peau et par l'imagerie médicale pour identifier les lésions viscérales. Le virus HHV-8 étant présent dans toutes les lésions de la KS, le diagnostic peut également être effectué par marquage immuno-histochimique utilisant des anticorps anti-LANA ou par la détection du génome viral par PCR (*polymerase chain reaction*). Des tests sérologiques tels que l'immunofluorescence, le test ELISA et le Western-blot peuvent également être effectués à partir des prélèvements sanguins (2,40,57).

4.1.2 Stratégies thérapeutiques

L'un des freins à la compréhension du KS et au choix de la stratégie thérapeutique la mieux adaptée repose sur la grande variabilité des tableaux cliniques qui lui sont associés. Si certains patients présentent un KS indolent, d'autres à l'inverse développent un KS très agressif et disséminé se comportant comme une véritable tumeur (16). L'évolution du KS vers une

aggravation ou une amélioration spontanée est également très dépendante du patient et souvent corrélée avec son statut immunitaire. Les patients dont le KS progresse rapidement doivent être évalués pour les autres tumeurs associées à l'HHV-8 (40).

Les thérapies actuelles dirigées contre le KS ont pour but principal d'empêcher la progression de la maladie, de réduire la tumeur, d'éviter l'atteinte des organes et de soulager le stress psychologique des patients. Selon la forme de KS concernée, les stratégies thérapeutiques vont être différentes. Lorsque le KS est associé à une immunosuppression, la stratégie thérapeutique de première ligne consiste plutôt à reconstituer le système immunitaire. L'administration de chimiothérapies est souvent nécessaire pour traiter les formes sévères de kaposi, notamment les formes associées au VIH lorsque les traitements ciblant le système immunitaire ne sont pas suffisants. Le choix des chimiothérapies dépend du nombre, de la nature et de la distribution des lésions, de la progression de la maladie et de la sévérité des comorbidités (7,16,57).

a) Le rétablissement de l'immunité

Le traitement pilier du KS est de corriger au plus vite et au mieux l'immunodéficience du patient, quand cela est possible. Soit, par la prise de traitements antirétroviraux (cART) chez les patients infectés par le VIH, soit par la réduction ou la modification des traitements immunosuppresseurs chez les patients transplantés. La mise en place des cART comme thérapie standard pour les formes de KS associées au VIH a modifié de façon drastique l'évolution naturelle de la maladie, en permettant la diminution considérable de son incidence, de sa progression, des atteintes viscérales et donc de la mortalité associée (24,57). En revanche, il a pu être observé dans certains cas, une aggravation du KS, consécutivement au démarrage des traitements antirétroviraux, lié au rétablissement du système immunitaire, dans la cadre d'un syndrome inflammatoire de reconstitution immunitaire (IRIS, *Immune reconstitution inflammatory syndrome*) (4,16).

b) Thérapies locales

Des traitements sont effectués localement uniquement pour les lésions isolées et/ou pour les cas peu agressifs, permettant d'éviter les complications qui surviennent généralement avec les thérapies systémiques. Les principaux traitements locaux incluent l'excision chirurgicale, la

cryothérapie, la radiothérapie et l'administration de vinblastine en intra lésionnel. De par son action cytotoxique et anti-angiogénique, les lésions traitées à la vinblastine régressent mais ne se résolvent pas complètement (7,14,57).

c) Thérapies systémiques

Les thérapies antirétrovirales sont généralement combinées, pour les formes les plus avancées et les plus disséminées, avec une monochimiothérapie systémique. La doxorubicine et la daunorubicine représentent les premiers choix de thérapies systémiques. D'autres agents peuvent être également administrés comme la bléomycine, la vinblastine, mais aussi l'adriamycine ou la vincristine. Diverses études ont également confirmé l'efficacité du paclitaxel et du docetaxel dans le traitement des formes de KS résistantes aux chimiothérapies traditionnelles (7,14,40,57). Quelques thérapies de seconde ligne sont possibles en cas d'échec des thérapies de première ligne ou d'interactions médicamenteuses (entre le paclitaxel et le ritonavir par exemple), incluant notamment l'étoposide, le vinorelbine et l'interféron- α (57).

Les patients présentant des formes de KS très disséminées peuvent être amenés à recevoir une thérapie systématique de manière répétée avec des doses cumulées toxiques nécessitant le recours à plusieurs et différentes lignes de traitement. Or, l'administration de chimiothérapies systémiques combinées aux thérapies antirétrovirales, bien qu'elles offrent un réel bénéfice, peuvent présenter, dans certains cas, une réponse clinique limitée et surtout une forte toxicité. A ce jour, on estime que plus de la moitié de ces patients traités ne peut être guérie (24,40).

d) Thérapies antivirales

Les seules thérapies antivirales qui pourraient lutter efficacement contre le virus HHV-8 sont des inhibiteurs de l'ADN polymérase comme le ganciclovir, le cidofovir et le foscarnet. Cependant, de par le faible pourcentage de réplication lytique virale au niveau des lésions de KS, l'efficacité de ces traitements demeure anecdotique (1,4).

e) Nouvelles thérapies associées à la pathogénèse du KS

Grâce aux avancées réalisées ces dernières années sur la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'oncogenèse virale de l'HHV-8, les scientifiques se sont tournés vers la recherche de thérapies plus ciblées et moins toxiques. Bien que certaines molécules aient montré des résultats préliminaires prometteurs au sein de petits essais cliniques, aucune de ces molécules n'a encore été approuvée pour le traitement des patients. Certaines de ces thérapies seront décrites ci-dessous.

L'immunothérapie

L'interféron- α (IFN- α) est une cytokine présentant des effets antiprolifératif et antiviral directs pouvant inhiber l'angiogenèse et moduler les réponses immunitaires de l'hôte (16). L'immunothérapie basée sur l'administration d'interféron- α (à un dosage de 3-5 millions d'unités trois fois par semaine) a montré des réponses encourageantes chez les formes classique et endémique du KS. La tolérance n'étant toutefois pas très bonne, la durée du traitement en est donc limitée (7).

Anti-PD1

Des études récentes ont rapporté des effets cliniques très prometteurs avec l'utilisation des inhibiteurs des points de contrôles immunitaires (*immune checkpoint inhibitors*) tels que les anti-PD1 comme traitement de divers cancers, incluant les cancers viro-induits. En effet, la protéine PD1 (*programmed cell Death protein 1*) présente à la surface des lymphocytes T, est une composante du point de contrôle immunitaire PD-1/PD-L1, et il a été observé que les PD-L1 (*programmed cell death 1 ligand 1*) et PD1 étaient surexprimés dans les tumeurs viro-induites, incluant les lymphomes Hodgkinien associés à l'EBV et les KS associés au VIH. Ainsi, les anti-PD1, en empêchant l'interaction entre PD-1 et PD-L1, permettent de lever l'inactivation du système immunitaire, qui redevient alors compétant pour combattre les cellules tumorales. Des études pilotes sur l'utilisation des anti-PD1 comme traitement du KS ont montré des résultats prometteurs aussi bien chez les patients VIH-positif que VIH-négatif (16,58,59). En revanche, la survenue possible d'une toxicité immunologique lors de leur utilisation nécessite une évaluation prudente de celle-ci lors des essais cliniques (7,14,59).

Molécules anti-angiogéniques

La rapamycine qui agit sur la traduction protéique et la prolifération cellulaire (*via* l'inhibition de la voie PI3K-AKT-mTOR constitutivement activée par le vGPCR) a été étudiée ces dernières années dans le traitement du KS. Si elle montre un effet très bénéfique sur la régression des lésions de KS chez les patients transplantés, celui-ci est moindre chez les patients ayant un KS associé au VIH (4,24,57). D'autres molécules présentent également des propriétés anti-angiogéniques, telles que l'imatinib, un inhibiteur du PDGF (*platelet-derived growth factor*) et des récepteurs c-kit, qui prévient la prolifération cellulaire du KS et l'angiogenèse, ou le bevacizumab, un anticorps monoclonal agissant contre le VEGF (un facteur de croissance angiogénique très exprimé dans les lésions du KS) (4,16,24).

Thérapies antiprolifératives

Le gel alitrétinoïne a été approuvé pour les formes de KS associées au VIH. L'application en topique de ce gel inhiberait la prolifération cellulaire et promouvrait la différenciation cellulaire, ainsi que l'induction *in vitro* de l'apoptose des cellules infectées par l'HHV-8 du KS (16). Le bortezomib, un inhibiteur du protéasome, approuvé par la FDA dans le traitement du myélome multiple et de lymphomes, fait l'objet d'étude chez plusieurs autres types de cancers incluant le KS. Il a en effet pu montrer de par son activité inhibitrice du NF- κ B (*Nuclear factor- κ B*) résultant en l'apoptose des cellules infectées par HHV-8, des résultats très prometteurs *in vitro* et sur modèle animal (16,60).

4.2 Maladie de Castleman multicentrique associée à l'HHV-8

4.2.1 Diagnostic

Le diagnostic de la HHV-8-MCD, généralement associée à une infection par le VIH, nécessite d'effectuer une biopsie des ganglions lymphatiques permettant la visualisation des plasmablastes infectés par le HHV-8. La recherche du génome du virus HHV-8 dans les tissus ou dans le sang périphérique est également effectuée par PCR. L'évolution de la MCD est variable, mais en absence de traitement, le taux de survie est d'environ 2 ans (14,40).

4.2.2 Stratégies thérapeutiques

Il n'existe pas à ce jour de traitements ciblés contre la MCD. Parmi les traitements utilisés, on retrouve les cART pour les formes associées au VIH, qui sont généralement insuffisants. Le traitement par le rituximab, seul ou combiné avec la doxorubicine, montre des réponses cliniques très encourageantes en termes de rémission et de survie des patients. Cependant, certaines études ont observé que l'utilisation du rituximab pouvait aggraver les KS, fréquents chez les patients présentant une MCD. Des chimiothérapies (telles que la vinblastine, les thérapies CHOP [cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine et prednisone] ou ABV [doxorubicine, bleomycine, vincristine], ou des immunothérapies (telles que l'IFN- α) sont également proposées dans le traitement de la HHV-8-MCD. Enfin, un protocole national de diagnostic et de soins (PNDS) a été diffusé par l'HAS en novembre 2019 et préconise l'utilisation du rituximab +/- étoposide en première ligne en l'absence de KS. En cas de KS évolutive associée, il recommande l'utilisation de l'étoposide en première intention suivi d'une association rituximab et doxorubicine liposomale. L'utilisation des anticorps anti-IL-6 et anti-IL-6 R ne sont pas indiqués dans la HHV8-MCD (61) .

4.3 Lymphome primitif des séreuses

4.3.1 Diagnostic

La survenue du PEL étant généralement associée à une infection au VIH, celui-ci doit être envisagé chez tous les patients VIH-positif présentant des épanchements au niveau des séreuses, surtout s'ils présentent un KS et/ou des symptômes inflammatoires caractéristiques d'une MCD ou d'un syndrome KICS. Le diagnostic du PEL repose sur l'examen cytologique des liquides d'épanchement permettant de visualiser l'aspect des cellules tumorales infectées par le HHV-8 (cellules larges d'aspect immunoblastique ou plasmablastique), les marqueurs cytologiques fréquemment retrouvés (CD45, CD30, BC-6, CD38, CD138) et sur la détection du virus HHV-8 dans ces cellules tumorales (14,40).

4.3.2 Stratégies thérapeutiques

A ce jour, il n'existe pas de thérapies standards pour le PEL. Les thérapies utilisées consistent principalement en une combinaison de chimiothérapies cytotoxiques, incluant les thérapies CHOP et EPOCH [infusional cyclophosphamide, doxorubicine, etoposide, vincristine et prednisone], ainsi que la prise en charge de l'infection VIH par trithérapie. Cette stratégie thérapeutique confère un taux de survie chez ces patients d'environ 30% sur 2 ans. Mais le PEL est une tumeur particulièrement agressive, progressant rapidement, et qui présente généralement une résistance à ces différentes chimiothérapies (62). Selon une étude menée par l'équipe de Boulanger *et al.* sur 28 patients ayant un PEL, une réponse complète aux chimiothérapies CHOP n'était observée que pour 10% des patients. La médiane de survie chez ces patients se situe autour de 6 mois, même en présence des chimiothérapies (41,63). Le rituximab, un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine de surface CD20 des lymphocytes B, a récemment montré de très bons résultats cliniques dans les tumeurs lymphoïdes B. Mais, de par l'absence d'expression du marqueur CD20 chez les cellules PEL, l'efficacité du rituximab est bien moindre chez les tumeurs PEL (8,14,40,41).

Etant donné l'efficacité très limitée des stratégies thérapeutiques actuelles sur le PEL, la recherche s'est tournée vers le développement de thérapies ciblant les voies de signalisations cellulaires impliquées dans la pathogénèse de la maladie, telles que les voies du NF- κ B, JAK/STAT et PI3K/AKT. Grand nombre de ces thérapies cible les voies de l'apoptose et/ou le

cycle cellulaire, visant à induire la mort ou à inhiber la prolifération des cellules infectées par l'HHV-8. On retrouve notamment le bortezomib (un inhibiteur du protéasome), la berberine, les IMiDs (médicaments immunomodulateurs) ou encore la metformine (utilisée dans le traitement du diabète de type 2). Ces molécules, encore au stade de recherche pré-clinique, ont pu montrer des effets anti-apoptotique et/ou anti-prolifératif prometteurs *in vitro* et pour certaines *in vivo* sur des modèles animaux. D'autres thérapies en cours d'étude ciblent le métabolisme des cellules tumorales, en cherchant à réduire la glycolyse et ainsi inhiber la prolifération des cellules PEL (41).

Ces nouvelles stratégies thérapeutiques plus ciblées sont encore au stade expérimental, cependant leurs résultats encouragent grandement à poursuivre les recherches d'une thérapie ciblant les mécanismes oncogéniques du virus.

5 L'induction de la mort cellulaire par apoptose : une stratégie anti-tumorale

5.1 Le virus HHV-8 et l'apoptose

5.1.1 *Apoptose et cancer*

Une des avancées majeure dans la recherche sur le cancer ces dernières années a été l'intégration de l'idée selon laquelle la mort cellulaire par apoptose était fondamentalement impliquée dans la régulation de la croissance tumorale mais aussi dans la résistance aux traitements anti-tumoraux. L'apoptose est une mort cellulaire dite « programmée », parfaitement régulée et contrôlée, qui joue un rôle clé dans la croissance physiologique et l'homéostasie des tissus. L'apoptose intervient également comme moyen de défense, lors des réactions immunitaires ou lorsque des cellules deviennent anormales, infectées ou endommagées par des agents nocifs. En éliminant les cellules à risque de transformation tumorale, l'apoptose représente donc un outil majeur de prévention et de protection contre le cancer. Par conséquent, pour que le cancer puisse être initié et proliférer, l'apoptose doit être inhibée par la cellule (64–66).

La plupart des stratégies thérapeutiques contre le cancer utilisées actuellement cible la mort par apoptose de la cellule tumorale. On retrouve parmi elles les chimiothérapies, les γ -irradiations, ou encore l'immunothérapie. Les mécanismes sous-jacents à l'exécution de l'apoptose sous thérapies cytotoxiques sont très variables et dépendent du type de stimulus. Parmi ces mécanismes, on retrouve notamment les voies de signalisation des récepteurs de mort, des facteurs pro- et anti-apoptotiques de la famille des Bcl-2, des MAPK, du NF- κ B, du p53 et surtout des caspases dont l'activité est primordiale à l'exécution de l'apoptose (65,67).

Afin de résister à l'apoptose, les cellules tumorales ont développé de multiples stratégies pour perturber les voies extrinsèques et/ou intrinsèques de l'apoptose. C'est donc sur ces mécanismes que vont agir un grand nombre de thérapies anti-tumorales.

La **voie intrinsèque** de l'apoptose, qui engage la voie mitochondriale, est sans aucun doute le type de mort cellulaire le plus dérégulé dans le cancer. Une des stratégies mise en jeu par la cellule tumorale pour inhiber l'apoptose va consister à empêcher le phénomène de perméabilisation de la membrane mitochondriale, processus indispensable à l'exécution de l'apoptose *via* l'activation des caspases-9 et entièrement régulé par la famille de protéines des

BCL-2, certaines ayant des fonctions pro-apoptotiques et d'autres anti-apoptotiques (66). Cette stratégie passe essentiellement par l'up-régulation des protéines anti-apoptotiques (telles que BCL-2, BCL-xL) ou par la down-régulation des protéines pro-apoptotiques (une sous-famille de la famille des BCL-2 dites « à BH-3 seulement », telles que BID, BIM, PUMA, Noxa). L'autre stratégie majeure impliquée dans l'inhibition de l'apoptose consistera à empêcher l'activation des caspases-9 (64,65,67). Les chimiothérapies les plus conventionnelles, telles que l'étoposide, la doxorubicine, la cisplatine ou le paclitaxel, ciblent cette voie mitochondriale pour induire la mort de la cellule tumorale, en agissant notamment sur l'augmentation de facteurs pro-apoptotiques ou sur l'induction de l'expression du suppresseur de tumeur p53. Le facteur de transcription p53, considéré comme le « gardien du génome », est retrouvé défectueux ou inactivé chez plus de la moitié des cancers humains (67).

Les cellules tumorales procèdent également à la dérégulation de la signalisation pro-apoptotique médiée par les **récepteurs de mort** (tels que les récepteurs Fas/CD95 et le TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) pour échapper à l'apoptose. Cela passe notamment par la réduction ou la déficience d'expression de ces récepteurs de mort, qui se traduit par la baisse des signaux pro-apoptotiques et résulte en la formation de tumeurs résistantes (64). Par exemple, le CD95 est retrouvé muté et/ou down-régulé dans des cellules de neuroblastome ou de leucémie résistantes ainsi que dans des tumeurs de type hématologique. Certaines thérapies anti-tumorales visent à restaurer le système récepteur/ligand du CD95 permettant ainsi la mort de la cellule tumorale. C'est le cas par exemple pour les cellules de carcinome du colon dont la mort serait induite suite au traitement au 5-fluorouracil. De plus, de la même façon que pour la voie mitochondriale, la signalisation pro-apoptotique en réponse à la fixation des ligands aux récepteurs de morts peut être inhibée par une augmentation des protéines anti-apoptotiques ou par une réduction des protéines pro-apoptotiques. On retrouve par exemple la protéine FLIP qui possède la capacité de bloquer de façon indirecte l'activation des caspases-8 (65–67).

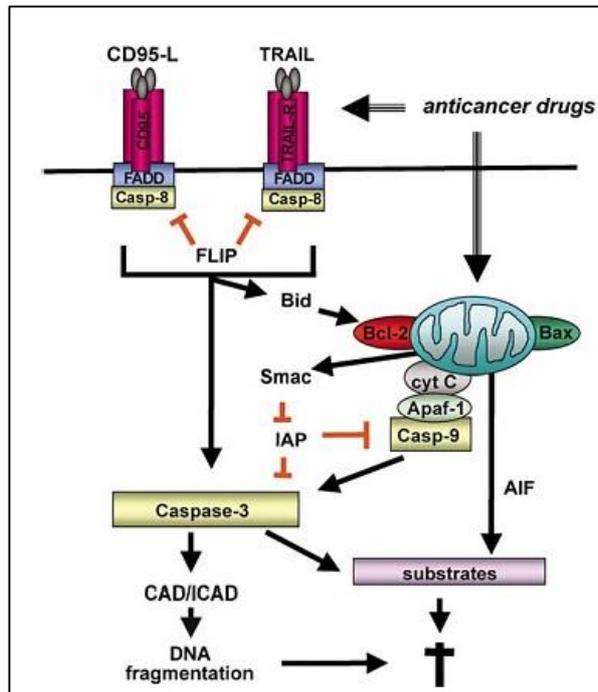


Figure 18. Les voies de l'apoptose comme cible des thérapies anti tumorales. L'apoptose peut être initiée par deux voies principales, que sont la voie des récepteurs de mort ou la voie mitochondriale. C'est au niveau de ces voies apoptotiques que vont agir diverses thérapies anti-tumorales permettant d'induire la mort des cellules tumorales (67).

5.1.2 Le virus HHV-8 et l'inhibition de l'apoptose

La dérégulation du cycle cellulaire et des voies apoptotiques afin de promouvoir la survie cellulaire fait partie des principales caractéristiques de toute cellule tumorale. Il n'est donc pas surprenant que l'HHV-8, un virus oncogène, expriment des protéines virales capables de cibler ces mécanismes de régulation de survie et de prolifération cellulaire. L'étendue et la gamme des gènes de l'HHV-8 consacrés à la manipulation de ces processus sont cependant remarquables (2,68).

	Protein	Gene	Target(s)
Latency	LANA1	ORF73	p53
	LANA2 (vIRF-3)	ORF K10.5	p53
	vFLIP	ORF K13	Fas, NF- κ B
Lytic or induced	RTA	ORF50	p53
	K-bZIP	ORF K8	p53/p300/CBP
	vIRF-1	ORF K9	p53/p300/CBP/ATM
	vBCL-2	ORF 16	BAX?
	VIAP	ORF K7	BAX, BH-3 proteins?

Figure 19. Les principales protéines du virus HHV-8 ciblant les voies de signalisation apoptotiques cellulaires (68).

Comme beaucoup d'autres virus oncogéniques, le virus HHV-8 a la capacité de cibler et d'inhiber directement le suppresseur de tumeur **p53**, aussi bien en phase latente que lytique, par le biais de ses gènes viraux, incluant les gènes LANA, RTA, K-bZIP ou vIRFs, induisant ainsi l'inhibition de l'apoptose et la dérégulation du cycle cellulaire (64,68). La v-Cycline possède également des propriétés apoptotiques et de stimulation de la croissance, en inactivant aussi bien des acteurs clés du cycle cellulaire, tels que le suppresseur de tumeur **pRb** (protéine du rétinoblastome) ou l'inhibiteur du cycle cellulaire p27, que des protéines anti-apoptotiques de la famille des Bcl-2. La perte ou le dysfonctionnement de ces suppresseurs de tumeurs vont bloquer les capacités de la cellule hôte à réparer les dommages à l'ADN, supprimer les voies de mort cellulaire médiées par le p53 et imposer au cycle cellulaire une prolifération incontrôlée, tout ceci contribuant à la pathogénèse induite par le virus HHV-8 (2,11). Le virus HHV-8 code également pour un homologue du Bcl-2 cellulaire, le **v-Bcl-2**, dont les propriétés anti-apoptotiques contribuent largement à la persistance de l'infection et à l'oncogénèse virale.

Enfin, un autre moyen pour le virus HHV-8 d'assurer sa survie et de promouvoir la croissance tumorale est d'activer des facteurs de survie, le plus important étant le facteur de transcription **NF-κB**, une caractéristique qu'il partage avec l'EBV et d'autres virus B-lymphotropes. En effet, comme mentionné précédemment, la voie du NF-κB est constitutivement activée dans les cellules infectées, principalement grâce au gène de latence v-FLIP, conduisant à l'inhibition de protéines pro-apoptotiques *BH-3-only*. L'équipe de Cesarman *et al.* a d'ailleurs démontré l'importance de ce mécanisme pour la survie des cellules PEL, en utilisant des inhibiteurs du NF-κB qui induisait la mort rapide par apoptose de ces cellules. v-FLIP possède également la capacité d'interférer avec la signalisation apoptotique médiée par les récepteurs de mort Fas/TNFR, en empêchant notamment le recrutement ou l'activation des caspases-8. Alors que ses fonctions d'inhibition des caspases ont un avantage évident dans la prévention de la destruction immunitaire de la cellule infectée, la capacité de v-FLIP à activer le NF-κB peut avoir une importance encore plus grande dans la survie de la cellule tumorale infectée (60,64,68,69) (*voir figure 20.*)

Un certain nombre de nouvelles molécules, mentionnées dans la partie « Diagnostic et stratégies thérapeutiques des cancers associés à l'HHV-8 », ciblant les mécanismes impliqués dans la survie et l'apoptose des cellules infectées par l'HHV-8 ont montré des résultats encourageants dans des expérimentations précliniques et dans de petits essais cliniques.

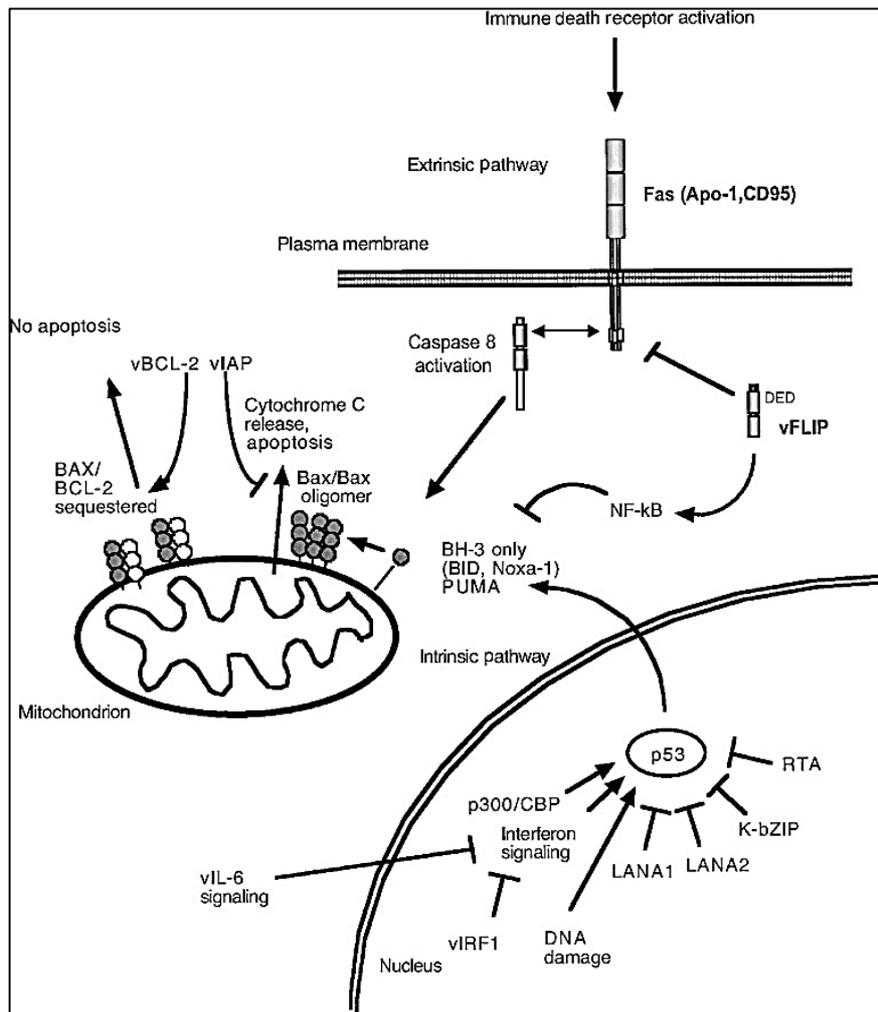


Figure 20. Le virus HHV-8 inhibe les voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose à plusieurs niveaux. La voie extrinsèque de l'apoptose indiquée sur cette figure est activée par la signalisation immunitaire de la cellule (cellules NK, réponses lymphocytaires cytotoxiques) *via* l'activation du récepteur Fas. vFLIP inhibe cette réponse en se liant au DED (*death effector domains* du complexe DISC (*death-inducing signaling complex*)) empêchant ainsi l'activation des caspases-8. Il active également la voie de NF-κB ce qui induit l'inhibition des voies de l'apoptose des lymphocytes B au niveau de la mitochondrie et du réticulum endoplasmique. Les protéines virales vIAP et vBCL-2 agissent au niveau de la mitochondrie et induisent l'inhibition de l'activité pro-apoptotique des protéines *BH3-only*. L'intégrateur transcriptionnel central de la signalisation apoptotique, p53, joue un rôle majeur dans la voie intrinsèque de l'apoptose. Diverses protéines virales de l'HHV-8 incluant LANA, K-bZIP et le RTA inhibent la signalisation apoptotique médié par le p53. La signalisation apoptotique est inhibée par le virus aussi bien en phase de latence qu'en phase lytique (68).

5.2 Le virus HHV-8 et les dérivés oxygénés (ROS)

5.2.1 ROS et cancer

Les ROS (dérivés réactifs de l'oxygène ou *reactive oxygen species*) sont des radicaux, ions ou molécules ayant un seul électron libre dans leur enveloppe d'électron la plus externe. De ce fait ce sont des espèces ultra réactives. Les ROS regroupent les radicaux libres, tels que l' O_2^- (radicaux superoxydes, non hautement toxiques) et l' $OH\cdot$ (Radicaux hydroxylés, hautement toxiques), et les non-radicaux, tels que l' H_2O_2 (hydrogène peroxydé). Chacun ayant des propriétés chimiques et des cibles biologiques qui leur sont propres (70). Une multitude d'agents et de facteurs peuvent induire la production de ROS : les métaux lourds, certains traitements comme les chimiothérapies, les infections virales, les UV, l'exposition à des ROS extracellulaires produits par les cellules inflammatoires et bien d'autres (71).

Les cellules cancéreuses, contrairement aux cellules normales, se caractérisent par des taux particulièrement élevés en ROS. Ces niveaux élevés de ROS vont moduler de multiples voies de signalisations pouvant affecter toutes les caractéristiques impliquées dans la progression tumorale. Parmi ces caractéristiques, on retrouve notamment la stimulation de la prolifération et de la survie cellulaire, l'induction de mutations et d'instabilités génétiques, l'angiogenèse, la formation de métastases mais aussi la résistance à certains traitements anti-tumoraux (70).

Diverses études suggèrent que cette augmentation de la production en ROS dans la cellule cancéreuse est due notamment à des transformations induites par des oncogènes, une augmentation très forte de son activité métabolique, de l'activité de facteurs de croissance et de cytokines, ou encore à des dysfonctionnements au niveau de la mitochondrie (72).

Ce taux élevé de production de ROS est contrebalancé par un taux tout aussi élevé d'antioxydants afin de maintenir l'équilibre redox et d'assurer le fonctionnement et la survie de la cellule tumorale. En effet, afin d'éliminer les ROS produits et de se protéger des effets délétères d'un stress oxydatif, la cellule possède un important système anti-oxydatif. On retrouve des antioxydants non-enzymatiques, tels que le glutathion réduit (GSH), ou les vitamines A, C et E, et des antioxydants enzymatiques, incluant les SODs (Superoxyde dismutases), les catalases, les enzymes du système du glutathion (71).

Mais, si la cellule tumorale ne parvient pas à équilibrer son niveau en ROS, elle s'expose alors à un stress oxydatif pouvant entraîner sa mort (72,73). De nombreuses thérapies et

chimiothérapies anti-tumorales vont profiter de cette augmentation soutenue et persistante du niveau en ROS comme opportunité pour exacerber ce stress oxydatif et ainsi éliminer les cellules cancéreuses (70).

5.2.2 ROS et antioxydants : stratégies thérapeutiques anti-tumorales

Il est reconnu que de nombreuses chimiothérapies augmentent les niveaux de production de ROS chez les patients. Ce niveau de ROS varie selon les agents anti-tumoraux. La doxorubicine par exemple, une des principales anthracycline, est une des chimiothérapies présentant la plus grande efficacité sur divers cancers. Comme la grande majorité des agents anti-tumoraux, elle affecte la synthèse de l'ADN des cellules tumorales, mais induit également des effets secondaires sévères au niveau cardiaque. Il a été montré que la forte production en ROS induite par la doxorubicine contribuait à ces effets secondaires (71,74).

De nombreuses stratégies anti-tumorales, comme les chimiothérapies ou des molécules pro-oxydatives, consistent à augmenter les niveaux intracellulaires en ROS dans le but d'induire des dommages irréparables et ainsi la mort par apoptose de la cellule tumorale. En absence d'un système anti-oxydatif adéquat, les dommages générés par ce stress oxydatif peuvent conduire à l'apoptose de la cellule, notamment *via* l'activation de gènes (les *stress-responsive transcription factors*) et de la voie JNK (aussi connu sous le nom de *stress-activated protein kinases*) (74,75).

Diverses études ont montré que l' H_2O_2 avait la capacité d'activer les caspases. L'exposition de différents types cellulaires à des doses modérées en H_2O_2 conduit à l'apoptose de ces cellules par la production en radicaux $OH\cdot$ et l'altération des voies oxydant/antioxydant. Il a été observé par exemple que les cellules de lymphome de Burkitt étaient très sensibles à un stress oxydatif induit par l' H_2O_2 , et ceci malgré la surexpression de la protéine anti-apoptotique BCL-2 (74).

De nombreuses molécules, étudiées pour leur effet anti-tumoral, partagent la même stratégie d'exacerbation des niveaux en ROS intracellulaires afin d'induire l'apoptose. Parmi elles, on retrouve l'aminoflavone et la pancratistatin testées sur les cellules de cancer du sein, qui induisent une apoptose caspase-dépendante *via* l'augmentation du niveau en ROS (76). Ou encore le Sulindac qui, en augmentant le niveau intracellulaire en ROS, rend ainsi les cellules de cancers du côlon et des poumons plus sensibles à une apoptose induite par l' H_2O_2 (70).

Une autre approche serait au contraire, dans les stades précoces de développement du cancer, l'utilisation d'antioxydants dans le but d'inhiber les voies de signalisation médiées par les ROS, essentielles à la survie et la prolifération de la cellule tumorale. Il a également été observé dans certaines situations, que l'administration de chimiothérapies combinées avec des antioxydants, améliorerait les effets de la chimiothérapie tout en prévenant les effets secondaires induits par les radicaux libres. La dépendance des cellules tumorales à leur système anti-oxydatif les rend particulièrement vulnérables à des agents induisant l'augmentation des ROS ou la déplétion de leurs antioxydants. Les cellules normales ne sont que peu significativement affectées par ces traitements étant donné que leur niveau en ROS basal est beaucoup plus bas. Ces stratégies thérapeutiques sont encore sujettes à débat et doivent être adaptées avec précaution selon le stade et la nature du cancer, mais aussi selon le type et le niveau de ROS, ainsi que des voies de signalisations activées par ces ROS (70) (*voir figure 21.*).

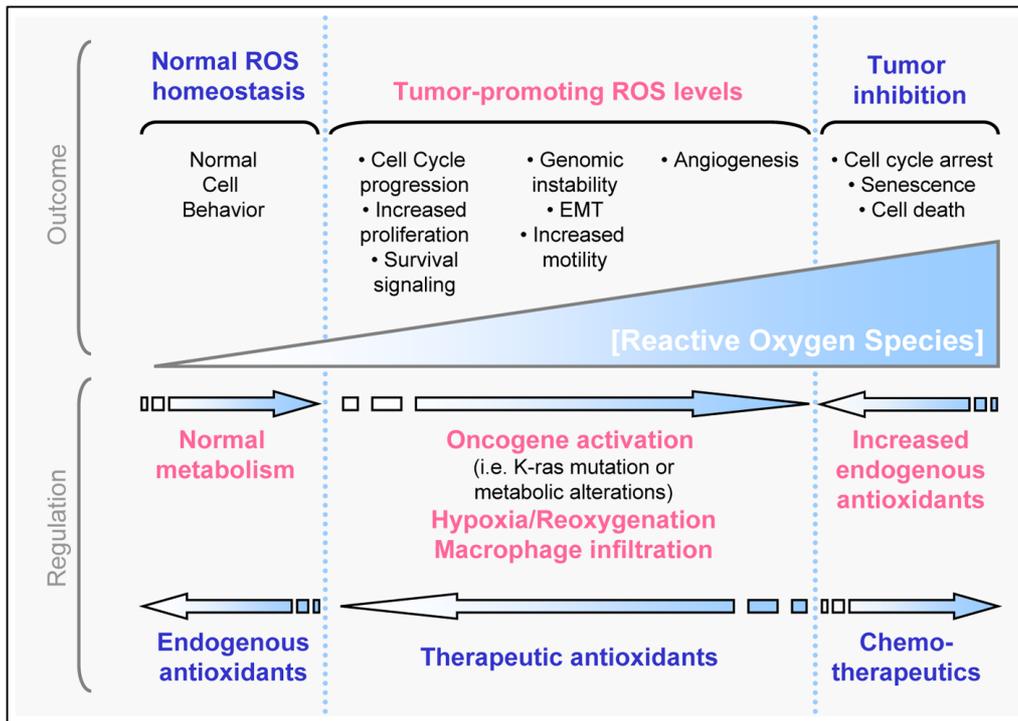


Figure 21. Production, régulation et effets des ROS intracellulaires. Les ROS sont générés dans tous les processus physiologiques de la cellule, et la cellule possède un système anti-oxydatif pour réduire les niveaux intracellulaires de radicaux oxygénés produits. Des évènements de tumorigenèse, incluant l'activation d'oncogène, les altérations du métabolisme, l'infiltration de macrophages, l'hypoxie, peuvent induire l'augmentation des niveaux intracellulaires de ROS et favoriser la formation ou la progression tumorale. Ces niveaux élevés de ROS vont moduler de multiples voies de signalisations pouvant affecter toutes les caractéristiques impliquées dans le développement et la progression tumorale, incluant la stimulation de la prolifération et de la survie cellulaire, l'induction de mutations et d'instabilités génétiques, l'angiogenèse, la formation de métastases mais aussi la résistance à certains traitements anti-tumoraux. Ces évènements oncogéniques impliquant les ROS peuvent être régulés négativement par des thérapies anti-oxydatives. Enfin, l'augmentation excessive de ROS induite par des chimiothérapies peut entraîner l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence ou la mort des cellules tumorales. La cellule tumorale peut éviter ce stress oxydatif nocif en augmentant l'expression de son système anti-oxydatif (70).

5.2.3 HHV-8, ROS et stress oxydatif

L'implication des ROS et du stress oxydatif dans la tumorigenèse des cancers associés aux γ -herpèsvirus a été démontré auparavant. Chez les cellules tumorales du lymphome de Burkitt par exemple, il a été démontré que l'induction de production de ROS par l'EBV jouait un rôle dans le maintien de la latence et par conséquent dans la transformation tumorale de ces cellules (77). Concernant le virus HHV-8, il est bien établi aujourd'hui que les ROS jouent également un rôle dans l'oncogenèse du virus HHV-8 et dans la progression tumorale. En effet, il a été rapporté que les phases précoces de l'infection des cellules endothéliales par l'HHV-8 s'accompagnaient d'une augmentation de l'expression de la vGPCR et de la production en ROS, résultant en une baisse de l'immunité acquise et innée (13). De plus, l'équipe de Q. Ma *et al.* a démontré que la production de ROS induite par la v-GPCR en phase lytique, contribuait à l'oncogenèse de la maladie de Kaposi, en stimulant la prolifération cellulaire et l'angiogenèse. Leurs études montraient en effet que Rac1, un important régulateur de la production de ROS, impliqué dans le développement tumoral et dans le processus d'angiogenèse médié par la vGPCR chez le KS, était surexprimé dans toutes les *spindle cells* des lésions de KS ainsi que dans les tumeurs d'un modèle de souris KS. Ils ont également observé que le prétraitement des cellules infectées de Kaposi par le *N*-acétylcystéine (NAC) inhibait la prolifération, l'angiogenèse, la formation tumorale et l'expression des gènes viraux de l'HHV-8 (13,78–80). Par ailleurs, l'étude de R. Gonnella *et al.* rapportait que les ROS étaient impliquées dans le maintien de la survie *in vitro* des cellules tumorales PEL (81).

En revanche d'un autre côté, l'équipe de Li *et al.* a mis en évidence le fait qu'une forte augmentation en ROS et une déplétion en antioxydant GSH étaient fortement associés à la réactivation virale du virus HHV-8 et/ou à la mort de la cellule PEL *in vitro*. Ils avançaient l'idée selon laquelle les ROS étaient un facteur crucial dans la régulation de l'équilibre entre réactivation virale et mort cellulaire, et suggéraient qu'un faible niveau de ROS induisait une réactivation virale tandis qu'un fort taux de ROS conduisait plutôt à la mort de la cellule PEL (79,82). Plusieurs études *in vitro* de recherche de molécules thérapeutiques candidates contre le PEL ont d'ailleurs démontré l'association d'une induction de la mort par apoptose des cellules PEL à l'augmentation de la production en ROS, suggérant que la génération de ROS puisse être une composante importante de l'activité anti-PEL de ces molécules candidates. Par exemple, les chimiothérapies cisplatine et le trioxyde d'arsenic ou la sulfalazaline, un anti-inflammatoire intestinal, présentaient la capacité d'induire une réactivation virale et la mort par

apoptose des cellules PEL de façon ROS-dépendante. Leur effet cytotoxique était d'ailleurs inhibé en présence de l'antioxydant NAC (79,81,83).

Objectifs de la thèse

Depuis la découverte du virus HHV-8, de nombreuses études ont permis des avancées considérables sur la compréhension de cet agent infectieux, incluant la biologie générale de ce virus, son mode d'infection, son cycle viral, son impact sur les voies de signalisation de la cellule hôte, et surtout les mécanismes oncogéniques impliqués dans la pathogénèse des cancers qui lui sont associés. Les pathologies tumorales associées au virus HHV-8, principalement la maladie de Kaposi (KS), le lymphome primitif des séreuses (PEL) et la maladie de Castleman multicentrique (MCD), fréquemment associées à une infection par le VIH, représentent encore à ce jour un véritable défi clinique, étant donné le peu d'options thérapeutiques disponibles et efficaces pour y faire face. Bien que l'arrivée des traitements antirétroviraux hautement actifs (HAART), combinés à l'utilisation de chimiothérapies, ont permis d'améliorer l'état clinique des patients atteints de ces tumeurs associées à l'HHV-8, leur efficacité reste toujours limitée et aucune de ces thérapies ne sont réellement curatives. De plus, la toxicité relative à ces chimiothérapies systémiques, représente un frein supplémentaire au succès thérapeutique dans la prise en charge de ces pathologies. La compréhension croissante durant ces dernières années du rôle de l'HHV-8 dans la pathogénèse de ces tumeurs a permis, de la même façon qu'avec d'autres cancers, de rechercher de nouvelles stratégies thérapeutiques moins toxiques et plus ciblées, agissant sur les mécanismes intrinsèques à la pathogénicité du virus. Le virus HHV-8, indispensable au développement tumoral, est présent dans toutes les cellules de KS, du PEL ou de la MCD, ce qui fournit une piste thérapeutique de destruction très sélective des cellules tumorales, sans atteinte des populations cellulaires non-infectées. L'établissement d'une infection latente, largement prédominante chez les cellules tumorales infectées, est au cœur du potentiel oncogénique de ce γ -herpèsvirus. La latence représente en effet, une stratégie d'infection permettant au virus, par le biais de ses quelques gènes viraux de latence, d'échapper à la surveillance du système immunitaire, tout en promouvant la prolifération, la survie et la transformation tumorale des cellules infectées. De plus, les profils d'expression génique et les mécanismes associés à la latence sont très similaires quel que soit le type cellulaire infecté, depuis la lignée lymphoïde B retrouvée chez le PEL jusqu'aux cellules endothéliales du KS. C'est pourquoi, les mécanismes oncogéniques du virus à l'état latent, cruciaux pour la survie des cellules infectées, représentent une cible privilégiée et spécifique pour l'éradication des cellules infectées et donc pour le traitement des tumeurs associées au virus HHV-8. Sur la base de cette recherche thérapeutique ciblée dans les cancers associés au virus HHV-8, l'objectif de ce travail est d'identifier *in vitro*, grâce au criblage phénotypique d'environ 3000 composés, une ou plusieurs molécules capables d'induire la mort par apoptose spécifiquement chez des

lignées cellulaires PEL infectées par HHV-8, sans présenter de cytotoxicité sur différents autres types cellulaires. Le deuxième axe de ce projet est d'explorer *in vitro* les mécanismes d'action mis en jeu par la molécule candidate pour exercer son activité cytotoxique spécifiquement sur les cellules infectées par HHV-8. La dernière partie consiste à évaluer l'activité anti-tumorale de la molécule *in vivo*, tout d'abord, dans un modèle de souris PEL, avec comme principaux critères de succès thérapeutique, la régression tumorale, l'amélioration de l'état générale et de la survie, ainsi que l'absence d'effets secondaires, et enfin, au cours d'un essai exploratoire de type *Proof of Concept* chez l'Homme atteint d'une forme sévère de KS.

Résultats

Article

PRIMAQUINE AS A CANDIDATE FOR HHV-8-ASSOCIATED PRIMARY EFFUSION LYMPHOMA AND KAPOSI'S SARCOMA TREATMENT

Adélie Gothland ¹, Valentin Leducq ¹, Philippe Grange ^{2 3}, Ousmane Faye ⁴, Laurianne Beauvais Remigereau ¹, Sophie Sayon ¹, Nathalie Désiré ⁵, Aude Jary ¹, Emmanuel Laplantine ⁶, Almoustapha Issiaka Maiga ^{7 8}, Nicolas Dupin ^{2 3}, Anne-Geneviève Marcelin ¹, Vincent Calvez ¹

(Submitted in the Journal of Experimental Medicine)

Au cours de notre étude, nous avons pu identifier *in vitro*, grâce au criblage phénotypique d'environ 3000 composés, une nouvelle molécule candidate dans le traitement des cancers associés au virus HHV-8. Il s'agit de l'antipaludéen primaquine diphosphate, capable d'entraîner en 48h, la mort spécifique de plus de 95% des cellules de la lignée PEL infectée par le virus HHV-8, au moyen d'une apoptose caspase-dépendante.

L'étude *in vitro* des mécanismes d'action mis en jeu par la primaquine, réalisée sur une lignée cellulaire PEL infectée par le virus HHV-8 (BC-3), a permis de mettre en évidence l'importante implication du stress oxydatif dans le processus apoptotique induit par la primaquine. En effet, nous avons pu montrer l'augmentation du niveau de ROS et la diminution en antioxydant GSH après 24h de traitement des cellules PEL par la primaquine. D'autre part, nous avons pu démontrer que le prétraitement des cellules par l'antioxydant NAC permettait de réduire de façon drastique l'effet cytotoxique et pro-apoptotique de la primaquine.

De plus, grâce à des études transcriptomiques en *RNA-Sequencing* et RT-qPCR, nous avons pu démontrer l'induction d'acteurs impliqués dans les mécanismes pro-apoptotiques de l'UPR (*Unfolded protein response*), liés à un stress sévère et/ou persistant du réticulum endoplasmique, dans les cellules PEL traitées par la primaquine. Ces acteurs incluaient le facteur de transcription CHOP, indispensable à l'initiation des voies pro-apoptotiques de l'UPR, ainsi que les gènes ATF3 et CHAC1, qui font partie de la cascade signalétique de CHOP. Nous avons également pu mettre en évidence l'activation des caspases-4, dont l'intervention directe dans l'activation des caspases-9 de la voie intrinsèque de l'apoptose lors d'un stress sévère du réticulum endoplasmique a été évoquée dans diverses études.

Par ailleurs, nous avons évalué l'effet de la primaquine sur la production virale dans les cellules PEL en culture et avons observé que celle-ci n'induisait aucune augmentation de l'expression des gènes viraux lytiques ni de la production virale après 24h de traitement. Néanmoins, après 48h de traitement, une augmentation de la production de virions dans le surnageant des cultures cellulaires a été mise en évidence. L'induction de l'apoptose et de la mort cellulaire étant déjà largement enclenchée à 24h, nous avons pu en conclure que l'effet cytotoxique de la primaquine sur les cellules PEL était indépendant d'une réactivation virale lytique. Cette augmentation de virions extracellulaires serait plutôt une conséquence du stress et de la forte mortalité induits par la primaquine sur les cellules infectées par l'HHV-8.

Enfin, des études *in vivo* ont permis de montrer une efficacité anti-tumorale très encourageante de la primaquine d'une part, au cours de deux expérimentations animales sur un modèle de souris PEL, parvenant à une réduction de la croissance tumorale et à une amélioration de l'état général et de la survie chez les souris traitées et d'autre part, au cours d'une étude pilote chez des patients présentant une forme sévère de la maladie de Kaposi, montrant une réduction, voir une disparition totale, des lésions de kaposi et des lymphœdèmes chez certains patients. Aucune toxicité ni effets secondaires n'ont été observés lors du traitement par la primaquine.

Ces études préclinique et clinique nous ont donc permis de considérer la primaquine comme un nouveau candidat très prometteur pour le traitement d'au moins deux pathologies associées au virus HHV-8, la maladie de Kaposi et le lymphome primitif des séreuses, et encouragent à poursuivre les investigations quant aux mécanismes d'actions de la primaquine.

PRIMAQUINE AS A CANDIDATE FOR HHV-8-ASSOCIATED PRIMARY EFFUSION LYMPHOMA AND KAPOSÍ'S SARCOMA TREATMENT

(Submitted in the Journal of Experimental Medicine)

AUTHORS

Adélie Gothland¹, Valentin Leducq¹, Philippe Grange^{2,3}, Ousmane Faye⁴, Laurianne Beauvais Remigereau¹, Sophie Sayon¹, Nathalie Désiré⁵, Aude Jary¹, Emmanuel Laplantine⁶, Almoustapha Issiaka Maiga^{7,8}, Nicolas Dupin^{2,3}, Anne-Geneviève Marcelin¹, Vincent Calvez¹

AFFILIATIONS

¹ Sorbonne Université, INSERM, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique (iPLESP), AP-HP, Hôpital Pitié Salpêtrière, Service de Virologie, Paris, France

² Université de Paris, Institut Cochin, Cutaneous Biology Lab, INSERM U1016, UMR8104, 24 rue du Faubourg St Jacques, 75014, Paris, France.

³ Service de Dermatologie, CeGGID et CNR IST bactériennes, Hôpital Cochin site Port Royale, AP-HP, Groupe Hospitalier Paris Centre Cochin-Hôtel Dieu-Broca, 123 boulevard de Port Royal, 75014, Paris, France.

⁴ Département de Dermatologie, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université de Bamako, Mali

⁵ Sorbonne Université, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique, INSERM, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, 75012 Paris, France.

⁶ Center for Immunology and Microbial Infections – CIMI-Paris, Sorbonne University, INSERM, CNRS

⁷ Unité d'Epidémiologie Moléculaire de la Résistance du VIH aux ARV, SEREFO, FMOS, University of Sciences, Techniques and Technologies of Bamako, Bamako, Mali.

⁸ Clinical and Microbiology Laboratory, University Hospital Gabriel Toure, Bamako, Mali.

ABSTRACT

Human Herpesvirus 8 (HHV-8) is associated with three main severe orphan malignancies, Kaposi's sarcoma (KS), multicentric Castleman's disease (MCD) and primary effusion lymphoma (PEL), which presented few therapeutic options. We identified the antimalarial primaquine diphosphate (PQ) as a promising therapeutic candidate for HHV-8-associated PEL and KS. PQ strongly reduced cell viability through caspase-dependent apoptosis specifically in HHV-8-infected PEL cells. Moreover, ROS- and ER stress-mediated apoptosis signaling pathways have been found to be part of the cytotoxic effect of PQ. Finally, PQ treatment had a clinical positive effect on tumor growth in a *in vivo* NOD/SCID xenograft PEL mouse model, as well as in a pilot clinical study in human harboring very severe Kaposi's sarcoma.

ABSTRACT (ONLINE)

The primaquine diphosphate is introduced as a promising therapeutic candidate for HHV-8-associated diseases, by inducing specific cytotoxicity *in vitro* through ROS- and ER stress-mediated apoptosis. PQ presented promising anti-tumor effect in *in vivo* PEL mouse model and in KS patients within a pilot clinical study.

KEYWORDS

Human herpesvirus 8; Kaposi's sarcoma; primary effusion lymphoma; primaquine diphosphate; oxidative stress; apoptosis

INTRODUCTION

The oncogenic Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV, also known as Human herpesvirus 8, HHV-8) is a principal causative agent of several human cancers including Kaposi's sarcoma (KS), multicentric Castleman's disease (MCD) and primary effusion lymphoma (PEL). These HHV-8-associated diseases, all classified as orphan diseases, represent important and difficult to treat clinical problem, with very few therapeutic options. These diseases are frequently associated with HIV infection but also with different other immune deficiencies-associated diseases and/or treatment. Although the success of combination antiretroviral therapy (cART) has improved outcomes of HIV-infected patients, its benefits is very limited in patients with PEL and MCD, and KS remains the most commonly malignancy in HIV-infected individuals (Kaplan, 2013; Shimada et al., 2018). The use of combination cytotoxic chemotherapies represents standard approach for PEL and systemic KS (Goncalves et al., 2017). However, the toxicity of systemic chemotherapy synergizes with those caused by antiretroviral therapy or immune suppression, and availability of other efficient agents, further limiting treatment efficacy (Cesarman et al., 2019; Dai et al., 2014). Effective and less toxic approaches, which target either HHV-8 virus itself, infected cells or key cellular pathways, are thus an unmet medical need. Given the low level of virus lytic infection in patients with PEL and KS, the expectation of success with antiviral anti-herpesvirus therapy is low (Kaplan, 2013). Indeed, HHV-8, as the others herpesvirus, has developed many mechanisms to establish persistent latent infection which remains predominant in most infected cells (Yan et al., 2019). Latency is a strategy for HHV-8 to hinder destruction of HHV-8-infected tumor cells by facilitating host immune evasion and promoting tumor cell survival and proliferation through the expression of a limited number of oncogenic latent genes (Cancian et al., 2013; Purushothaman et al., 2016). Importantly, the HHV-8 transcription pattern and the

survival mechanisms associated with viral latency are very similar in different infected cell types, from primary latent infection of endothelial cells to long-term latency of lymphoma cells (Bruce et al., 2017). Hence, the molecular signaling pathways involved in the survival of infected cell represent a major target for the eradication of HHV-8-infected cells and ultimately for the cure of the typical malignancies associated with HHV-8. In the present study, we identified the primaquine diphosphate (PQ) as a new very promising targeted therapeutic drug, inducing cell death through apoptosis specifically in HHV-8-infected PEL cells *in vitro* model. We showed that PQ present clinical anti-tumor efficacy in a *in vivo* NOD/SCID PEL mice model and also in human harboring severe KS.

RESULTS

Identification of a new drug specifically active on PEL cells using phenotypic screening assay.

In order to identify new candidate molecule lead for HHV-8-associated diseases, the Prestwick chemical compounds library was examined by quantification of cell viability and apoptosis in a *in vitro* PEL (BC-3) cell line-based model. The antimalarial primaquine diphosphate (PQ) was selected, based on its ability to induce cytotoxicity in more than 95% of BC-3 cells after 48 h of treatment and through apoptosis by an increase of >4-fold induction of caspase-3 and -7 activity after 24h treatment at 10 μ M. To confirm the selectivity of PQ treatment to HHV-8-positive PEL cell lines, we tested BCP-1 HHV-8-infected PEL cell line, as well as several HHV-8-uninfected cells. We have shown that 10 μ M PQ remarkably decreased the cell viability of the PEL cell lines, BC-3 and BCP-1. In contrast, at this concentration PQ treatment did not affect HHV-8-uninfected cells viability (< 10% of cell mortality), including the Burkitt's lymphoma DG-75 cell line. In parallel, the chemotherapy doxorubicin widely used for the treatment of KS and PEL was used as positive control of cell cytotoxicity. It is important to emphasize that, compared to PQ, doxorubicin induced a strong non-specific cytotoxicity independently of the cell type (*Fig. 1*). The CC₅₀ values of PQ in different cells are shown in [Table 1](#) and are very low (average 5.1 \pm 0.2 μ M) in the HHV-8 infected cells while they are up to 65 times higher in the HHV-8-uninfected cells. Moreover, the cytotoxicity of PQ on BC-3 cells was also investigated and confirmed with a trypan blue exclusion assay and shown a decrease of cell viability by 73% and 96% at 10 and 20 μ M respectively, after 48 h of treatment. Also, it appears that PQ-induced cytotoxicity is dose-dependent and begun after 24 h of treatment (*supplemental Fig. S1*).

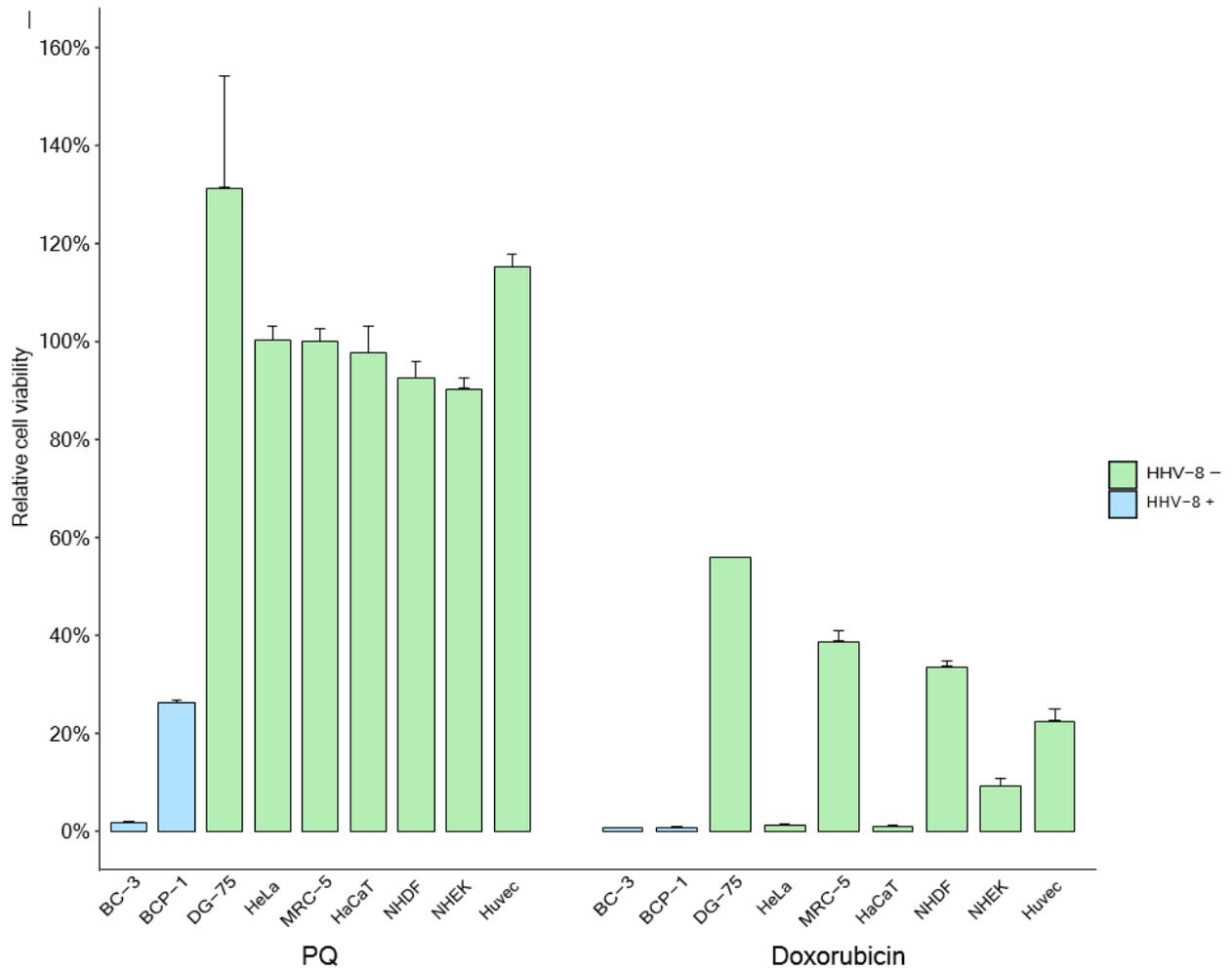


Figure 1. Specific cytotoxic effects of PQ treatment on PEL cell lines. HHV-8-infected PEL cell lines (BC-3, BCP-1) and multiple HHV-8-uninfected cells (DG-75, HeLa, MCR-5 and HaCaT cell lines and primary NHDF, NHEK and HUVEC cells) were incubated with 10 μ M of PQ or doxorubicin (as control) for 48h. Cell viability was assessed by CellTiter Glo 2.0 assay of at least duplicate cultures, expressed as mean relative to their respective untreated control cells. Error bars represent the S.E.M for at least two independent experiments.

Cell line	BC-3	BCP-1	DG-75	HaCaT	HeLa P4	MRC-5	NHDF	NHEK	HUVEC
PQ (μ M)	4,93	5,33	80,51	47,37	90,2	89,02	98,05	40,74	331,1

Table 1. The CC50 values of PQ in HHV-8-infected and HHV-8-uninfected cells. CC50, cytotoxic concentration that reduces cell viability by 50% after 48h of PQ treatment. The CC50 values were calculated using GraphPad Prism 6.0.

To confirm the specific apoptotic-induced mechanism of PQ on PEL cells, we assessed caspase-3/-7 activity on BCP-1 and DG-75 cell lines, and shown that PQ increased the caspase-3/-7 activity in HHV-8-infected BCP-1 and BC-3 cell lines, but not in HHV-8-uninfected DG-75 cell line after 24 h of treatment (*Fig. 2a*). Further analysis of PQ-induced apoptosis shown that 24 h PQ treatment resulted in activation of caspase-8 and caspase-9 in the BC-3 cell line (*Fig. 2b*). Thus, we identified the antimalarial drug PQ as a potent specific cytotoxicity inducer in HHV-8-infected PEL cells through the activation of both the intrinsic and extrinsic caspase-associated apoptotic pathways.

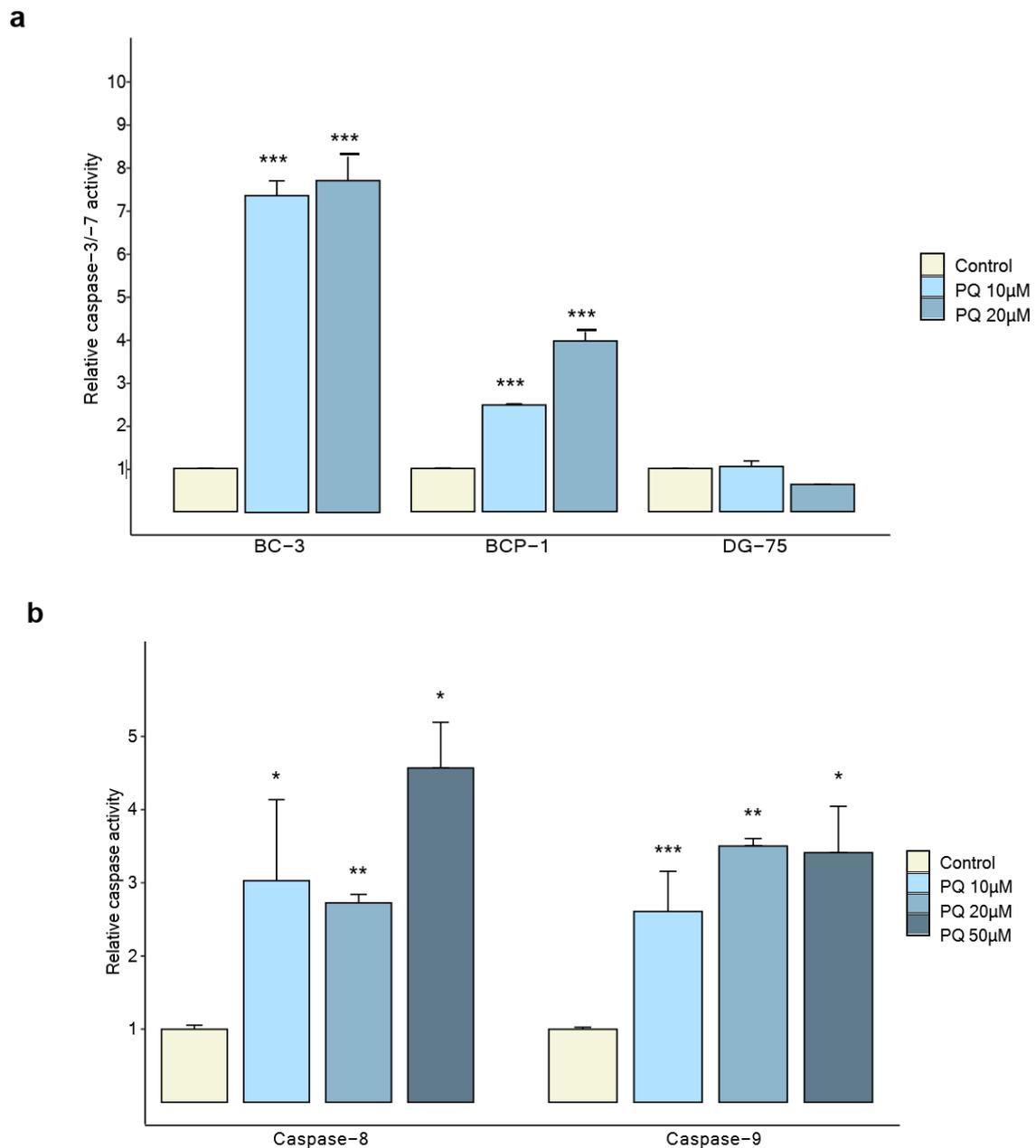


Figure 2. PQ induced caspase-dependent apoptosis in PEL cell lines. (a) Specific activation of the executioner caspase-3 and -7 in PQ-treated HHV-8-infected PEL cells. PEL cells (BC-3 and BCP-1) and HHV-8-uninfected Burkitt's lymphoma cells (DG-75) were treated with PQ (10 and 20µM) for 24h, followed by measurement of active caspase-3/-7 using the caspase-Glo -3/-7 luminescent assay. Values are expressed as mean normalized to their respective untreated control cells. Error bars represent the S.E.M of triplicates for at least 3 independent experiments. ***, $P < 0.001$ vs untreated control (Welch's t-test). **(b) Activation of both caspase-8 and -9 in PEL cells.** BC-3 cells were incubated with increasing concentrations of PQ (0, 10, 20 and 50µM) for 24h, and caspase-8 and -9 activity was assessed using caspase-Glo-8 or -9 luminescent assays respectively. Values are expressed as mean normalized to the untreated control cells. Error bars represent the S.E.M of triplicates. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ vs untreated control (Wilcoxon Mann-Whitney's test).

PQ treatment induces oxidative stress-mediated apoptosis in PEL cells.

It has been previously shown that cell death in PEL cells could be linked to oxidative stress through H₂O₂ production, which was prevented with pre-treatment with the antioxidant *N*-acetylcysteine (NAC) (Li et al., 2011). We found that PQ treatment in BC-3 cells induced the production of H₂O₂ at 24 h, in a dose-dependent manner. In addition, we observed at 24 h a progressive depletion of GSH levels, as levels of H₂O₂ and doses of PQ increased. Importantly, when pre-treating BC-3 cells with the antioxidant NAC, we were able to abolish the PQ-induced H₂O₂ production to levels lower than that observed in untreated cells, but fail to restore the GSH levels (*Fig. 3a,b*).

We then sought to determine whether oxidative stress was related to the cytotoxicity and apoptosis activities induced by PQ. We found that NAC pre-treatment was able to restore PQ-treated BC-3 cell viability as well as to prevent the increase of caspase-3 and -7 activity induced by PQ (*Fig. 3c,d*). These results strongly suggest that the ability of PQ to induce cytotoxicity in PEL cell line is mediated in part by an increase on ROS production leading to apoptosis through the activation of the caspases pathway. Therefore, the oxidative stress appears to be a major process in the PQ mechanism of action on PEL cells.

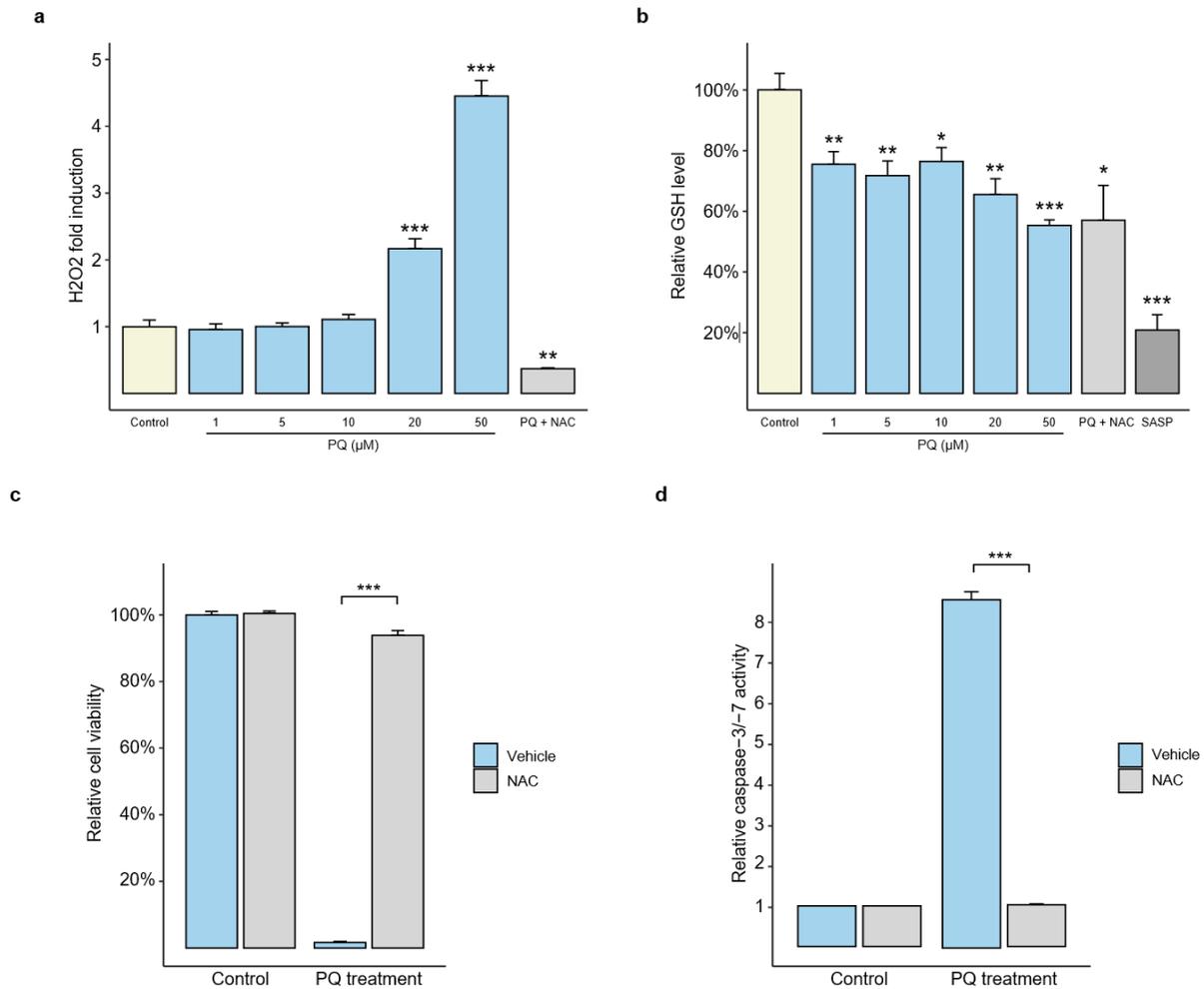


Figure 3. PQ induced cytotoxicity and apoptosis through ROS-dependent manner in PEL cell line. (a, b) PQ treatment induced oxidative stress in PEL cell line. BC-3 cells were incubated with increasing concentrations of PQ (1, 5, 10, 20 and 50 μM) for 24h, then H₂O₂ and GSH were quantified using H₂-DCFDA and Monochlorobimane respectively, and spectrofluorimetry. Some cells were pre-treated with 3mM anti-oxidant *N*-acetylcysteine (NAC) for 12h before incubation with 10 μM PQ. 0,25mM Sulfasalazine (SASP) as a reducer of intracellular GSH levels was used as a positive control. The GSH and H₂O₂ levels of untreated cells was defined as 100% (control) and as 1.0 (control), respectively. Values are expressed as mean normalized to H₂O₂ and GSH levels for the untreated control cells, respectively. Error bars represent the S.E.M of at least triplicates. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ vs untreated control (Welch's t-test). **(c, d) The protective effect of anti-oxidant NAC on cytotoxic and apoptotic effects of PQ.** BC-3 cells were pre-treated with (NAC) or without (vehicle) 3mM NAC for 12h before treatment with 10 μM PQ. Cell viability was assessed after 48h of PQ treatment. The viability of PQ-untreated cells was defined as 100% (control). Caspase-3/-7 activity was evaluated after 24h of PQ treatment. The caspase activity in PQ-untreated cells was defined as 1.0 relative light unit (control). Values are expressed as mean relative to the control. Error bars represent the S.E.M of triplicate cultures for three independent experiments. ***, $P < 0.001$ vs PQ-treated vehicle group (Welch's t-test).

Early PQ-induced apoptosis in PEL cells is not associated with extracellular HHV-8 virion production.

It has been previously reported that oxidative stress may induce latent HHV-8 reactivation or cell death in PEL cells *in vitro* (Dai et al., 2014; Li et al., 2011). Since we have found that PQ treatment caused oxidative stress-mediated cell death, we sought to evaluate HHV-8 production in PQ-treated BC-3 cells.

BC-3 cells were treated with PQ for 12 h, 24 h and 48 h and HHV-8 production in the supernatant was estimated by qPCR for the ORF-73 (*LANA*) gene. Sulfalazaline (SASP) which has been found to induce PEL apoptosis through oxidative stress and viral lytic gene expression and HHV-8 virion production, was used as positive control in our experiments (Dai et al., 2015). Compared to untreated BC-3 cell supernatant, no virion production occurred after 12 h and 24 h PQ treatment. However, after 48 h PQ treatment, the HHV-8 virion production increased in the BC-3 cell supernatant (*Fig. 4*). In comparison, treatment of BC-3 cells with SASP increased virion production as soon as 24 h, while PQ did not. Moreover, it should be noted that at 24 h of PQ treatment, BC-3 cell viability has already decreased by 50% (*supplemental Fig. S1*) and caspases activity was increased (*Fig. 2a and b*). Therefore, these data strongly suggest that induction of cell death by PQ occurred independently of viral lytic replication, but also that persistence of PQ treatment and increasing oxidative stress could lead to a transient increase of HHV-8 virion production.

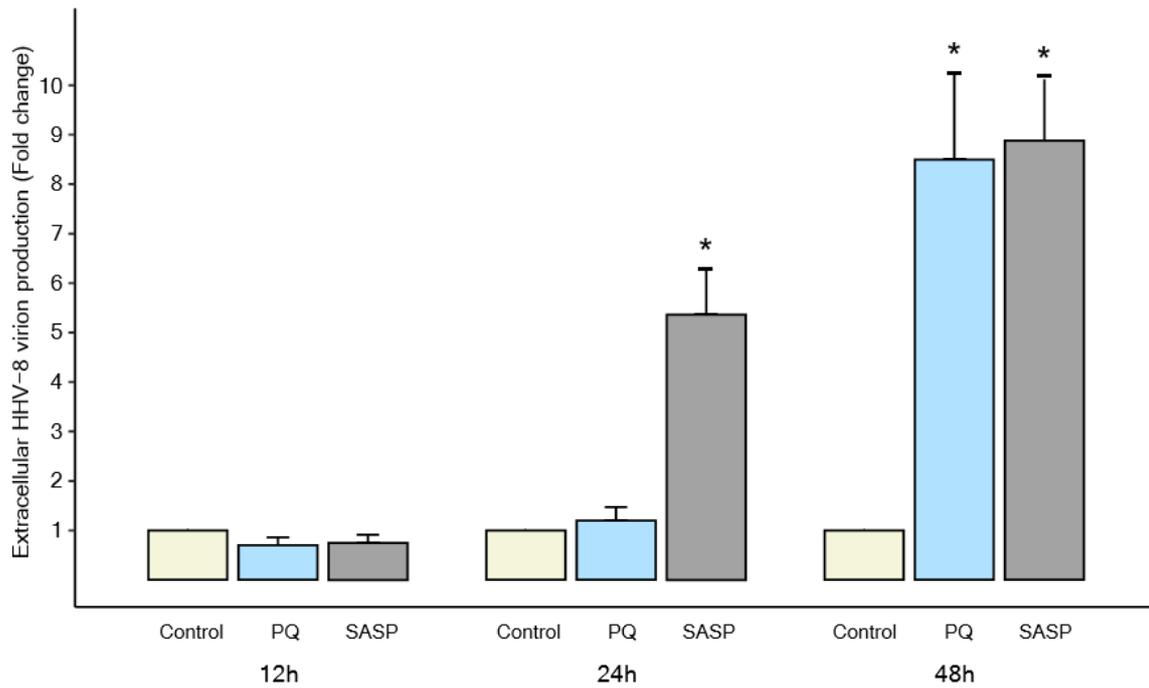


Figure 4. Extracellular HHV-8 virion production from PEL cells occurred after apoptosis induction by PQ. BC-3 cells were treated by PQ (10 μ M) or SASP (0,25mM as positive control) for 12h, 24h or 48h, then extracellular HHV-8 virion were collected in the supernatant as described in *Material and Methods*. HHV-8 latency *LANA* DNA from each group was quantified by qPCR. The values of untreated control cells are defined as 1.0. Data are expressed as mean relative to their respective control at each individual time point (Fold change). Error bars represent the S.E.M of triplicates for at least 2 independent experiments. *, $P < 0.05$ vs untreated control (Wilcoxon Mann-Whitney's test).

Four cellular genes involved in apoptotic process are up-regulated during PQ treatment of HHV-8-infected cells.

In order to determine the genes and pathways involved in the PQ-induced apoptosis in HHV-8-infected cells, we carried out RNA-Sequencing analysis to assess the variations in the transcriptional profiles of both cellular and viral genes following 12 h of PQ treatment.

Using RNA sequencing analysis, we showed that four cellular transcripts were up-regulated after PQ treatment and corresponded to *OSGIN1* (oxidative stress-induced growth inhibitor 1), *ATF3* (activating transcription factor 3), *CHAC1* (cation transport regulator-like 1), and *CCL3* (MIP-1- α macrophage inflammatory protein1- α) genes (*Fig. 5a and Table 2*). Importantly, RNA-Seq analysis also revealed that PQ did not reduce the transcriptional expression of the HHV-8 latent genes, *v-cyclin*, *LANA* and *v-FLIP*, or increase the transcriptional expression of the lytic genes, such as *Rta* (*Table 2*). These results indicate that PQ has no direct effect on viral gene expression after 12 h of treatment.

Overall, pathway enrichment analysis showed that only “programmed cell death” and “apoptosis” as cellular biological functions were affected within PQ-treated BC-3 cells (*Supplemental Fig. S2*).

We then assessed these four genes *CHAC1*, *OSGIN1*, *ATF3* and *CCL3* for validation of their transcriptional change by qRT-PCR. Our results confirmed the up-regulation of these genes after 12 h PQ treatment, and showed that 24 h of 20 μ M PQ treatment was able to increase the *OSGIN1*, *CCL3*, *CHAC1* and *ATF3* expressions by 3.5-fold, 4.9-fold, 8-fold and 17.3-fold respectively, when compared with untreated cells (*Fig. 5b*).

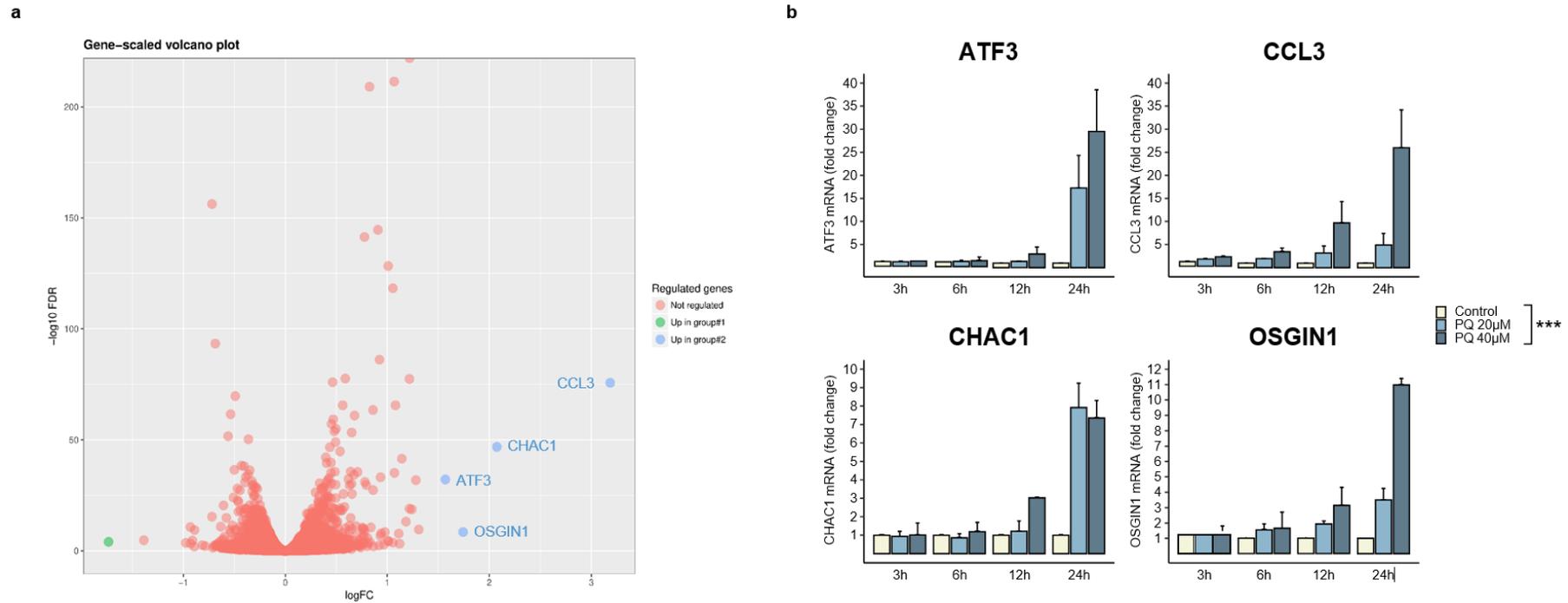


Figure 5. Four main cellular candidate genes are up-regulated by PQ treatment in PEL cell line. (a) RNA-seq analysis of cellular genes differentially expressed between PQ-treated and untreated BC-3 cells. RNA-seq was performed on the triplicate PQ-treated or untreated BC-3 cell line, and differentially expressed cellular genes were detected within PQ-treated BC-3 cells when compared with untreated control. The cut-off values selected for the analysis of the data were: p-value threshold, 0.05; log2foldchange threshold, 1.5, count per million (CPM) threshold, 1. **(b) Relative expression of the four main candidate genes by qRT-PCR.** BC-3 cells were incubated for 3h-24h with PQ (20µM and 40µM). Total RNA was extracted, and *OSGIN1*, *ATF3*, *CHAC1* and *CCL3* mRNA expression were determined by qRT-PCR and normalized to β -actin in triplicate samples. The values of the untreated control are defined as 1.0. Data are expressed as mean relative to their respective untreated control at each individual time point (Fold change). Error bars represent the SD for two independent experiments. ***, $P < 0.001$ vs untreated control (two-way ANOVA).

Gene	Type	logFC	Status in PQ-treated group
ATF3	Cellular	1,57	Up-regulated
CCL3	Cellular	3,18	Up-regulated
CHAC1	Cellular	2,07	Up-regulated
OSGIN1	Cellular	1,74	Up-regulated
v-FLIP	Viral (latent)	-0,15	Not regulated
v-Cyclin	Viral (latent)	-0,2	Not regulated
LANA	Viral (latent)	0,22	Not regulated
RTA	Viral (lytic)	0,1	Not regulated

Table 2. RNA-seq analysis of the main differentially modulated cellular and viral genes from PQ-treated BC-3 cells. RNA-seq analysis of transcriptional expression regulation of the four main cellular genes, *ATF3*, *CCL3*, *CHAC1*, and *OSGIN1*, and of the three main latent viral genes, *LANA*, *v-FLIP* and *v-cyclin* and the main lytic viral gene *Rta* in PQ-treated BC-3 cells, compared to untreated control. Their type, log of Fold Change and status of regulation in PQ-treated group compared to untreated control group are shown. *ATF3*, activating transcription factor; *CCL3*, *MIP-1- α* , macrophage inflammatory protein1- α ; *CHAC1*, cation transport regulator-like 1; *OSGIN1*, oxidative stress-induced growth inhibitor 1; *v-FLIP*, viral Fas-associated protein with death domain-like interleukin-1 β -converting enzyme/caspase-8-inhibitory protein; *v-Cyclin*, viral cyclin; *LANA*, Latency-Associated Nuclear Antigen; *RTA*, Replication and transcription activator.

PQ treatment induces ER stress-mediated apoptosis through transcriptional expression of *CHOP* and activation of caspase-4.

Environmental and genetic factors that disrupt endoplasmic reticulum (ER) function may cause an accumulation of misfolded and unfolded proteins in the ER lumen, a condition termed ER stress. ER stress activates a signaling network called the Unfolded Protein Response (UPR), which causes a decrease in protein synthesis while prevents the aggregation of unfolded proteins, to alleviate this stress and restore ER homeostasis, promoting cell survival and adaptation (Mahdi et al., 2016; Merlot et al., 2016; Osowski and Urano, 2011). However, under persistent and/or irremediable ER stress, the UPR signaling pathway switch from pro-survival to pro-apoptotic. ER stress-mediated apoptosis is regulated, in part, by the transcriptional induction of C/EBP homologous protein (*CHOP*: also named growth arrest and DNA-damage-inducible 153, *GADD153*), and the activation of caspase-4 (an ER outer membrane-localized caspases only activated by ER-stress) (Oyadomari and Mori, 2004; Shigemi et al., 2017; Urrea et al., 2013).

We have previously shown that PQ treatment induced transcriptional up-regulation of *CHAC1* and *ATF3*, two genes known to be important components of the pro-apoptotic programs following UPR activation. We then investigated the effects of PQ on the pro-apoptotic *CHOP* expression and shown that it was up-regulated by 5.1-fold and 5.4-fold in BC-3 cells after 16 h and 24 h of PQ treatment respectively. We used in parallel the ER-stress inducer thapsigargin (Tg) as positive control and shown up-regulation of its expression as well. However, it is interesting to note that DG-75 cells showed no increase of *CHOP* expression under PQ-treatment, indicating a specific effect of PQ on pro-apoptotic ER stress-inducible *CHOP* expression in HHV-8-infected cells (*Fig. 6a*).

Moreover, after 24 h and 30 h of PQ treatment, we shown an increase of 2.4-fold and 7-fold of caspase-4 activity in BC-3 cells, respectively. These results were similarly to those obtained in Tg-treated BC-3 cells (*Fig. 6b*).

All together, these results suggested ER stress-mediated apoptosis and pro-apoptotic UPR signaling, to be part of the specific apoptotic effects induced by PQ in PEL cells.

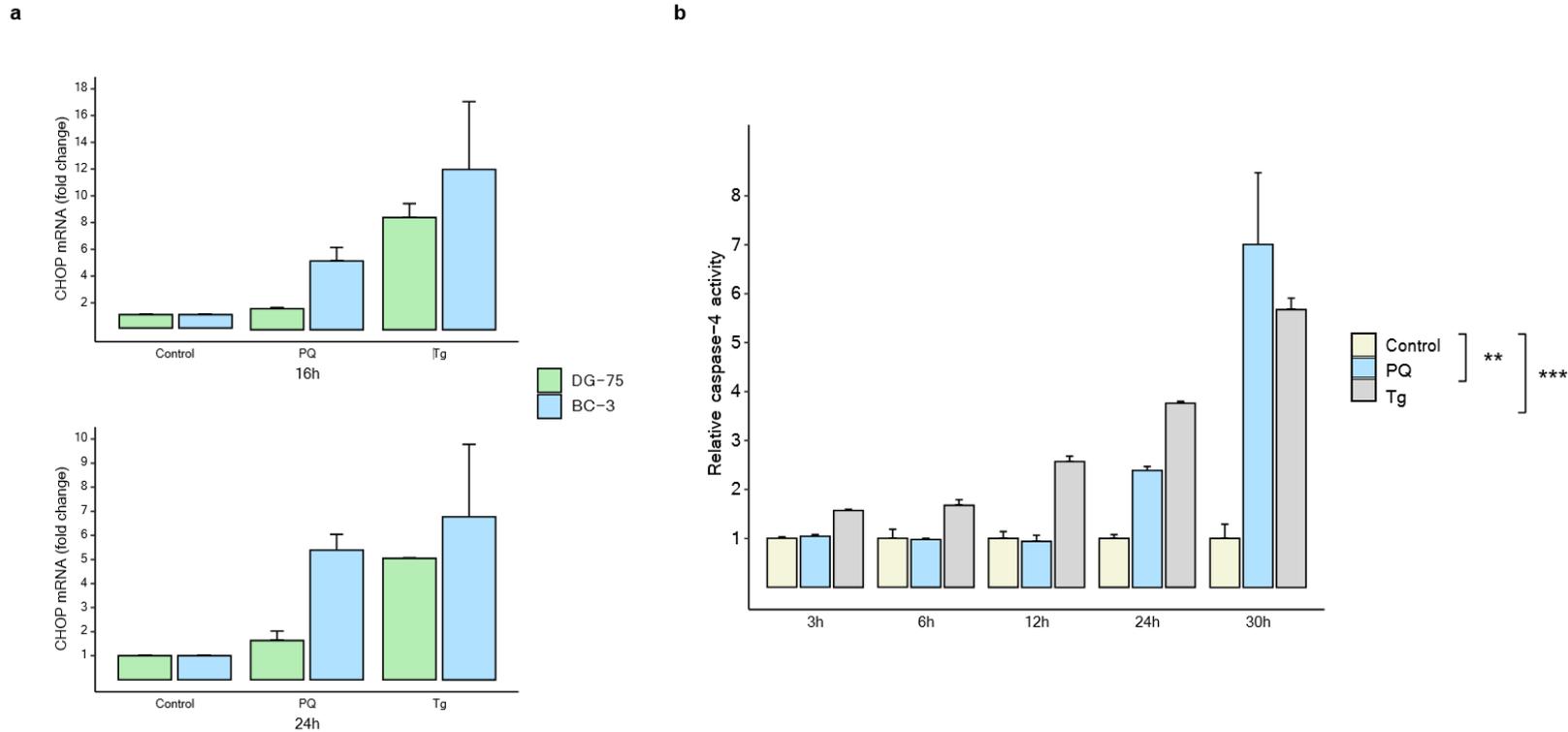


Figure 6. PQ treatment induced ER stress-mediated apoptosis in PEL cells. (a) Increase of CHOP mRNA level in 16h and 24h PQ treated-BC-3 but not in DG-75 cell lines. HHV-8-infected BC-3 cell line and HHV-8-uninfected DG-75 cell line were treated with PQ (20 μ M) or Tg (3 μ M as positive control) for 3-24 hours. *CHOP* mRNA expression was determined by qRT-PCR and normalized to β -actin in triplicate samples. The values of the untreated control are defined as 1.0. Data are expressed as mean relative to their respective untreated control at each individual time point (Fold change). Error bars represent the S.E.M for two independent experiments. **(b) PQ induced ER-associated caspase-4 activation in BC-3 cell line.** BC-3 cells were treated with PQ (10 μ M) or Tg (1 μ M as positive control) for 3-30h, followed by measurement of active caspase-4 using the fluorometric caspase-4 assay as described in *Material and Methods*. The values of the untreated control are defined as 1.0. Data are expressed as mean relative to their respective untreated control at each individual time point (Fold change). Error bars represent S.E.M for three independent experiments. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ vs untreated control (two-way ANOVA analysis and Dunnett's multiple comparisons test).

PQ treatment reduces PEL tumor growth and increases survival in a NOD/SCID mice xenografted with a PEL.

As PQ treatment causes significant and selective apoptosis of the HHV-8-infected PEL cell lines, we therefore sought to evaluate its pro-apoptotic activity against HHV-8-associated tumor growth in a PEL xenograft *in vivo* model in NOD/SCID mice as previously described (Bottero et al., 2013; Dai et al., 2014; Wu et al., 2005). Two separate experiments were performed in order to assess the effect of two concentrations of PQ at 12.5 mg / kg and 25 mg / kg by intraperitoneal injection. HHV-8-infected BC-3 cells intraperitoneal injection into the peritoneal cavity of mice resulted in rapid increase of body weight associated with massive ascites with abdominal distention within 2 weeks (*Fig. 7 and Supplemental Fig. S3*). The engraftment of mice with BC-3 cells was confirmed by qPCR analysis for the presence of HHV-8 and albumin from peritoneal solid samples of sacrificed mice at the end of experiment, representing 3.47×10^7 and 4.08×10^7 median copy per 10^6 BC-3 cells for the vehicle engrafted and PQ-treated engrafted mice, respectively.

We have shown a reduction of 28 % of the body weight of engrafted mice at day 24, with the administration of the lower dose of PQ (12.5 mg / kg), and a decrease in the median ascites volume of 24% (*Supplemental Fig. S3a, b*). At the higher dose of PQ (25 mg / kg), we have observed a reduction of 49% of the median body weight of engrafted mice after 20 days (*Fig. 7b*), consistent with the difference of abdominal distension (*Fig7a*) and a decrease by 93% of the median ascites volume, compared with vehicle (*Fig. 7c*). Importantly, 3/6 mice of this group showed no apparent increase of body weight until the end of the study, with no formation of malignant ascites (*Fig. 7b, c, d*) and no signs of pain nor distress were observed. In addition, the mean survival time was improved from 27 days in PBS-injected engrafted mice to 66 days (the end of the study) in the 25 mg / kg PQ-treated engrafted mice group (*Fig. 7d*). Importantly,

the two doses of PQ were well tolerated in mice without any overt toxic effects (*Fig. 7b, d and Supplemental Fig. S3a*).

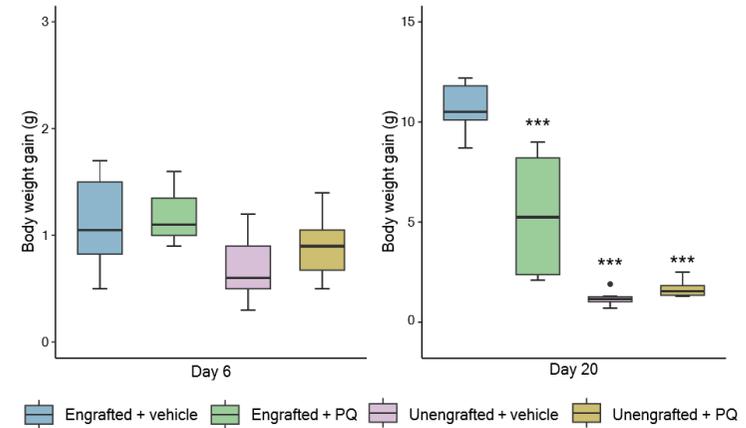
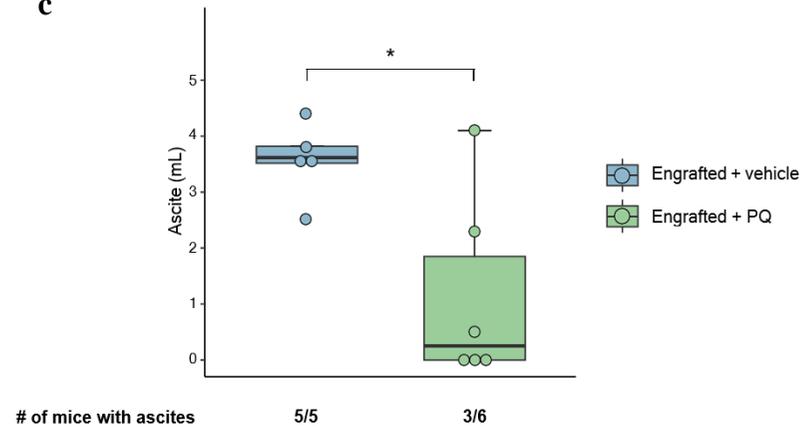
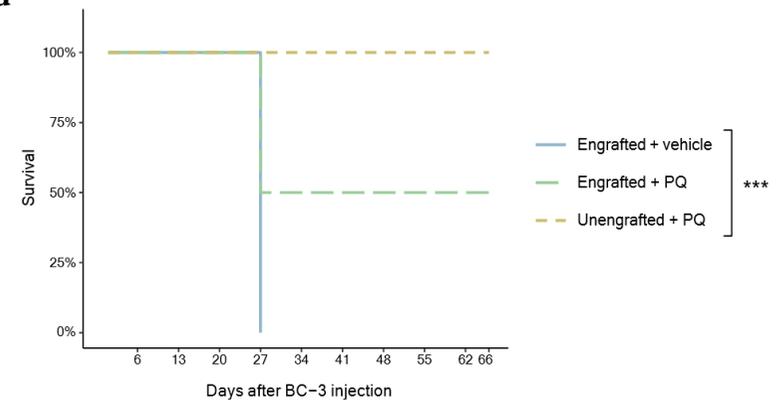
a**b****c****d**

Figure 7. PQ reduced PEL progression in a NOD/SCID mice PEL model. 10^7 BC-3 cells (BC-3-engrafted) or PBS (BC-3-unengrafted) were injected intraperitoneally (i.p) in NOD/SCID mice (n=6 per group). Beginning 24h later, PQ (25mg/kg) or PBS (vehicle) were administered i.p 3 days per week. The mice were euthanized when moribund or showing signs of discomfort and/or when weight reached 150% of their initial weight. **(a, c)** Representative photographs of animals and ascites fluid volumes were collected immediately postmortem. **(b)** The body weight of each mouse was recorded every week. Median body weight gain of mice are represented for each indicated group with a box plot 6 days and 20 days after BC-3 cells injection. ***, $P < 0.001$ vs Engrafted + vehicle group (two-way ANOVA analysis and Tukey's multiple comparisons test). **(c)** Distribution of tumor ascites volume is represented with a box plot within engrafted + PQ and engrafted + vehicle groups. Ascites incidence is also showed for each group. One of the mouse of the engrafted vehicle-treated group has been removed from these analysis because it has shown severe alterations of its health and has to be sacrificed despite presenting no production of ascites. *, $P < 0.05$ vs engrafted + vehicle group (Welch's t-test). **(d)** Mice survival is represented with a Kaplan-Meier curve. ***, $P < 0.001$ Log-rank (Mentel-cox) test.

PQ treatment decreases Kaposi's sarcoma-related lesions and lymphedema in human.

We then investigated the effect of PQ in human harboring severe KS lesion in a proof-of-concept pilot trial with the main objectives to assess the efficacy, the safety and the tolerability of PQ. P1 (patient 1) presented a clinical progression between baseline and M2 with occurrence of 18 new KS lesions, a complete disappearance of two KS lesions and an improvement of lymphedema of the right leg. The treatment was stopped and a chemotherapy with paclitaxel was started allowing to get a good clinical improvement. P2 had at M3 an improvement of 5 out of the 8 KS lesions present at baseline. He did not harbor any lymphedema at any time of the trial. P3 harbored at M3 an improvement of 5 out of the 6 KS lesions present at baseline on the right foot and an improvement of lymphedema between baseline and M3. P4 harbored at M3 a complete disappearance of 3 out the 4 KS lesions present at baseline and an improvement of lymphedema of right leg. The clinical investigator decided to pursue the duration of treatment up to M4 and all the KS lesions and the lymphedema totally disappeared (*Fig. 8 and Supplemental Table 2*). None of the patients did not presented neither clinical nor biological adverse event.

Patient 3



Baseline



M2



M3

Patient 4



Baseline



M3



M4

Figure 8. PQ reduced KS-related lesions and lymphedema. Clinical effects in patients 3 and 4: White arrows indicated KS lesions with clinical proven regression. These pictures also evidenced lymphedema improvement in both patients.

DISCUSSION

In this study, we identified for the first time, the antimalarial primaquine diphosphate (PQ) as a promising targeted therapeutic agent to treat HHV-8-associated PEL and KS. We have demonstrated *in vitro* that PQ is specific of HHV-8-infected PEL cell lines by inducing cytotoxic effects through executioner caspases-3/-7-dependent apoptosis within 48 h of treatment. PQ have been approved and used worldwide since the 1950's and its lack of toxicity in our study on HHV-8-uninfected cells is in accordance with the fact that it is a remarkably safe and well-tolerated drug among G6PD-normal patients (Baird, 2015). Deciphering the apoptotic process induced by PQ, we demonstrated the activation of both caspase-8 and -9. This result is consistent with the role played by caspase-8 and -9 in the proapoptotic activity on PEL cells of artesunate, an other antimalarial compound (Ishikawa and Mori, 2020).

Interestingly, primaquine induced oxidative stress through intracellular ROS production and GSH depletion. These data were in agreement with previous studies showing that PQ and some of its metabolites induced a concentration dependent increase of ROS in erythrocytes *in vitro* (Ganesan et al., 2012, 2009). It is well known that an imbalance between ROS production and ROS detoxification results in oxidative stress, which can lead to apoptosis induction and cell death. Cancer cells are characterized by elevated rates of ROS, which promote many aspects of tumor development and progression. However, in order to protect themselves against oxidative severe damage, cancer cells also express increased levels of antioxidants proteins, required for tumor cell survival (Kumari et al., 2018; Liou and Storz, 2010; Lo et al., 2017; Schieber and Chandel, 2014). Since cancer cells are under increased oxidative stress, many different therapeutic strategies in PEL, as in other malignancies, are exerting their cytotoxic effect by increasing the level of oxidative stress and though tipping the balance to ROS-induced apoptotic signaling (Ishikawa and Mori, 2020; Li et al., 2011; Liou and Storz, 2010).

Therefore, ROS and ROS-related death signaling pathways appears to be a good target to induce cell death. It has been reported that the anti-oxidant N-acetylcysteine (NAC) can act against oxidative stress either by increasing intracellular GSH levels as a precursor of GSH, either by decreasing H_2O_2 as a scavenger of H_2O_2 (Coles et al., 2018; Li et al., 2011). Importantly, we have observed that pre-treatment with the anti-oxidant NAC dramatically reduced ROS generation caused by PQ treatment, and strongly relieved the PQ-induced cytotoxicity and the caspases-3/-7 activation. These results indicated that ROS generation has a major role in PQ apoptotic process in PEL cells. This finding was supported by up-regulation of the expression of *OSGIN1* observed in PQ-treated PEL cells, a tumor suppressor gene induced by oxidative stress which has been previously reported as playing a role in PEL cells apoptosis, in part through regulation of ROS production and GSH synthesis (Dai et al., 2015). Furthermore, although PQ treatment is well tolerated among general population, it might cause hemolytic toxicity in population with glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency. As G6PD-dependent GSH recycling the only pathway existing in erythrocytes to synthesize GSH, oxidative stress has been closely related to the hemolytic toxicity of oxidant drugs such as PQ (Duparc and Beutler, 2007; Ganesan et al., 2012). In our studies, the detoxification of ROS by the anti-oxidant systems appeared not to be efficient enough, as PEL cell death was still highly induced by PQ, and pre-treatment with antioxidant NAC failed to restore GSH levels.

As we further evaluated the cell death signaling pathways involved in PQ mechanisms of action, RNA-seq analysis highlighted the activation of some hallmarks of the ER stress-mediated apoptosis signaling pathway. Cancer cells require high protein demand due to their enhanced rate of growth and proliferation. The characteristics of the stressful tumor microenvironment, can trigger ER stress and subsequently UPR to maintain ER homeostasis and enables tumor survival. However, if the ER stress is too severe or persistent, the pro-apoptotic pathways of

the UPR are activated, including the induction of CHOP and activation of caspase-4, leading to cell death through apoptosis, to prevent further damage to the host (Boriushkin et al., 2014; Johnston and McCormick, 2019; Merlot et al., 2016; Rozpedek et al., 2016; Shigemi et al., 2016; Sprengle et al., 2017; Szegezdi et al., 2006). Thus, ER stress targeting therapy by triggering pro-apoptotic pathways of the UPR represent a novel strategy for anti-tumor, including anti-PEL, therapeutics. The proteasome inhibitor bortezomib or the antimalarial chloroquine are some example of such therapeutic candidates in PEL (Anania et al., 2016; Baba et al., 2017; Granato et al., 2013; Mahdi et al., 2016; Masud Alam et al., 2016; Merlot et al., 2016; Shigemi et al., 2017). Remarkably, in addition to ER-stress dependent caspase-4 activation, our study indicated that expression of transcription factor *CHOP*, as well as *ATF3* and *CHAC1*, were increased in PQ-treated PEL cells. CHAC1 is a pro-apoptotic ER stress-inducible gene, downstream of ATF3 and CHOP, and can mediate, in part, the pro-apoptotic effects of both these transcription factors (Baba et al., 2017; Crawford et al., 2015; Franco and Cidlowski, 2009; Mungrue et al., 2009; Nakajima and Kitamura, 2013; Oyadomari and Mori, 2004; Rohini et al., 2018; Rozpedek et al., 2016; Szegezdi et al., 2006; Urra et al., 2003). Although further analysis would be necessary to gain insight into the molecular mechanism of the activation of the ER stress-mediated apoptosis signaling, our data can evoke severe or unresolvable ER stress, and subsequent activation of pro-apoptotic ER stress-inducible gene, to be involved in the apoptosis caused by PQ in HHV-8-infected cells.

Considering the established role of oxidative stress in the apoptotic effects of PQ, it appears important to note that oxidative stress and ER stress occur concurrently in some pathological contexts, such as cancer, and that there is a cross talk between these stress responses (Nakajima and Kitamura, 2013). Indeed, it is well established that ER stress might be induced from ROS and ROS-induced oxidation (Nakajima and Kitamura, 2013; Wang et al., 2019). Besides, it has

been reported that high levels of ROS and/or GSH depletion at the ER sensitize cells to ER stress-induced apoptosis (Franco and Cidlowski, 2009; Rozpedek et al., 2016; Urra et al., 2013). In some studies, the anti-oxidant NAC has shown some protective effects on hepatocytes from ROS-mediated ER stress-induced apoptosis *in vitro* (Sun, 2014), and attenuated carcinogenesis by inhibiting ROS generation and ER stress *in vivo* (Lin et al., 2013). On another side, among the many pro-apoptotic mechanisms induced by CHOP under severe ER stress (Szegezdi et al., 2006), some involved the disruption of redox homeostasis of the ER, as overexpression of CHOP depletes cells of GSH and exacerbates increase of ROS (Franco and Cidlowski, 2009; McCullough et al., 2001; Mungrue et al., 2009; Urra et al., 2013). Moreover, it has been reported in several studies that overexpression of CHAC1 resulted to a robust depletion of GSH, which could lead to a weakened ability of cells to resist oxidative stress-mediated cell death (Crawford et al., 2015; Mungrue et al., 2009; Wang et al., 2019). Thus, although the underlying mechanisms related to ROS- and ER stress-mediated PQ apoptotic process are not fully elucidated, we might hypothesize that they both participate to the specific pro-apoptotic effects of PQ on PEL cells.

Previous studies have indicated that cellular stress, such as ER stress or oxidative stress, could reactivate latent HHV-8 infection and induces lytic replication in PEL cells. However, our data did not show any obvious influence of PQ on the expression of latent and lytic viral genes as well as on virion production until 24h of treatment, while apoptotic mechanisms have already been activated and half of PEL cells are already dead (*supplemental Fig. S1*). However prolonged incubation of 48 h of BC-3 cells with PQ was associated with increasing extracellular HHV-8 virion production. These findings strongly suggest that induction of cell death by PQ occurred independently of viral lytic replication. This is consistent with previous studies which have reported that ER stress has been shown to enhance lytic gene expression and viral

production in lytic PEL cells but doesn't alone initiate lytic replication of latent cells (Shigemi et al., 2016). The small percentage of lytic PEL cells in culture could be sensitized under PQ-induced severe ER stress and increased release of already formed HHV-8 virions. Moreover, studies have reported that the levels of ROS could be a critical factors in regulating the balance between HHV-8 reactivation and PEL cell death, as high levels of ROS led mostly to cell death (Li et al., 2011). These data could explain the presence of increased HHV-8 virion in the supernatant of PEL cells culture after prolonged treatment with PQ as the ROS levels rise, but rather seemed to be a consequence of the stresses and massive cell death induced within 48 h by PQ treatment. In addition, our data from the NOD/SCID PEL xenograft model did not show any increase of intracellular HHV-8 DNA from intraperitoneal solid sample of mice treated with PQ.

Remarkably, we have shown that PQ treatment increment could reduce PEL tumor progression in a PEL mouse model, as it could abolished tumor development, malignant ascites formation and enhanced survival of 50% of PQ-treated mice. Importantly, PQ was well tolerated in mice without significant side-effects.

Finally, supported by our *in vitro* and *in vivo* PQ efficacy and safety findings, an exploratory proof of concept clinical trial in four patients has been conducted and demonstrated a positive efficacy on Kaposi's sarcoma-related lesions and lymphedema, and was well-tolerated. This must be confirmed in larger clinical trials in KS and/or PEL patients.

In conclusion, the antimalarial pimaquine diphosphate induces cell death involving apoptosis induction specifically in HHV-8 infected PEL cells. Oxidative stress- and ER stress-mediated apoptosis seem to be part of the mechanism of action of PQ. Further *in vitro* studies are required to fully characterize the anti-tumor effects of PQ. Overall, the efficacy and safety observations from our pre-clinical analysis *in vitro* in PEL cells and *in vivo* in PEL mouse model, as well as

in patients harboring severe KS, thereby raising the possibility that PQ may serve as a novel promising targeted therapeutic agent in the treatment of, at least, HHV-8-associated PEL and KS.

MATERIAL AND METHODS

Cells

HHV-8-infected Primary effusion lymphoma B-cell lines, BC-3 (CRL-2277) and BCP-1 (CRL-2294), and HHV-8-uninfected Burkitt's lymphoma DG-75 cell line (CRL-2625), were obtained from ATCC and grown in RPMI 1640 GlutaMAX (Gibco) medium with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco) and 1% amikacin/vancomycin (Mylan). Human Fetal Lung Fibroblast MRC-5 cells (ATCC CCL-171) were cultured in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, ATCC 30-2003) with 10% FBS and 1% penicilin/streptomycin (Gibco). Three cell types of skin were used, primary normal Human epidermal keratinocyte, Adult (NHEK-Ad; Lonza), primary normal Human Dermal fibroblast, Adult (NHDF-Ad; Lonza), grown into keratinocytes growth medium (KGMTM Gold; Lonza) and fibroblast growth basal medium (FBMTM; Lonza), respectively, and human keratinocyte HaCaT cell line grown into DMEM with 10% FBS and 1mM pyruvate. HeLa (ATCC CCL-2) cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM-GlutaMAX; Gibco) with 10% FBS and 1% penicilin/streptomycin. Primary umbilical vein endothelial HUVEC (ATCC PCS-100-010) cells were cultured in Vascular Cell Basal Medium (ATCC PCS-100-030) with growth factors (rh VEGF, rh EGF, rh FGF basic, rh IGF-1), L-glutamine, heparin sulfate, hydrocortisone hemisuccinate, 2% FBS, ascorbic acid, gezntamicin-amphotericin B Solution, penicilin-streptomycin-amphotericin B solution and phenol red. All the cells were cultured at 37°C, under a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Reagents

Primaquine diphosphate (PQ), diethyldithiocarbamate (DDTC), doxorubicin hydrochloride, sulfasalazine (SASP), *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) and thapsigargin (Tg) were purchased from Sigma-Aldrich.

Cell viability assay

Cell viability was assessed by using the luminescent CellTiter-Glo 2.0 assay (Promega), performed as described by the manufacturer. Briefly, cells (10^4 /well) were incubated in a 96-well plate in the presence of the compounds in a final volume of 100 μ l for 48 h. Values were normalized to the untreated cells. The half maximal cytotoxic concentrations (CC50) were calculated using Graph pad Prism 6.0.

Caspases -3/-7, -8 and -9 assays

Apoptosis in BC-3, BCP-1 and DG-75 cells was assessed by measuring activity of the executioner caspase-3 and -7, using the luminescent Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega), as described by the manufacturer. Activity of caspase-8 and caspase-9 was measured in BC-3 cells using the luminescent Caspase-Glo 8 assay and the Caspase-Glo 9 assay kit (Promega) respectively, and performed as described by the manufacturer. Briefly, cells (10^4 /well) were incubated in a 96-well plate in the presence of PQ in a final volume of 100 μ l for 24 h. The caspases activity in untreated cells was considered as caspase basal activity and defined as 1.0 relative light unit. Values were normalized to the untreated cells.

Phenotypic screening assay

The phenotypic screen with the 2781 compounds of the Prestwick chemical libraries (14D1305 MP02 ST05 and 02-Nat. Mp01 D1203 ST08, Prestwick chemical) was performed by quantification of the cell viability (CellTiter-Glo 2.0 assay) and apoptosis (Caspase-Glo 3/7

assay) in BC-3 cell line, as previously described. The Prestwick compounds were tested at a final concentration of 10 μ M (DMSO 1%) in 96-well plates. Diethyldithiocarbamate (DDTC), known to induce cytotoxicity through apoptosis in a caspase-3-dependent pathway in BC-3 cells, has been used as positive control (Matsuno et al., 2012).

Measurement of intracellular hydrogen peroxide (H₂O₂) and reduced glutathione (GSH) productions

To measure H₂O₂ and GSH productions, BC-3 cells were treated in a 96-well plate with PQ in a final volume of 100 μ l for 24 h. Cells were then washed three times in PBS and incubated with 100 μ l per wells of 5 μ M 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂-DCFDA for determination of H₂O₂) or 5 μ M Monochlorobimane (for determination of GSH) in PBS for 30 min at 37°C. Fluorescent probes were purchased from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). After three washes, fluorescence intensity was recorded every hour over a period of 6 h. At the end of the experiment, the number of BC-3 cells was evaluated by the crystal violet assay as described below. H₂O₂ and GSH were assayed by spectrofluorimetry (Fusion, PerkinElmer). Levels of ROS and GSH were calculated in each sample as follows: H₂O₂/GSH rate (arbitrary units/min/10⁶ cells) = (fluorescence intensity [arbitrary units] at T_{6h} – fluorescence intensity [arbitrary units] at T₀)/360 minutes/number of BC-3 cells as measured by the crystal violet assay, and were expressed as arbitrary unit (A.U.). Cell viability assays. Crystal violet staining was used to determine the number of adherent cells in 96-well plates. Briefly, after incubation with the test compound, the culture medium was discarded and the cells were incubated with a 0.05% crystal violet solution (Sigma) for 30 min at room temperature. After washing with PBS, 100% methanol was added, and the absorbance was measured spectrophotometrically at 540 nm on an ELISA multiwell reader. The MTT (1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan) assay was performed to test cell viability in 96-

well plates. The cells were incubated with a 0.2% MTT solution in cell culture medium for 4 h at 37°C. The MTT solution was then discarded and DMSO added to solubilize the MTT-formazan crystals produced in living cells. After thorough mixing, the absorbance was measured at 540 nm. H₂O₂ and GSH levels on untreated-cells (control) were considered as 1.0 and 100%, respectively. Values were normalized to H₂O₂ or GSH levels of the control.

Measurement of extracellular HHV-8 virus production by real-time PCR

BC-3 cells (2.10⁶ cells in 10 ml) were treated by PQ or SASP (as positive control) for 12-48 h, or left untreated as negative control. Cells were then centrifuged at 1500 rpm for 15 min and supernatant was filtered through a 0.45 µm pore to remove cellular debris. Virus was pelleted down by ultracentrifugation at 36000 rpm for 3 h. Each pellet was then treated with 100 µl of DNase I (Qiagen) to eliminate free DNA. HHV-8 virion DNA was extracted and quantified by real-time PCR using an ORF-73 (LANA) specific primer set, as described previously (Lallemand et al., 2000).

Transcriptome profiling by RNA-seq

The RNA-seq of the triplicate BC-3 cells untreated or treated with 10µM PQ for 12h was performed on a NextSeq 500 next-generation sequencer, Illumina (75 pb paired-end sequencing; depth sequencing of 22 million reads per sample). Briefly, total RNA was purified using the RNeasy Mini kit (Qiagen), quantified by Qubit RNA BR assay kit (Thermofischer), according to the manufacturer's instructions. cDNA libraries were prepared from poly(A)-selected RNA and subjected to RNA deep-sequencing (RNA-seq) analysis on the Genotyping and sequencing core facility (iGenSeq) at the Paris Brain Institute. Cellular RNA reads were mapped onto the human genome (hg19) using the STAR program then quantified by RSEM and normalized with the R edgeR package to obtained count per million values (cpm). The changing expression levels of cellular transcripts within PQ-treated compared to untreated BC3

cells was also carried out by the R edgeR package. The cut-off values selected for the analysis of the data were: p-value threshold: 0.05, log2foldchange threshold: 1.5; count per million (CPM) threshold: 1. The reads of the viral transcripts were mapped onto the HHV-8 genome sequence (NC_009333) using Tophat program. Quantification of the reads was carried out by featureCounts. CPM values were calculated by DEseq2 program, and differential expression of viral genes was performed using also the DEseq2 program. To find out what biological process or molecular function the differentially expressed genes were associated to, a pathway enrichment analysis (Gene Ontology) was also conducted with Fisher test using R package (clusterProfiler).

qRT-PCR

Total RNA was purified using the RNeasy Mini kit (Qiagen), quantified by Qubit RNA BR assay kit (Thermofischer), according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from equivalent total RNA using SuperScriptTM III Reverse Transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's procedures. Amplification was carried out using an ABI Prism 7500 real-time PCR system utilizing PowerUp SYBR Green Master Mix reagent (Applied Biosystems), and cycle threshold (Ct) values were tabulated in triplicate for each gene of interest in each experiment. "No template" (water) and RT controls were performed in every run. Primers used for amplification of target genes are displayed in [supplemental Table 1](#). Data were analyzed using the ΔC_t method as described previously (Pfaffl, 2001). The ratio (R) of the target gene is expressed in a treated sample versus a control (untreated sample) in comparison to a reference gene (β -actin), according to the formula:

$$R = (AE_{\text{target}})^{\Delta C_t \text{ target (positive control-treated sample)}} / (AE_{\beta\text{-actin}})^{\Delta C_t \beta\text{-actin (positive control-treated sample)}}$$

For the calculation of R, the real-time PCR efficiencies (Amplification Efficiencies, AE) of each target gene and β -actin have been calculated.

Caspase-4 assay

Caspase-4 activity was assessed using the fluorometric Caspase-4 assay kit (abcam) according to the manufacturer's instructions. Briefly, after treatment with PQ (10 μ M) or thapsigargin (Tg, 1 μ M as positive control) for 3-30 h, BC-3 cells were lysed and proteins were extracted. 200 μ g of total proteins from each sample was incubated with the caspase-4 substrate at 37°C for 1h, and caspase-4 activity were then monitored by fluorometer. Fold-increase in caspase-4 activity has been determined by comparing the results of treated cells with the level of the untreated cells.

PEL xenograft murine model

Six weeks -old female NOD/SCID mice (Charles River Laboratories) were kept at the animal care facility at the Pitié-Salpêtrière hospital, Paris. All animal studies were conducted according to protocols approved by the Animal Ethics Committee Charles Darwin N° 5 of the Paris Brain Institute (ICM; APAFIS#6542). Six weeks -old female mice were assigned into four groups (n = 6), with a median weight of 20 g. The mice were received intraperitoneal (i.p) injection of 10⁷ BC-3 cells from culture diluted in 500 μ l PBS (Engrafted mice) or 500 μ l of PBS alone (Unengrafted mice) on day 0. 25 mg / kg PQ (PQ-treated mice) or PBS alone (vehicle-treated mice) were administrated intraperitoneally on day 1, and 3 days per week thereafter for 66 days. The dose of PQ administrated has been choose according to previous studies on PQ-treated SCID mice (Rochford et al., 2013). Body weight gain for individual mice were recorded weekly as a criterion for ascites growth and tumorigenesis. Ascites fluid from mice injected i.p with BC-3 cells were removed immediately postmortem and measured. Reduction of body weight gain and ascites volume as an indicator of anti-tumor efficacy of PQ

was evaluated in PQ-treated engrafted group compared to untreated engrafted group. For confirmation of PEL cell expansion within the murine model, DNA was extracted from peritoneal solid samples of BC-3 cells-grafted mice, and copy number of HHV-8 and albumin was measured with real-time PCR, as previously described (Lallemand et al., 2000). Mice were monitored and euthanized when tumor burden interfere with ambulation, eating, drinking, defecation and urination, and/or when weight reached 150% of their initial weight. Survival was evaluated from the first day of treatment until death.

Proof of concept clinical trial

This study was approved by the Comité d’Ethique de la FMPOS (Faculté de Médecine et Pharmacie et odonto stomatologie) ; Université des sciences, des techniques et des technologies de Bamako. Decision number 2019/ 34 / CE / FMPOS, 11st April 2019 (Prof Amadou Diallo) and for the amendment decision number 2019 / 179 / CE FMPOS, 23 Dec 2019 (Prof Amadou Diallo). All patients received and signed informed consents. Patient eligibility: To be eligible, patients had to be older than 18 years of age, have a proven endemic kaposi's sarcoma on a skin biopsy, without ulcerated lesions and with at least two evaluable lesions. Patients did not receive any other treatment for Kaposi’s sarcoma before inclusion. Patients with an history of systematic visceral injury, or with severe glucose-6-phosphase-dehydrogenase (G-6-PD) deficiency, receiving potentially hemolytic drugs or drugs that depress myeloid elements of the bone marrow, with liver dysfunction, renal insufficiency with creatinine clearance <40ml/min, HIV1 or HIV2 positive, pregnant or breastfeeding women, patients who have been treated with chemotherapy or immunotherapy within 4 weeks prior to treatment or have electrolyte disorders (hypokalemia, hypo or hypercalcemia) were not included in the study. Study design and treatment: Proof of concept study assessing the efficacy and safety of primaquine diphosphate (Wellona Pharma). The first patients (1 and 2) were treated with 15 mg once daily (OD) of

primaquine per day for 12 weeks. Based on efficacy and safety results of the two first patients, the protocol was amended to the use of 30 mg of primaquine per day (15mg twice a day: BID) for patients 3 and 4 for 12 weeks. Response Assessment: At inclusion, the total number of lesions and presence of lymphedema were reported. Partial response of a KS lesion is defined as at least a 50% reduction of the tumor size and for lymphedema a decrease clinically validated by the investigator. Complete response is defined as the absence of detectable target lesions and lymphedema for more than four weeks. The target lesions should be at least 5 mm long, defined as the sum of the length of the two longest perpendicular diameters. The characteristics of the target lesions and photographs are registered at each clinical visit. The lesions will be evaluated on photographs reviewed by two dermatologists. When the definitions of complete response, partial response, or progressive disease do not apply, response was defined as stable disease. Adverse event (AE) assessment: AEs were monitored during each visit and 4 weeks after completing therapy and until AEs resolution. Laboratory Assays: The following blood samples will be taken at baseline, M1, M2, M3: haematology (blood counts and platelet count), biochemistry (sodium, potassium, total calcium, AST, ALT, creatinine).

Statistical analysis

All *in vitro* results are expressed as mean \pm standard deviation (SD) or standard error of the mean (SEM). Statistical significance for differences between treated and untreated control groups was determined using the Welch's t-test for Fig. 2a, 3a and b or Wilcoxon-Mann-Whitney's test for Fig. 2b and 4. Welch's t-test was performed between NAC and vehicle groups for Fig. 3c and d and was performed between Engrafted-vehicle and Engrafted-PQ groups for Fig. 7c. Data of Fig. 5b, 6b, 7b were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and Dunnett's or Tukey's multiple comparisons tests. Statistical significance of mice survival

in [Fig. 7d](#) was assessed by log-rank (Mantel-cox) test. *P* values smaller than 0.05 were considered statistically significant.

Supplemental material

[Fig. S1](#) shows the kinetic of cytotoxic effects of PQ on BC-3 cell line determined by trypan blue assay in triplicate. The BC-3 cells were treated with 10 or 20 μ M PQ. At 12 h, 24 h, 48 h and 72 h, cells were mixed with trypan blue dye and the number of viable and total cells was counted. The percent of viable cells in each well was calculated by reporting the number of viable cells to total cells. The number of viable cells in untreated cultures on each time point was considered as 100 % for comparison of cell survival with PQ treatment. A kinetic of cytotoxic effects of 10 μ M PQ carried out with CellTiter Glo 2.0 assay is also showed. [Fig. S2](#) displays the pathway enrichment analysis (Gene Ontology) of differentially modulated genes classified by their biological functions, from RNA-sequencing analysis. [Fig. S3](#) presents the data of the second PQ anti-tumor experiments in a NOD/SCID mice PEL xenograft model in which a lower dose of PQ (12.5 mg/kg) were administrated intraperitoneally in mice. The median body weight gain and tumor ascites volume and incidence are showed in [Fig S3 a and b](#), respectively. Animal studies were conducted according to protocols approved by the Animal Ethics Committee Charles Darwin N° 5 of the Paris Brain Institute (ICM; APAFIS#2250) [Supplemental Table 1](#) displays the list of primers used for qRT-PCR assays. [Supplemental Table 2](#) shows a summary of clinical trial results from a proof-of-concept trial in human harboring severe Kaposi's sarcoma.

Acknowledgments

This work was supported by the Association pour la Recherche en Virologie et Dermatologie (ARVD). Author contributions: AG, SS, ND, PG conducted experiments. VL performed the figures of this article and designed the primers and protocols used for RT-qPCR. AG, VL and

ND performed statistical analysis. VC, ND and OF designed the study clinical trial. OF was the clinical principal investigator of the clinical study. OF and ND review all the clinical responses and pictures. AIM coordinated the biological analyses of the clinical trial. LBR was the project manager of the trial. AG wrote the manuscript with input from PG, VC, A-GM, AJ and EL.

Disclosures: none to declare.

BIBLIOGRAPHIE

- Anania, V.G., Yu, K., Gnad, F., Pferdehirt, R.R., Li, H., Ma, T.P., Jeon, D., Fortelny, N., Forrest, W., Ashkenazi, A., Overall, C.M., Lill, J.R., 2016. Uncovering a Dual Regulatory Role for Caspases During Endoplasmic Reticulum Stress-induced Cell Death. *Mol. Cell. Proteomics* 15, 2293–2307. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.055376>
- Baba, Y., Shigemi, Z., Hara, N., Moriguchi, M., Ikeda, M., Watanabe, T., Fujimuro, M., 2017. Arctigenin induces the apoptosis of primary effusion lymphoma cells under conditions of glucose deprivation. *Int. J. Oncol.* <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4215>
- Baird, K., 2015. Origins and implications of neglect of G6PD deficiency and primaquine toxicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Pathog. Glob. Health* 109, 93–106. <https://doi.org/10.1179/2047773215Y.0000000016>
- Boriushkin, E., Wang, J.J., Zhang, S.X., 2014. Role of p58IPK in Endoplasmic Reticulum Stress-associated Apoptosis and Inflammation. *J. Ophthalmic Vis. Res.* 9, 134–143.
- Bottero, V., Sadagopan, S., Johnson, K.E., Dutta, S., Veettil, M.V., Chandran, B., 2013. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Positive Primary Effusion Lymphoma Tumor Formation in NOD/SCID Mice Is Inhibited by Neomycin and Neamine Blocking Angiogenesis Nuclear Translocation. *J. Virol.* 87, 11806–11820. <https://doi.org/10.1128/JVI.01920-13>
- Bruce, A.G., Barcy, S., DiMaio, T., Gan, E., Garrigues, H.J., Lagunoff, M., Rose, T.M., 2017. Quantitative Analysis of the KSHV Transcriptome Following Primary Infection of Blood and Lymphatic Endothelial Cells. *Pathogens* 6, 11. <https://doi.org/10.3390/pathogens6010011>
- Cancian, L., Hansen, A., Boshoff, C., 2013. Cellular origin of Kaposi's sarcoma and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-induced cell reprogramming. *Trends Cell Biol.* 23, 421–432. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.04.001>
- Cesarman, E., Damania, B., Krown, S.E., Martin, J., Bower, M., Whitby, D., 2019. Kaposi sarcoma. *Nat. Rev. Dis. Primer* 5, 9. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0060-9>
- Coles, L.D., Tuite, P.J., Öz, G., Mishra, U.R., Kartha, R.V., Sullivan, K.M., Cloyd, J.C., Terpstra, M., 2018. Repeated-Dose Oral N-Acetylcysteine in Parkinson's Disease: Pharmacokinetics and Effect on Brain Glutathione and Oxidative Stress. *J. Clin. Pharmacol.* 58, 158–167. <https://doi.org/10.1002/jcph.1008>
- Crawford, R.R., Prescott, E.T., Sylvester, C.F., Higdon, A.N., Shan, J., Kilberg, M.S., Mungrue, I.N., 2015. Human CHAC1 Protein Degrades Glutathione, and mRNA Induction Is Regulated by the Transcription Factors ATF4 and ATF3 and a Bipartite ATF/CRE Regulatory Element. *J. Biol. Chem.* 290, 15878–15891. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.635144>

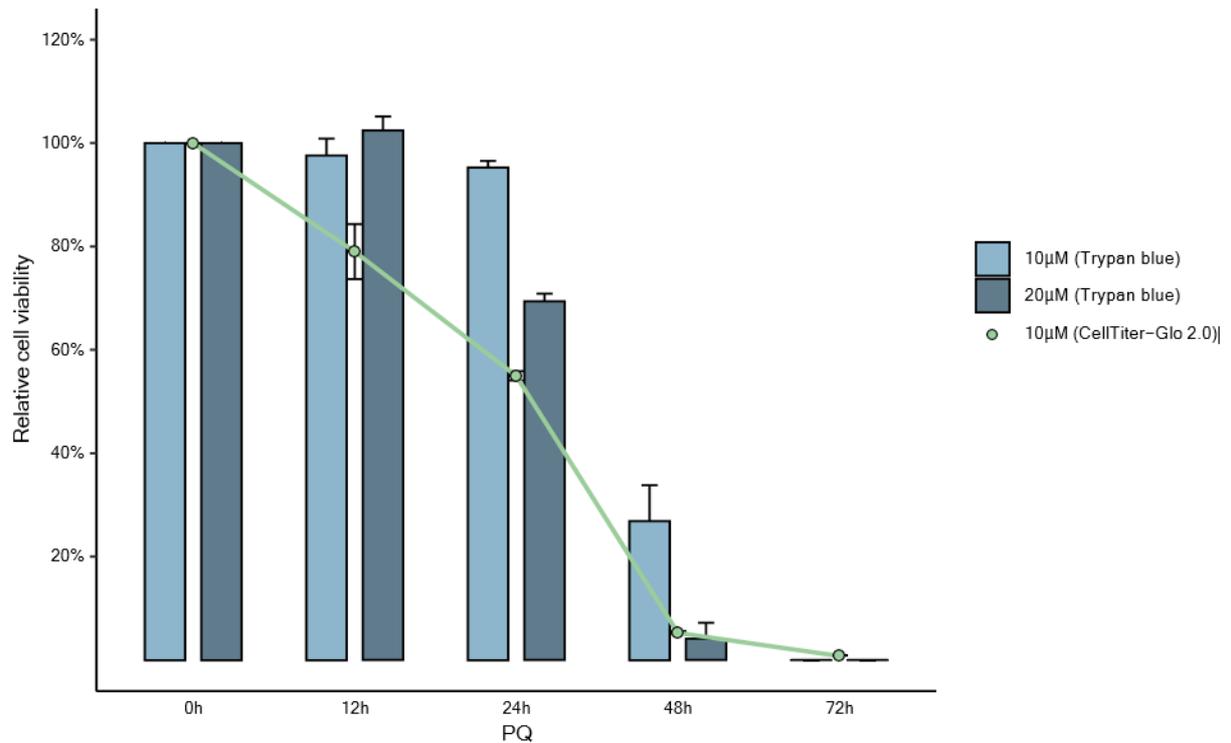
- Dai, L., Cao, Y., Chen, Y., Kaleeba, J.A.R., Zabaleta, J., Qin, Z., 2015. identification of novel targets against AIDS-associated 13.
- Dai, L., Cao, Y., Chen, Y., Parsons, C., Qin, Z., 2014. Targeting xCT, a cystine-glutamate transporter induces apoptosis and tumor regression for KSHV/HIV-associated lymphoma. *J. Hematol. Oncol.* *J Hematol Oncol* 7, 30. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-7-30>
- Duparc, S., Beutler, E., 2007. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency and Antimalarial Drug Development. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77, 779–789. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.77.779>
- Franco, R., Cidlowski, J.A., 2009. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death Differ.* 16, 1303–1314. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.107>
- Ganesan, S., Chaurasiya, N.D., Sahu, R., Walker, L.A., Tekwani, B.L., 2012. Understanding the mechanisms for metabolism-linked hemolytic toxicity of primaquine against glucose 6-phosphate dehydrogenase deficient human erythrocytes: Evaluation of eryptotic pathway. *Toxicology* 294, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.01.015>
- Ganesan, S., Tekwani, B.L., Sahu, R., Tripathi, L.M., Walker, L.A., 2009. Cytochrome P450-dependent toxic effects of primaquine on human erythrocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 241, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.07.012>
- Anania, V.G., Yu, K., Gnad, F., Pferdehirt, R.R., Li, H., Ma, T.P., Jeon, D., Fortelny, N., Forrest, W., Ashkenazi, A., Overall, C.M., Lill, J.R., 2016. Uncovering a Dual Regulatory Role for Caspases During Endoplasmic Reticulum Stress-induced Cell Death. *Mol. Cell. Proteomics* 15, 2293–2307. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.055376>
- Baba, Y., Shigemi, Z., Hara, N., Moriguchi, M., Ikeda, M., Watanabe, T., Fujimuro, M., 2017. Arctigenin induces the apoptosis of primary effusion lymphoma cells under conditions of glucose deprivation. *Int. J. Oncol.* <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4215>
- Baird, K., 2015. Origins and implications of neglect of G6PD deficiency and primaquine toxicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Pathog. Glob. Health* 109, 93–106. <https://doi.org/10.1179/2047773215Y.0000000016>
- Boriushkin, E., Wang, J.J., Zhang, S.X., 2014. Role of p58IPK in Endoplasmic Reticulum Stress-associated Apoptosis and Inflammation. *J. Ophthalmic Vis. Res.* 9, 134–143.
- Bottero, V., Sadagopan, S., Johnson, K.E., Dutta, S., Veettil, M.V., Chandran, B., 2013. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Positive Primary Effusion Lymphoma Tumor Formation in NOD/SCID Mice Is Inhibited by Neomycin and Neamine Blocking Angiogenin's Nuclear Translocation. *J. Virol.* 87, 11806–11820. <https://doi.org/10.1128/JVI.01920-13>
- Bruce, A.G., Barcy, S., DiMaio, T., Gan, E., Garrigues, H.J., Lagunoff, M., Rose, T.M., 2017. Quantitative Analysis of the KSHV Transcriptome Following Primary Infection of Blood and Lymphatic Endothelial Cells. *Pathogens* 6, 11. <https://doi.org/10.3390/pathogens6010011>
- Cancian, L., Hansen, A., Boshoff, C., 2013. Cellular origin of Kaposi's sarcoma and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-induced cell reprogramming. *Trends Cell Biol.* 23, 421–432. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.04.001>
- Cesarman, E., Damania, B., Krown, S.E., Martin, J., Bower, M., Whitby, D., 2019. Kaposi sarcoma. *Nat. Rev. Dis. Primer* 5, 9. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0060-9>
- Coles, L.D., Tuite, P.J., Öz, G., Mishra, U.R., Kartha, R.V., Sullivan, K.M., Cloyd, J.C., Terpstra, M., 2018. Repeated-Dose Oral N-Acetylcysteine in Parkinson's Disease: Pharmacokinetics and Effect on Brain Glutathione and Oxidative Stress. *J. Clin. Pharmacol.* 58, 158–167. <https://doi.org/10.1002/jcph.1008>
- Crawford, R.R., Prescott, E.T., Sylvester, C.F., Higdon, A.N., Shan, J., Kilberg, M.S., Mungrue, I.N., 2015. Human CHAC1 Protein Degrades Glutathione, and mRNA Induction Is Regulated by the

- Transcription Factors ATF4 and ATF3 and a Bipartite ATF/CRE Regulatory Element. *J. Biol. Chem.* 290, 15878–15891. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.635144>
- Dai, L., Cao, Y., Chen, Y., Kaleeba, J.A.R., Zabaleta, J., Qin, Z., 2015. identification of novel targets against AIDS-associated 13.
- Dai, L., Cao, Y., Chen, Y., Parsons, C., Qin, Z., 2014. Targeting xCT, a cystine-glutamate transporter induces apoptosis and tumor regression for KSHV/HIV-associated lymphoma. *J. Hematol. Oncol.* *J Hematol Oncol* 7, 30. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-7-30>
- Duparc, S., Beutler, E., 2007. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency and Antimalarial Drug Development. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77, 779–789. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.77.779>
- Franco, R., Cidlowski, J.A., 2009. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death Differ.* 16, 1303–1314. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.107>
- Ganesan, S., Chaurasiya, N.D., Sahu, R., Walker, L.A., Tekwani, B.L., 2012. Understanding the mechanisms for metabolism-linked hemolytic toxicity of primaquine against glucose 6-phosphate dehydrogenase deficient human erythrocytes: Evaluation of eryptotic pathway. *Toxicology* 294, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.01.015>
- Ganesan, S., Tekwani, B.L., Sahu, R., Tripathi, L.M., Walker, L.A., 2009. Cytochrome P450-dependent toxic effects of primaquine on human erythrocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 241, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.07.012>
- Goncalves, P.H., Ziegelbauer, J., Uldrick, T.S., Yarchoan, R., 2017. Kaposi-Sarcoma Herpesvirus Associated Cancers and Related Diseases. *Curr. Opin. HIV AIDS* 12, 47–56. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000330>
- Granato, M., Santarelli, R., Lotti, L.V., Di Renzo, L., Gonnella, R., Garufi, A., Trivedi, P., Frati, L., D’Orazi, G., Faggioni, A., Cirone, M., 2013. JNK and Macroautophagy Activation by Bortezomib Has a Pro-Survival Effect in Primary Effusion Lymphoma Cells. *PLoS ONE* 8, e75965. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075965>
- Ishikawa, C., Mori, N., 2020. The anti-malaria agent artesunate exhibits cytotoxic effects in primary effusion lymphoma. *Invest. New Drugs.* <https://doi.org/10.1007/s10637-020-00996-1>
- Johnston, B.P., McCormick, C., 2019. Herpesviruses and the Unfolded Protein Response. *Viruses* 12, 17. <https://doi.org/10.3390/v12010017>
- Kaplan, L.D., 2013. Human herpesvirus-8: Kaposi sarcoma, multicentric Castleman disease, and primary effusion lymphoma. *Hematology* 2013, 103–108. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2013.1.103>
- Kumari, S., Badana, A.K., G, M.M., G, S., Malla, R., 2018. Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival. *Biomark. Insights* 13, 117727191875539. <https://doi.org/10.1177/1177271918755391>
- Lallemand, F., Desire, N., Rozenbaum, W., Nicolas, J.-C., Marechal, V., 2000. Quantitative Analysis of Human Herpesvirus 8 Viral Load Using a Real-Time PCR Assay. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1404–1408. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.4.1404-1408.2000>
- Li, X., Feng, J., Sun, R., 2011. Oxidative Stress Induces Reactivation of Kaposi’s Sarcoma-Associated Herpesvirus and Death of Primary Effusion Lymphoma Cells. *J. Virol.* 85, 715–724. <https://doi.org/10.1128/JVI.01742-10>
- Lin, H., Liu, X., Yu, J., Hua, F., Hu, Z., 2013. Antioxidant N-Acetylcysteine Attenuates Hepatocarcinogenesis by Inhibiting ROS/ER Stress in TLR2 Deficient Mouse. *PLoS ONE* 8, e74130. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074130>

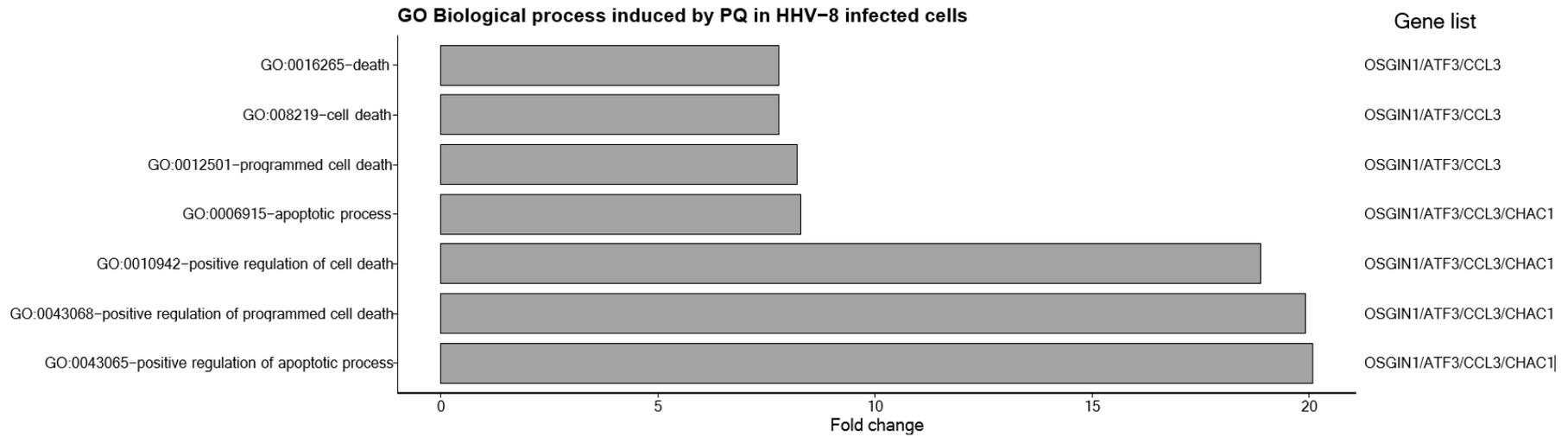
- Liou, G.-Y., Storz, P., 2010. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic. Res.* 44, 479–496. <https://doi.org/10.3109/10715761003667554>
- Lo, A.K.-F., Dawson, C.W., Young, L.S., Lo, K.-W., 2017. The role of metabolic reprogramming in γ -herpesvirus-associated oncogenesis. *Int. J. Cancer* 141, 1512–1521. <https://doi.org/10.1002/ijc.30795>
- Mahdi, A.A., Rizvi, S.H.M., Parveen, A., 2016. Role of Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Responses in Health and Diseases. *Indian J. Clin. Biochem.* 31, 127–137. <https://doi.org/10.1007/s12291-015-0502-4>
- Mariggìò, G., Koch, S., Schulz, T.F., 2017. Kaposi sarcoma herpesvirus pathogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 372, 20160275. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0275>
- Masud Alam, Md., Kariya, R., Kawaguchi, A., Matsuda, K., Kudo, E., Okada, S., 2016. Inhibition of autophagy by chloroquine induces apoptosis in primary effusion lymphoma in vitro and in vivo through induction of endoplasmic reticulum stress. *Apoptosis* 21, 1191–1201. <https://doi.org/10.1007/s10495-016-1277-7>
- Matsuno, T., Matsuno, T., Kariya, R., Kariya, R., Yano, S., Yano, S., Morino-Koga, S., Morino-Koga, S., Taura, M., Taura, M., Suico, M.A., Suico, M.A., Shimauchi, Y., Shimauchi, Y., Matsuyama, S., Matsuyama, S., Okamoto, Y., Okamoto, Y., Shuto, T., Shuto, T., Kai, H., Kai, H., Okada, S., Okada, S., 2012. Diethyldithiocarbamate induces apoptosis in HHV-8-infected primary effusion lymphoma cells via inhibition of the NF- κ B pathway. *Int. J. Oncol.* 40, 1071–1078. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1313>
- McCullough, K.D., Martindale, J.L., Klotz, L.-O., Aw, T.-Y., Holbrook, N.J., 2001. Gadd153 Sensitizes Cells to Endoplasmic Reticulum Stress by Down-Regulating Bcl2 and Perturbing the Cellular Redox State. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1249–1259. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.4.1249-1259.2001>
- Merlot, A.M., Shafie, N.H., Yu, Y., Richardson, V., Jansson, P.J., Sahni, S., Lane, D.J.R., Kovacevic, Z., Kalinowski, D.S., Richardson, D.R., 2016. Mechanism of the induction of endoplasmic reticulum stress by the anti-cancer agent, di-2-pyridylketone 4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone (Dp44mT): Activation of PERK/eIF2 α , IRE1 α , ATF6 and calmodulin kinase. *Biochem. Pharmacol.* 109, 27–47. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.04.001>
- Mungrue, I.N., Pagnon, J., Kohannim, O., Gargalovic, P.S., Lusic, A.J., 2009. CHAC1/MGC4504 Is a Novel Proapoptotic Component of the Unfolded Protein Response, Downstream of the ATF4-ATF3-CHOP Cascade. *J. Immunol.* 182, 466–476. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.1.466>
- Nakajima, S., Kitamura, M., 2013. Bidirectional regulation of NF- κ B by reactive oxygen species: A role of unfolded protein response. *Free Radic. Biol. Med.* 65, 162–174. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.020>
- Osłowski, C.M., Urano, F., 2011. Measuring ER Stress and the Unfolded Protein Response Using Mammalian Tissue Culture System, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 71–92. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385114-7.00004-0>
- Oyadomari, S., Mori, M., 2004. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.* 11, 381–389. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401373>
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, 45e–445. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Purushothaman, P., Dabral, P., Gupta, N., Sarkar, R., Verma, S.C., 2016. KSHV Genome Replication and Maintenance. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00054>
- Rochford, R., Ohrt, C., Baresel, P.C., Campo, B., Sampath, A., Magill, A.J., Tekwani, B.L., Walker, L.A., 2013. Humanized mouse model of glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency for in vivo assessment of hemolytic toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 17486–17491. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310402110>

- Rohini, M., Haritha Menon, A., Selvamurugan, N., 2018. Role of activating transcription factor 3 and its interacting proteins under physiological and pathological conditions. *Int. J. Biol. Macromol.* 120, 310–317. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.107>
- Rozpedek, W., Pytel, D., Mucha, B., Leszczynska, H., Diehl, J.A., Majsterek, I., 2016. The Role of the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP Signaling Pathway in Tumor Progression During Endoplasmic Reticulum Stress. *Curr. Mol. Med.* 16, 533–544. <https://doi.org/10.2174/1566524016666160523143937>
- Schieber, M., Chandel, N.S., 2014. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr. Biol.* 24, R453–R462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
- Shigemi, Z., Baba, Y., Hara, N., Matsuhira, J., Kagawa, H., Watanabe, T., Fujimuro, M., 2016. Effects of ER stress on unfolded protein responses, cell survival, and viral replication in primary effusion lymphoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 469, 565–572. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.12.032>
- Shigemi, Z., Manabe, K., Hara, N., Baba, Y., Hosokawa, K., Kagawa, H., Watanabe, T., Fujimuro, M., 2017. Methylseleninic acid and sodium selenite induce severe ER stress and subsequent apoptosis through UPR activation in PEL cells. *Chem. Biol. Interact.* 266, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.01.027>
- Shimada, K., Hayakawa, F., Kiyoi, H., 2018. Biology and management of primary effusion lymphoma. *Blood* 132, 1879–1888. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-03-791426>
- Sprenkle, N.T., Sims, S.G., Sánchez, C.L., Meares, G.P., 2017. Endoplasmic reticulum stress and inflammation in the central nervous system. *Mol. Neurodegener.* 12. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0183-y>
- Sun, Y., 2014. N-acetylcysteine attenuates reactive-oxygen-species-mediated endoplasmic reticulum stress during liver ischemia-reperfusion injury. *World J. Gastroenterol.* 20, 15289. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i41.15289>
- Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman, A.M., Samali, A., 2006. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep.* 7, 880–885. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400779>
- Urra, H., Dufey, E., Lisbona, F., Rojas-Rivera, D., Hetz, C., 2013. When ER stress reaches a dead end. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1833, 3507–3517. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.07.024>
- Wang, N., Zeng, G.-Z., Yin, J.-L., Bian, Z.-X., 2019. Artesunate activates the ATF4-CHOP-CHAC1 pathway and affects ferroptosis in Burkitt's Lymphoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 519, 533–539. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.09.023>
- Wu, W., Rochford, R., Toomey, L., Harrington, W., Feuer, G., 2005. Inhibition of HHV-8/KSHV infected primary effusion lymphomas in NOD/SCID mice by azidothymidine and interferon- α . *Leuk. Res.* 29, 545–555. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2004.11.010>
- Yan, L., Majerciak, V., Zheng, Z.-M., Lan, K., 2019. Towards Better Understanding of KSHV Life Cycle: from Transcription and Posttranscriptional Regulations to Pathogenesis. *Virol. Sin.* 34, 135–161. <https://doi.org/10.1007/s12250-019-00114-3>

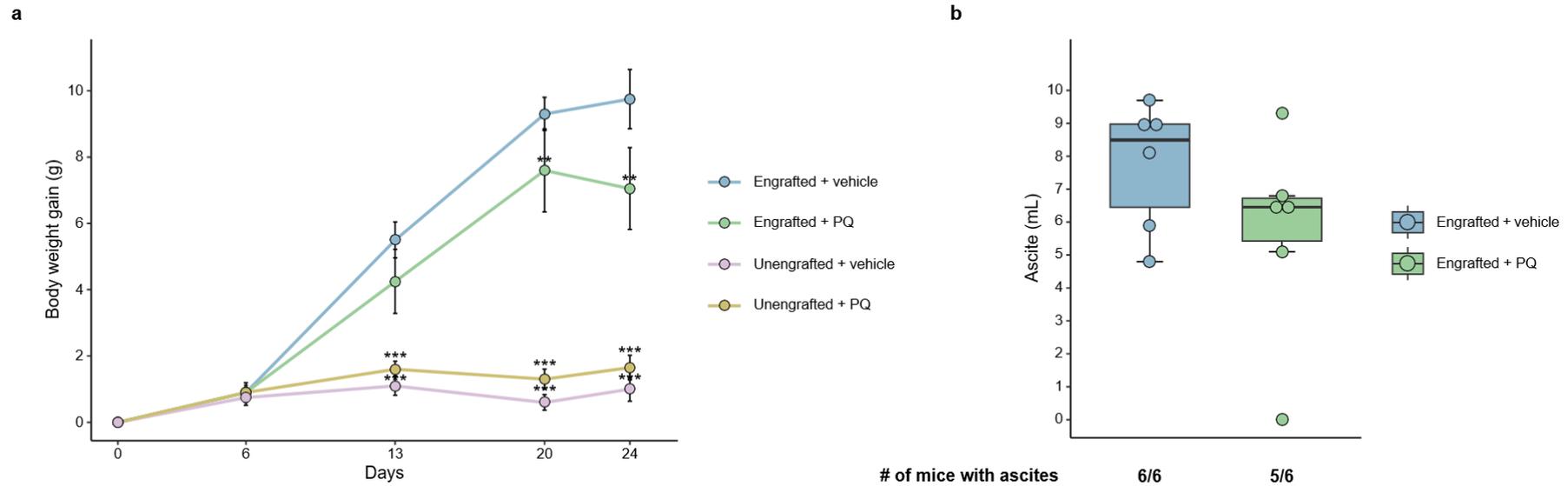
SUPPLEMENTAL MATERIAL



Supplemental Figure S1. Kinetic of cytotoxic effects of PQ on BC-3 cell line. HHV-8-infected PEL cell lines, BC-3, were incubated with 10µM or 20µM of PQ for 12h, 24h, 48h and 72h. Cell viability was assessed by CellTiter Glo 2.0 and trypan blue exclusion assays, expressed as mean relative to the untreated control cells. The number of viable cells in untreated cells on each time point was considered as 100%. Data represent S.E.M of triplicate cultures.



Supplemental Figure S2. Pathway enrichment analysis from RNA-sequencing analysis. Pathway enrichment (Gene Ontology, GO) analysis of differentially modulated genes classified by their biological functions and arranged according to their fold change. Pathway enrichment analysis was conducted with Fisher test using R package (clusterProfiler). The 7 most significant ($P < 0.05$) biological process Gene Ontology (GO) terms, their fold change, and gene list are shown.



Supplemental Figure S3. PQ reduced PEL progression in a NOD/SCID mice PEL model. 2×10^7 BC-3 cells (Engrafted) or PBS (Unengrafted) were injected intraperitoneally (i.p) in NOD/SCID mice (n=6 per group). Beginning 24h later, PQ (12.5mg/kg) or PBS (vehicle) were administered i.p 3 days per week. **(a)** The body weight of each mouse was recorded every week. Median body weight gain of mice are represented for each indicated group from 0 to 24 days after BC-3 cells injection. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ (two-way ANOVA analysis and Tukey's multiple comparisons test). **(b)** Distribution of tumor ascites volume are represented with a box plot within engrafted + PQ and engrafted + vehicle groups. Ascites incidence is also showed for each group.

Gene	Sequences
OSGIN1	GCCTGGCACTCCATCGAA
	TTCGCTTCTTCTGCATCCAGT
ATF3	CAAAAGCCGAGGTAGCCCC
	CAGGCACTCCGTCTTCTCC
CHAC1	GCAGGGAGACACCTTCCATC
	GTATGCCACGCCCAAGTG
CCL3	CATCACTTGCTGCTGACACG
	CTGGCTGCTCGTCTCAAAGT
CHOP	AGAACCAGGAAACGGAAACAGA
	TCTCCTTCATGCGCTGCTTT
β-actin	CCAGCTCACCATGGATGATG
	ATGCCGGAGCCGTTGTC

Supplemental Table 1. List of primers used for qRT-PCR. qRT-PCR, real time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction; *OSGIN1*, oxidative stress-induced growth inhibitor 1; *ATF3*, activating transcription factor; *CHAC1*, cation transport regulator-like 1; *CCL3*, *MIP-1-α*, macrophage inflammatory protein1-α; *CHOP*, C/EBP homologous protein.

	Baseline	Month 2	Month 3	Month 4
Patient #1. 15mg PQ/OD	16 KS lesions	18 new KS lesions 2 disappearance Withdrawn		
	Lymphedema right and left legs	Clinical improvement		
Patient #2. 15 mg PQ/OD	8 KS lesions		5/8 KS lesions improved	
	No Lymphedema		No Lymphedema	
Patient #3. 15 mg PQ/BID	6 KS Lesions		5/6 KS lesions improved	
	Lymphedema right foot		Clinical improvement	
Patient #4. 15 mg PQ/BID	4 KS Lesions		3/4 KS Lesions disappearance	All lesions cured
	Lymphedema right leg and right foot		Clinical improvement	Complete disappearance

Supplemental Table 2. Summary of clinical trial results from a proof-of-concept trial in human harboring severe Kaposi's sarcoma. Information collected from listed references or oral communication with the treating dermatologists. OD, once a day; BID, twice a day; KS, Kaposi's sarcoma; PQ, Primaquine diphosphate.

Conclusion, discussion et perspectives

1 L'induction de la mort par apoptose des cellules infectées de manière latente par le virus HHV-8: une stratégie anti-tumorale ciblée

L'objectif de ce projet de thèse était d'identifier une ou plusieurs nouvelles molécules pour le traitement des cancers associés au virus HHV-8 (KS, PEL ou MCD), capables d'induire la mort par apoptose spécifiquement chez les cellules infectées par le virus HHV-8.

De nombreuses thérapies anti-tumorales, telles que les chimiothérapies, agissent en induisant la mort par apoptose des cellules tumorales. Ces différentes molécules ciblent les mécanismes moléculaires de l'apoptose cellulaire incluant, les récepteurs de morts, l'activation des caspases, l'induction de suppresseurs de tumeur (tels que le p53), la modulation de médiateurs pro- ou anti-apoptotiques, ou encore la perturbation de l'équilibre redox (65,67). Cependant, leur principale limite est liée à leur importante toxicité sur les tissus sains. C'est également ce que l'on observe avec les thérapies cytotoxiques utilisées actuellement dans le traitement du PEL ou du KS.

La présence continue du virus HHV-8 au sein des cellules tumorales du KS, PEL ou MCD est indispensable au développement tumoral (4). De plus, de la même façon que pour toutes cellules tumorales, l'inhibition des voies apoptotiques par les protéines virales latentes de l'HHV-8, fait partie des principales stratégies de tumorigénèse de ce virus oncogène (68). Il apparaît ainsi que les mécanismes impliqués dans la survie des cellules infectées par le virus HHV-8 en phase de latence représentent une cible stratégique de thérapie anti-tumorale. En effet, plusieurs candidats thérapeutiques anti-PEL et/ou anti-KS induisent la mort par apoptose *in vitro* des cellules tumorales infectées par le virus HHV-8, l'un d'entre eux étant un inhibiteur du protéasome, le bortézomib (16,30,41,57,60,62,65,67,79,83–89).

Afin d'identifier un nouvel agent thérapeutique, nous avons utilisé comme modèle *in vitro*, une lignée cellulaire de PEL, les cellules BC-3 qui sont majoritairement infectée par le virus HHV-8 en phase de latence. Nous avons montré que la primaquine diphosphate, un médicament utilisé dans le traitement du paludisme, présentait un index de sélectivité pouvant aller jusqu'à 67 chez les cellules non-infectées par le virus HHV-8. L'activation des caspases, spécifiquement chez les lignées cellulaires PEL, nous a permis de considérer l'implication

majeure de l'apoptose dans l'effet cytotoxique de la primaquine sur les cellules infectées par l'HHV-8.

2 Implication du stress oxydatif et du stress du réticulum endoplasmique dans l'effet pro-apoptotique de la primaquine sur les cellules PEL

Il est important de souligner que les cellules tumorales, malgré leur phénotype d'immortalité, sont en réalité bien plus vulnérables à la mort cellulaire, et donc aux thérapies inductrices d'apoptose, que les cellules saines. Ce paradoxe s'explique notamment par le fait que la cellule tumorale est confrontée perpétuellement à des stress inhérents, qui augmentent sa sensibilité à initier les mécanismes pro-apoptotiques. De tels stress incluent l'expression oncogénique et les stress environnementaux (tels que l'hypoxie, la faible disponibilité en nutriments) (65), mais aussi, un hyper-métabolisme qui induit un stress oxydatif (73) et une forte synthèse en protéines dû à leur hyper-prolifération, pouvant engendrer un stress du réticulum endoplasmique et l'activation de l'UPR (*Unfolded Protein Response*) (90,91).

La mort cellulaire médiée par le stress oxydatif

Les cellules tumorales se caractérisent par un métabolisme élevé et une forte production de ROS qui sont impliqués dans la progression tumorale (70,73). Toutefois, un stress oxydatif important peut conduire à la mort des cellules et les cellules tumorales vont alors utiliser leur système anti-oxydatif pour éliminer l'excès de ROS produit (74,92). Il en résulte qu'une induction importante de ROS rend les cellules tumorales particulièrement vulnérables. Ainsi, l'utilisation de molécules pro-oxydatives capables d'exacerber le niveau cellulaire en ROS ou de molécules contribuant à la diminution du système anti-oxydatif intracellulaire peut représenter une stratégie pour induire l'apoptose des cellules tumorales (70–74).

Dans notre étude, nous avons démontré que la primaquine induit un stress oxydatif de manière dose-dépendante. Celui-ci est caractérisé par une augmentation en H₂O₂, une déplétion en glutathion réduit (GSH, l'un des principaux antioxydants) et une cytotoxicité très importante des cellules PEL. De plus, le prétraitement des cellules PEL avec l'antioxydant *N*-acétylcystéine (NAC) nous a permis d'inhiber l'effet cytotoxique et pro-apoptotique de la primaquine, suggérant le rôle fondamental du stress oxydatif dans la mort des cellules PEL *in*

vitro. En effet, il a été montré *in vitro* avec diverses autres molécules, l'implication du stress oxydatif dans la mort des cellules PEL, ainsi que le rôle protecteur de la NAC (79,82,83,86,87). Nous avons également observé une augmentation de l'expression transcriptionnelle de l'*OSGIN1* après traitement des cellules PEL par la primaquine. *OSGIN1* est un suppresseur de tumeur activé par le stress oxydatif, dont l'augmentation de l'expression a auparavant été rapportée dans l'effet pro-apoptotique de la sulfasalazine (SASP) sur des lignées PEL (79,93). Cependant, il est important de souligner que nous avons étudié l'impact de la primaquine sur les niveaux de l' H_2O_2 et de la GSH. Il serait intéressant d'évaluer son effet sur d'autres types de ROS qui participent également aux processus de mort cellulaire (71).

Implication des mécanismes pro-apoptotiques de l'UPR et du stress du réticulum endoplasmique dans l'effet pro-apoptotique de la primaquine

L'homéostasie du réticulum endoplasmique requiert un bon équilibre des niveaux en ATP, en calcium et un environnement oxydant favorable à la formation des ponts disulfures des protéines synthétisées (91,94). Divers facteurs génétiques ou environnementaux peuvent perturber son homéostasie, entraînant alors l'accumulation et l'agrégation de protéines malformées ou dysfonctionnelles, c'est ce qui correspond au stress du réticulum endoplasmique (91,94,95). En réponse à ce stress du réticulum endoplasmique, la cellule va activer l'UPR, qui permet de rétablir l'homéostasie du réticulum endoplasmique et donc la survie de la cellule en limitant les effets délétères du stress du réticulum endoplasmique. En revanche, si le stress du réticulum est trop sévère ou persistant, la signalisation de l'UPR passera de pro-survie à pro-apoptotique conduisant à la mort de la cellule endommagée (90,91,95–98).

L'hyper-prolifération de la cellule tumorale induit une augmentation de la synthèse protéique, pouvant conduire à un stress du réticulum endoplasmique et à l'activation de l'UPR (94,99,100). De ce fait, il a été observé une plus grande sensibilité aux agents inducteurs de stress du réticulum endoplasmique des cellules tumorales (94,96) et un intérêt croissant pour ces agents comme stratégie thérapeutique d'élimination de ces cellules (84,94,101), y compris dans le PEL (62,84,86,102).

La signalisation pro-apoptotique de l'UPR est contrôlée, entre autres, par le facteur de transcription CHOP et la kinase JNK activée par la protéine ASK1 (*Apoptosis signal-regulating kinase 1*). Ces deux facteurs sont capables d'induire l'activation des caspases exécutrices (caspases-3 et -7) et ainsi l'apoptose de la cellule (90,91,103). Bien que son mécanisme

demeure encore peu connu, de nombreuses études rapportent également l'activation directe des caspases-4 par le stress sévère du réticulum endoplasmique conduisant à l'apoptose de la cellule (90,91,95,96,99,103–105).

Nous avons montré l'induction de l'expression de *CHOP*, ainsi que celles de *CHAC1* et *ATF3*. Il a été montré qu'au sein des voies pro-apoptotiques de l'UPR, *CHAC1* pouvait servir de médiateur dans la transmission du signal pro-apoptotique de ces deux facteurs de transcription, *CHOP* et *ATF3* (99,105–109). Nous avons également démontré l'activation des caspases-4. Ces résultats suggèrent que l'activité pro-apoptotique de la primaquine dans les lignées PEL pourrait être liée à l'activation des voies pro-apoptotiques de l'UPR liées à un stress sévère du réticulum endoplasmique.

De manière intéressante, il a été rapporté que la chloroquine, une molécule appartenant à la même famille des quinoléines que la primaquine et utilisée comme antipaludéen, induisait la mort par apoptose des cellules PEL spécifiquement par le mécanisme du stress du réticulum endoplasmique et de l'UPR pro-apoptotique (84). Ces données sont donc en accord avec le rôle du stress du réticulum endoplasmique/UPR pro-apoptotique dans l'effet pro-apoptotique de la primaquine sur les cellules infectées par HHV-8.

Par ailleurs, il est important de rappeler qu'il existe une interaction entre les réponses apoptotiques au stress oxydatif et au stress du réticulum endoplasmique (90,94,96,105). En effet il a été montré que la production de ROS pouvait induire un stress du réticulum endoplasmique et conduire à l'apoptose des cellules (90,92,99,110). D'autre part, plusieurs études ont démontré qu'une augmentation de l'expression de *CHOP* pouvait augmenter les niveaux de ROS et/ou diminuer la GSH, sensibilisant alors la cellule à l'induction de l'apoptose sous stress du réticulum endoplasmique (90,92,108,111). Il est donc vraisemblable que ces deux mécanismes, le stress oxydatif et le stress du réticulum endoplasmique, au moins, soient impliqués dans les mécanismes d'action de la primaquine sur les cellules PEL.

D'autres investigations permettraient de mieux appréhender l'ensemble de ces mécanismes, notamment par l'étude au niveau protéique de l'activation des principaux initiateurs de la réponse UPR dans les cellules PEL traitées à la primaquine. Mais aussi, en évaluant l'effet pro-apoptotique de la primaquine suite au prétraitement des cellules avec un inhibiteur du stress du réticulum endoplasmique et/ou de *CHOP*. Nous pourrions également étudier le niveau de

protéines oxydées au niveau du réticulum endoplasmique, permettant ainsi de d'évaluer le lien entre le stress du réticulum endoplasmique et le stress oxydatif.

La production virale de l'HHV-8 chez les lignées PEL traitées à la primaquine

Dans notre étude, nous avons observé, après 48h de traitement par la primaquine, une augmentation de la production de virions extracellulaires dans les cultures de cellules PEL. La latence étant l'état d'infection par défaut du virus HHV-8 chez les cellules tumorales, il faut normalement compter 4-5 jours pour réactiver le virus HHV-8 *in vitro* par des agents inducteurs de réactivation virale, tels que le TPA ou le butyrate (26,27). En revanche, des molécules inductrices de mort cellulaire, notamment celles inductrices de mort médiée par un stress oxydatif, telles que la SASP (79), peuvent induire une réactivation virale beaucoup plus rapidement (en 24-48h). Etant donné que la survie du virus HHV-8 à l'état latent dépend entièrement de celle de la cellule hôte, dès lors que le virus détectera que la cellule subit un stress potentiellement nocif, il mettra tout en œuvre pour s'échapper de cette cellule. Aussi, le fait que la persistance de l'effet pro-oxydatif et pro-apoptotique de la primaquine induise une augmentation partielle de la production de particules virales dans les lignées PEL est possible.

Il peut être également envisagé que la primaquine stimule la libération de virions déjà formés dans la population de cellules PEL en phase lytique. En effet, si la grande majorité des cellules tumorales sont infectées par le virus à l'état latent, une petite proportion d'entre elles (1-3%) subit des réactivations virales lytiques spontanées. Or, il a été montré que l'induction d'un stress du réticulum endoplasmique favorisait l'expression des gènes lytiques et la production virale dans les seules cellules PEL infectées par le virus en phase lytique (102).

Néanmoins, nos résultats *in vitro* montrent qu'après 24h de traitement par la primaquine, les mécanismes de mort cellulaire et d'apoptose sont déjà largement enclenchés, sans augmentation de l'expression des gènes viraux lytiques ni de production virale. Ces données suggèrent donc que l'induction de mort cellulaire massive induite par la primaquine sur les cellules PEL est indépendante d'une réactivation virale lytique. De plus, aucune augmentation du nombre de copies de virus HHV-8 par cellules n'a été observée dans la cavité intrapéritonéale des souris traitées à la primaquine comparé à celles non-traitées. Il serait tout de même intéressant de mesurer *in vitro* l'expression transcriptomique des gènes viraux de réactivation virale lytique, tels que le RTA à des temps plus tardifs (24h et 48h) dans les lignées PEL traitées par la primaquine.

Ainsi, notre étude a permis de mettre en évidence que le stress oxydatif et le stress du réticulum endoplasmique associé à la réponse UPR pro-apoptotique semblent prendre part à l'effet pro-apoptotique de la primaquine sur les cellules PEL.

3 Les acteurs pouvant être impliqués dans l'effet pro-apoptotique de la primaquine sur les cellules infectées par HHV-8

Afin d'identifier d'autres acteurs impliqués dans les mécanismes moléculaires apoptotiques induits par la primaquine, nous avons mesuré les niveaux d'induction et d'activation des protéines cellulaires impliqués dans les voies de l'apoptose en déterminant leurs phosphorylations par Western-blot par la technique « Apoptosis phospho antibody array ». Trois acteurs majeurs des voies de l'apoptose ont montré des résultats préliminaires intéressants : le suppresseur de tumeur p53 et le facteur de transcription NF- κ B, tous deux grandement impliqués dans la dérégulation des voies apoptotiques cellulaires par le virus HHV-8 (16,49,68), et la protéine kinase JNK, acteur clé dans l'induction de la mort cellulaire médiée par le stress oxydatif et/ou le stress du réticulum endoplasmique (75,112).

JNK (c-Jun N-terminal kinase ou stress-activated protein kinase)

Il a été montré que la protéine JNK présente un caractère dual. Elle est à la fois impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire que dans celle de l'apoptose (70,75,113). L'orientation vers l'un ou l'autre de ces processus biologiques dépend de la nature du stimulus à l'origine de son activation, de ses gènes cibles et du type cellulaire impliqué (75,113).

Nous avons observé l'activation des protéines JNK (1, 2 et 3), ainsi que celle de la protéine kinase MAP2K7, maillon de la cascade d'activation de JNK, après 10h et 20h de traitement des cellules BC-3 à la primaquine. Ces données suggèrent que l'ensemble de la voie de signalisation de JNK est impliqué dans les mécanismes d'actions pro-apoptotiques de la primaquine.

Ces résultats sont d'autant plus intéressants qu'il a été montré que le stress oxydatif et le stress du réticulum endoplasmique pouvaient conduire à l'induction de l'apoptose *via* l'activation de la protéine JNK. En effet, il a été rapporté que sous signaux pro-apoptotiques (tels que les chimiothérapies, les UV ou encore certaines cytokines), l'augmentation intracellulaire des ROS et/ou la déplétion de la GSH pouvaient conduire à l'activation de JNK (principalement *via* la

kinase ASK1), résultant à l'apoptose de la cellule (70,71,75,92,112). Par ailleurs, il a été démontré que l'activation soutenue de JNK était impliquée dans plusieurs voies de signalisation pro-apoptotiques de l'UPR, incluant la voie IRE1 α -TRAF2-ASK1 et la voie de CHOP, toutes deux pouvant fonctionner de façon synergique, favorisant alors les fonctions pro-apoptotiques de JNK (91,112,114).

Le suppresseur de tumeur p53

Le suppresseur de tumeur p53 joue un rôle crucial dans la préservation de l'intégrité génomique. En réponse à des agents endommageant l'ADN (chimiothérapies, UV, radiations, stress oxydatif), il est capable de bloquer la progression du cycle cellulaire ou d'activer l'apoptose (65,67,68,115). Il est intéressant de noter que p53 est soit inhibé soit défectueux chez plus de la moitié des cancers humains (64,67). Dans le cas des cancers associés à l'HHV-8, les fonctions pro-apoptotiques et pro-prolifératives de p53 sont inhibées par les protéines virales LANA, v-Cycline ou les vIRFs (3,60,64,68). Il a été démontré par ailleurs que la phosphorylation du p53 au niveau de la sérine 37 jouait un rôle important dans la stabilisation de son expression et dans son activation (115). Dans notre étude, nous avons observé que p53 est activé par la phosphorylation de la sérine 37 après 4h, 10h et 20h de traitement des BC-3 par la primaquine. Ces résultats suggèrent que p53 pourrait être impliqué dans les mécanismes pro-apoptotiques de la primaquine chez les cellules infectées par l'HHV-8.

Le facteur de transcription pro-survie NF- κ B

Le facteur de transcription NF- κ B régule la transcription de gènes impliqués dans de nombreux processus physiologiques, incluant l'inflammation, la réponse immunitaire, le cycle cellulaire, la prolifération et la mort cellulaire (116). Les cellules tumorales infectées par l'HHV-8 sont caractérisées par une activation constitutive de la voie de NF- κ B grâce à l'action de la protéine virale v-FLIP, conduisant à l'inhibition de la réactivation virale et de l'apoptose, contribuant ainsi à la survie de la cellule infectée en latence (3,49,68,117).

Dans notre étude, les résultats obtenus ont été variables selon les différentes sous-unités du NF- κ B et ne nous ont pas permis de conclure quant à l'action directe ou non de la primaquine sur le facteur NF- κ B. Néanmoins, ils nous invitent à poursuivre les investigations concernant cette voie, étant donné d'une part, l'implication majeure de NF- κ B dans la survie des cellules tumorales infectées par l'HHV-8 et d'autre part, dans l'induction de la mort cellulaire médiée par le stress oxydatif. En effet, le NF- κ B inhibe la production de ROS intracellulaire et protège

la cellule d'une mort induite par stress oxydatif (117,118). Aussi, étant donné l'implication du stress oxydatif dans la mort induite par le primaquine sur les cellules PEL, il serait intéressant d'étudier si ce mécanisme passerait en partie par l'inhibition de la voie de NF- κ B.

Il est important de souligner que ces données ne représentent que des résultats préliminaires, car la régulation et l'activation de ces facteurs est complexe. De plus, leur implication dans les divers processus biologiques dépend de nombreux paramètres, comme le type d'activation de ces facteurs (c'est-à-dire des sites de phosphorylations concernés), la nature des stimuli, des cellules, mais aussi des cibles activées par ces facteurs. Ces résultats fournissent néanmoins des pistes intéressantes d'investigations quant aux mécanismes d'actions mis en jeu dans l'effet cytotoxique spécifique de la primaquine dans les cellules infectées par l'HHV-8.

4 Apoptose *versus* d'autres types de mort cellulaire ?

Nous avons montré que la primaquine induit la mort de près de 100% des lignées PEL après 48h de culture, avec l'activation des caspases comme marqueur du processus pro-apoptotique des cellules PEL (cette étude et 65,83,86,102,119). En parallèle, nous n'avons pas observé d'activation des caspases exécutrices ni de cytotoxicité dans la lignée de lymphome de Burkitt non-infectée par le virus HHV-8 traitées par la primaquine. Ces résultats suggèrent que l'apoptose joue un rôle majeur dans l'induction spécifique de la mort des cellules PEL.

Il faut cependant souligner que le but de notre étude portait sur la recherche d'une molécule thérapeutique capable d'induire spécifiquement une apoptose chez les cellules infectées par l'HHV-8. C'est donc exclusivement sur ce type de mort cellulaire et sur ses marqueurs associés que se sont portées nos investigations. En conséquence, nous ne pouvons pas écarter la mise en place d'autres types de mort cellulaires dans l'effet cytotoxique de la primaquine.

D'une manière générale, l'apoptose est prédominante pour la mort des cellules tumorales en réponses à des agents cytotoxiques. Pour autant, d'autres types de mort cellulaires ont été décrits dans l'élimination des cellules cancéreuses, comme la pyroptose, la nécrose, la nécroptose et la ferroptose (65,67,74). Bien que certains de ces types de mort cellulaires soient, tout comme l'apoptose, des formes programmées de mort cellulaire, elles s'accompagnent généralement d'une réaction inflammatoire (74,105,119–121). De plus, il a été rapporté que

l'induction d'un stress oxydatif et/ou d'un stress du réticulum endoplasmique sévère par le traitement antipaludéen artesunate, pouvait conduire à la mort des cellules PEL par apoptose nécroptose et ferroptose (83,105).

Par ailleurs, nous avons pu observer que le prétraitement des cellules BC-3 par la NAC, en présence d'une plus forte dose de primaquine (20 μ M), inhibait complètement l'activation des caspases exécutrices. Cependant, dans ces conditions, seules 40% des cellules PEL étaient viables. Ces résultats suggèrent donc que d'autres types de morts cellulaires médiées par les ROS pourraient être impliqués dans l'effet cytotoxique de la primaquine sur les cellules PEL. La recherche d'autres mécanismes cytotoxiques liés à la primaquine avec l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la nécroptose ou de la ferroptose sera mise en œuvre.

5 Spécificité d'action de la primaquine sur les cellules infectées par le virus HHV-8

Au cours de cette étude, nous avons pu mettre en évidence *in vitro* la spécificité d'action de la primaquine sur plusieurs plans : au niveau phénotypique (cytotoxicité), au niveau protéique (activation des caspases) et au niveau moléculaire (induction de l'expression du facteur pro-apoptotique de la réponse UPR, *CHOP*). Nous nous sommes donc interrogés sur les mécanismes possibles mis en œuvre dans la spécificité d'action de la primaquine et deux hypothèses principales sont envisagées.

Hypersensibilité des cellules infectées par l'HHV-8 au stress oxydatif

La première hypothèse concerne les capacités pro-oxydatives de la primaquine, et serait que les cellules infectées par le virus HHV-8 présenteraient une hypersensibilité au stress oxydatif conduisant à leur mort. Cette hypothèse est étayée par le fait qu'un grand nombre d'études *in vitro* ont démontré que leurs candidats thérapeutiques contre le PEL induisaient une mort cellulaire médiée par un stress oxydatif (79,83,86,93,105).

Nous avons montré que l'effet pro-oxydatif de la primaquine induisait une action pro-apoptotique sur les cellules PEL. Bien que la propriété pro-oxydative de la primaquine ait été rapporté dans diverses études (122,123), nous n'avons observé aucun effet toxique de la primaquine sur divers types cellulaires, tumorales ou primaires, non-infectées par l'HHV-8.

Ces résultats sont corroborés par le fait que la primaquine, administrée à des millions de personnes à travers le monde depuis les années 50, est très bien tolérée sans générer d'effets secondaires, dès lors qu'ils ne présentent pas de déficience en G6PD (glucose 6-phosphate dehydrogenase). Ces données suggèrent qu'il existe une vulnérabilité des cellules PEL infectées par l'HHV-8 à la propriété pro-oxydative de la primaquine.

Il serait possible que cette hypersensibilité au stress oxydatif soit liée à un niveau de ROS intracellulaire plus important dans les cellules infectées par le virus HHV-8 que celui retrouvé dans les cellules non-infectées. En effet, dans un autre modèle d'infection virale, il a été rapporté que les cellules tumorales de lymphome de Burkitt infectées par l'EBV présentaient une quantité bien plus importante de ROS comparée à celles non-infectées par l'EBV (77). En conséquence, l'exacerbation du niveau de production de ROS induite par la primaquine conduirait à la mort spécifique des cellules infectées par l'HHV-8.

Une autre suggestion pouvant expliquer cette hypersensibilité au stress oxydatif serait liée à une défaillance du système anti-oxydatif des cellules infectées par l'HHV-8, causé par la primaquine et/ou intrinsèque à la cellule infectée par l'HHV-8. En effet, la déplétion en GSH est connue pour sensibiliser la cellule à une mort par apoptose, lorsque celle-ci est soumise à divers stress ou signaux pro-apoptotiques (79,92,105,109). Il a d'ailleurs été montré que la mortalité des cellules PEL induite par le traitement au diethyl maleate, était associée à une forte déplétion en GSH (82).

Nous avons montré une déplétion en GSH en présence de primaquine. En revanche, l'incapacité de la NAC à restaurer le niveau en GSH pourrait être liée à une fonctionnalité altérée de la GSH dans les cellules PEL traitées par la primaquine. En effet, le seul effet toxique rapporté de la primaquine chez l'Homme est son action hémolytique aigüe chez les personnes présentant une déficience en G6PD. Or, c'est cette absence en G6PD, faisant baisser le niveau intracellulaire en GSH, qui expose les globules rouges à de sévères dommages oxydatifs et donc à une hémolyse en présence de molécules pro-oxydatives telles que la primaquine (122,124,125). En conséquence, une défaillance du système anti-oxydatif du glutathion dans la cellule infectée par le virus HHV-8 et/ou induit par le traitement à la primaquine, pourrait rendre ces cellules plus vulnérables au stress oxydatif et conduire à leur mort.

Hypersensibilité des cellules infectées par l'HHV-8 au stress du réticulum endoplasmique

Une autre hypothèse serait l'hypersensibilité des cellules infectées par l'HHV-8 au stress du réticulum endoplasmique, se manifestant par l'activation des voies pro-apoptotiques de l'UPR conduisant à la mort par apoptose de la cellule.

En effet, au cours de notre étude nous avons montré que le traitement par la primaquine induisait une augmentation de l'expression de *CHOP*, le principal facteur initiateur des voies pro-apoptotiques de l'UPR, dans les cellules PEL et non pas dans les cellules de lymphome de Burkitt non-infectées par l'HHV-8.

L'UPR est un mécanisme pro-survie activé par la cellule afin de se protéger des effets nocifs d'un stress du réticulum endoplasmique. Or, il a été rapporté que les cellules PEL présentaient une activation limitée de la réponse UPR (126,127). Plusieurs études ont suggéré que les cellules PEL étaient plus sensibles aux agents inducteurs d'un stress sévère du réticulum endoplasmique du fait de la sous-expression des principaux médiateurs de la réponse UPR. Les protéines virales v-Cycline et LANA participeraient notamment à cette inhibition de leur expression (62,86,89,90,102).

Il serait donc possible qu'un dysfonctionnement au niveau de la réponse UPR induit par le traitement à la primaquine et/ou intrinsèque à la cellule infectée par l'HHV-8 puisse favoriser l'induction d'une apoptose médiée par un stress du réticulum endoplasmique.

Pour conclure, sans occulter la nécessité d'expérimentations complémentaires, certaines pistes se dessinent quant aux mécanismes d'action mis en jeu dans l'effet cytotoxique spécifique de la primaquine sur les cellules infectées par le virus HHV-8 (*voir figure 22.*). Aux vues des résultats obtenus, la primaquine semble initier de multiples mécanismes dont la combinaison induirait la mort de ces cellules.

Il est important de souligner que les investigations concernant la caractérisation *in vitro* des mécanismes moléculaires mis en jeu par la primaquine ont été faites exclusivement sur des cellules de PEL de type lymphoïde et non pas sur des cellules de Kaposi de type endothélial. Néanmoins, rappelons que les profils d'expressions géniques viraux et les mécanismes sous-jacents à l'inhibition de l'apoptose chez les cellules infectées par le virus HHV-8 à l'état latent sont très similaires entre les cellules lymphoïdes B du PEL et les cellules endothéliales du KS

(18,27,28). Ainsi en partant de ce postulat, une molécule capable d'induire la mort par apoptose spécifiquement chez les lignées PEL le pourrait également chez les cellules de Kaposi.

Les résultats *in vivo* très encourageants, concernant d'une part, l'efficacité anti-tumorale de la primaquine chez un modèle de souris PEL et chez des patients atteints de maladie de Kaposi sévère et d'autre part, l'absence total d'effets secondaires, suggèrent que son effet est bien spécifique des cellules tumorales infectées par l'HHV-8.

Ces études précliniques et cliniques permettent donc de considérer la primaquine diphosphate comme un nouveau candidat très prometteur dans le traitement des cancers associés à l'HHV-8, et encouragent à poursuivre nos investigations.

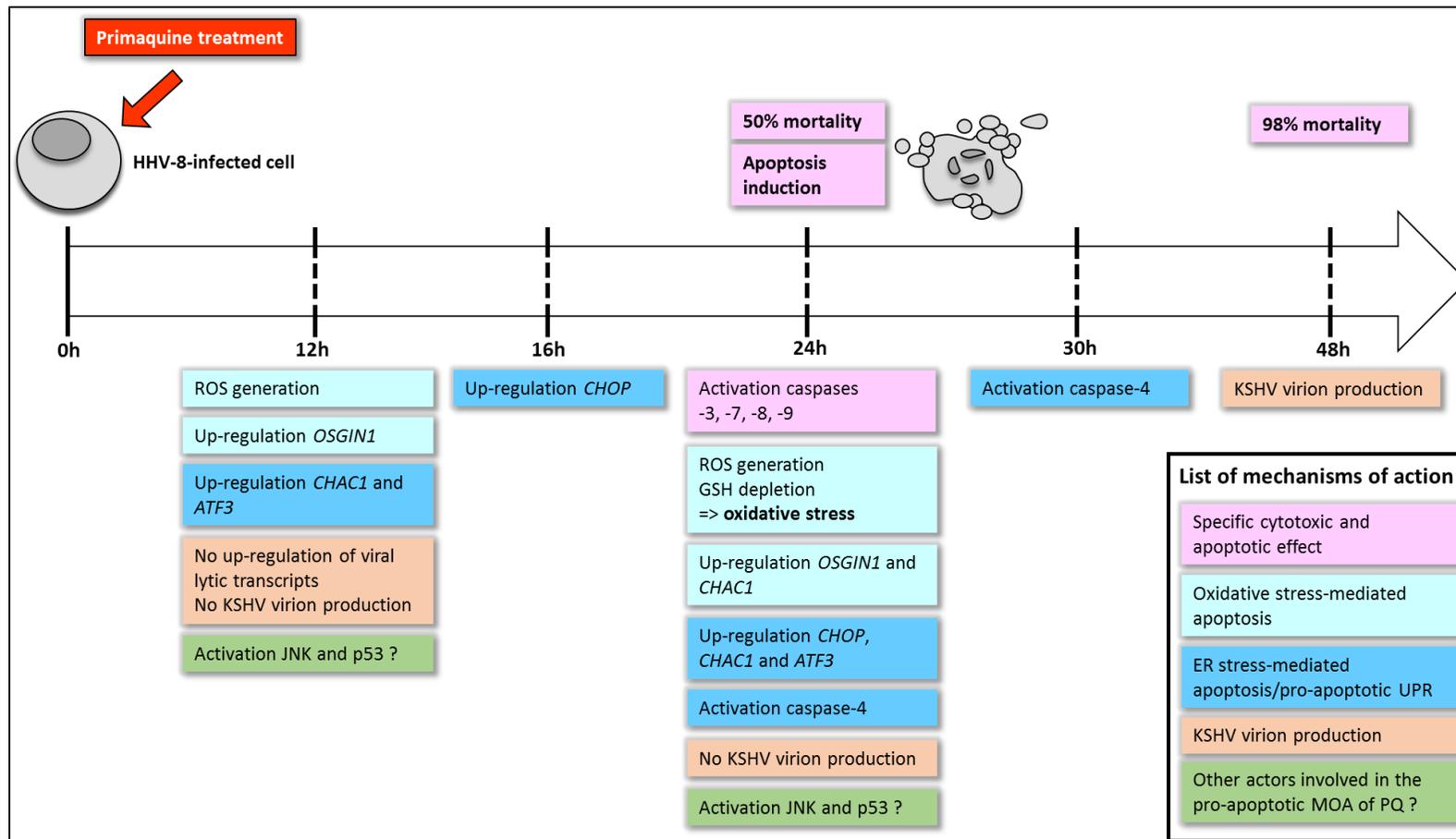


Figure 22. Résumé des mécanismes possibles d'actions mis en jeu dans l'effet cytotoxique de la primaquine sur les cellules infectées par le virus HHV-8. La primaquine induit la mortalité spécifique des lignées cellulaires de PEL infectées par l'HHV-8, avec une diminution de la viabilité cellulaire de 50% et de 98% après 24h et 48h de traitement respectivement. L'activation des caspases initiatrices (caspases-8 et -9) et exécutrices (caspases-3 et -7) après 24h de traitement par la primaquine spécifiquement dans les lignées PEL, indique l'implication de l'apoptose dans l'effet cytotoxique de la primaquine. L'induction d'un stress oxydatif par la primaquine dans les cellules PEL se caractérise par une augmentation du niveau de ROS, une déplétion en glutathion réduit (GSH) après 24h de traitement, se rajoutant à la cytotoxicité induite par la primaquine. Le prétraitement des cellules PEL avec l'antioxydant *N*-acétylcystéine inhibe l'effet cytotoxique et pro-apoptotique de la primaquine. De plus, l'expression transcriptionnelle de l'*OSGIN1*, un suppresseur de tumeur activé par le stress oxydatif, est augmentée après 12h de traitement par la primaquine. Le stress oxydatif contribuerait donc grandement à l'effet cytotoxique de la primaquine sur les cellules PEL. Par ailleurs, l'induction spécifique de l'expression de *CHOP*, de *CHAC1* et d'*ATF3*, ainsi que l'activation des caspases-4 en présence de primaquine, suggèrent que les voies pro-apoptotiques de l'UPR liées à un stress sévère du réticulum endoplasmique, puissent être impliquées dans le processus apoptotique de la primaquine dans les lignées PEL. L'absence d'augmentation de l'expression des gènes viraux lytiques et de la production virale après 24h de traitement, bien que les mécanismes de mort cellulaire et d'apoptose soient déjà largement enclenchés, suggèrent que l'induction de mort cellulaire massive induite par la primaquine sur les cellules PEL est indépendante d'une réactivation virale lytique. L'augmentation de la production de virions extracellulaires observée après 48h de traitement serait plutôt une conséquence de la persistance de l'effet pro-oxydatif et pro-apoptotique de la primaquine. Enfin, l'activation par phosphorylation du suppresseur de tumeur p53 et du facteur de transcription JNK après 12h de traitement, suggèrent leur implication dans les mécanismes d'actions de la primaquine sur les cellules infectées par le virus HHV-8.

Table des illustrations

Figure 1. Arbre phylogénétique des principaux herpès virus.....	12
Figure 2. Représentation schématique de la structure virale de l'HHV-8.	12
Figure 3. Carte du génome de l'HHV-8.....	13
Figure 4. Représentation schématique du cycle de vie de l'HHV-8 chez une cellule infectée	16
Figure 5. Cycle viral de l'HHV-8.....	18
Figure 6. L'infection de cellules endothéliales par le virus HHV-8 entraîne la formation de <i>spindle cells</i>	20
Figure 7. Oncoprotéines virales et leur implication dans la pathogénèse associée au virus HHV-8 chez des souris transgéniques.....	22
Figure 8. Taux de séroprévalence du virus HHV-8.	25
Figure 9. Les principales étapes de découverte des cinq formes épidémiologiques de la maladie de Kaposi.....	27
Figure 10. Taux d'incidence du KS par 100 000 hommes (standardisé selon l'âge).....	28
Figure 11. Caractéristiques cliniques et histologiques de la maladie de Kaposi.....	29
Figure 12. Histopathologie du lymphome primitif des séreuses.....	31
Figure 13. La maladie de Castleman multicentrique associée à l'HHV-8 avec des agrégats plasmablastiques.....	32
Figure 14. Mécanismes impliqués dans l'oncogénèse du virus HHV-8 en phase de latence...	40
Figure 15. Mécanismes impliqués dans l'oncogénèse du virus HHV-8 en phase lytique.....	45
Figure 16. Représentation schématique de la pathogénèse du KS, PEL et MCD associés à l'HHV-8.	48
Figure 17. Résumé des mécanismes cellulaires impliqués dans la pathogénèse associée au virus HHV-8.....	49
Figure 18. Les voies de l'apoptose comme cibles des thérapies anti tumorales.....	60

Figure 19. Les principales protéines du virus HHV-8 ciblant les voies de signalisation apoptotiques	61
Figure 20. Le virus HHV-8 inhibe les voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose à plusieurs niveaux.....	63
Figure 21. Production, régulation et effets des ROS intracellulaires	67
Figure 22. Résumé des mécanismes possibles d'actions mis en jeu dans l'effet cytotoxique de la primaquine sur les cellules infectées par le virus HHV-8	137

Annexes

Poppers by inducing HHV-8 virion production can act as a promoter for HHV-8 transmission in MSM

Aude JARY^{1*}, Adélie GOTHLAND^{1*}, Romain PALICH², Valentin LEDUCQ¹, Gentiane MONSEL², Sébastien IMBERT³, Luminita SCHNEIDER², Anne SIMON⁴, Jean-Philippe SPANO⁵, Christine KATLAMA², Islam Amine LARABI⁶, Jean-Claude ALVAREZ⁶, Vincent CALVEZ¹, Anne-Geneviève MARCELIN¹

¹Sorbonne Université, INSERM, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique (iPLESP), AP-HP, Pitié Salpêtrière Hospital, Department of Virology, F-75013 Paris, France

²Sorbonne Université, INSERM, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique (iPLESP), AP-HP, Pitié Salpêtrière Hospital, Department of Infectious Diseases, F-75013 Paris, France

³AP-HP, Pitié Salpêtrière Hospital, Department of Parasitology-Myology, F75013, Paris, France

⁴AP-HP, Pitié Salpêtrière Hospital, Department of Internal Medicine, F75013, Paris, France

⁵Sorbonne Université, INSERM, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique (iPLESP), AP-HP, Pitié Salpêtrière Hospital, Department of Oncology, F-75013 Paris, France

⁶Paris-Saclay University (UVSQ), INSERM U-1173, Department of Pharmacology Toxicology, AP-HP, Raymond Poincaré Hospital, 92380 Garches, France

© The Author(s) 2021. Published by Oxford University Press on behalf of Infectious Diseases Society of America.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs licence (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial reproduction and distribution of the work, in any medium, provided the original work is not altered or transformed in any way, and that the work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com

* These authors contributed equally

Corresponding author: Dr Aude Jary, Virology Laboratory, CERVI, Pitié-Salpêtrière

Hospital, 83 Bd de l'hôpital, 75013, Paris, France. Email aude.jary@aphp.fr

Accepted Manuscript

Downloaded from <https://academic.oup.com/oid/advance-article/doi/10.1093/oid/obab169/6206759> by guest on 01 April 2021

ABSTRACT

Environmental factors were reported to increase the risk of human herpesvirus 8 (HHV-8) transmission. In a MSM population, we evidenced that *Chemsex* was associated with HHV-8-seropositivity *in vivo* and that *poppers* induced HHV-8-virion production *in vitro*. Our finding may explain the higher HHV-8-transmission in MSM.

Keywords: HHV-8; MSM; HIV PrEP; *poppers*; chemsex; HHV-8 production

Accepted Manuscript

BACKGROUND

Human herpesvirus 8 (HHV-8) seroprevalence and transmission differ according to the world regions. In Sub-Saharan Africa, more than 50% is infected by HHV-8 with a transmission occurring in the childhood [1]. In Western countries, HHV-8-seroprevalence is low in the general population (<5%) except in MSM in which transmission was mainly linked to sexual risk factors such as HIV-infection, history of sexually transmitted infections (STIs) and oral-penile or oral-anal contacts[2–5]. The reasons for these disparities are not yet elucidated but some environmental factors have been highlighted similarly to Epstein-Barr virus associated cancers developments[6,7]. Indeed, particularly in regions with soils rich in metals such as aluminum, silica or iron, the risk of transmission, as well as the risk of Kaposi's sarcoma (KS) development, were reported to be increased compared to other region[8–11]. Otherwise, epidemiological studies report an increase of STIs prevalence in MSM because of changes in sexual behaviors[12,13]. The new era of HIV pre-exposure prophylaxis (HIV-PrEP)[14] possibly tends to favor sexual practices unprotected by condoms and may contribute to the spate of various STIs not covered by HIV-PrEP.

Considering that in MSM, HHV-8-transmission likely occurs during sexually activity and could lead to KS in subjects without identifiable context of immunosuppression[15], we conducted a study including HIV-negative PrEP users with high risk of STIs to assess HHV-8 seroprevalence, HHV-8 anal and oral shedding and risk factors associated with its transmission.

MATERIALS AND METHODS

Between May 2017 and August 2018, we included MSM enrolled in a HIV-PrEP program in the Infectious Diseases department of Pitié-Salpêtrière hospital. Metadata including age, country of origin, PrEP use duration, number of different partners per month,

history of STIs, rate of condom-free anal intercourse and oral drugs use during sex (*Chemsex*) were collected during their routine medical visits.

HHV-8 serological and DNA analysis

Anal and oral swabs and one serum were collected for each patient.

HHV-8-antibodies status was determined by indirect immunofluorescence assay and the quantification of HHV-8-DNA by real-time PCR as previously reported[16].

Drugs effects on HHV-8 replication

Twenty-five oral drugs, intravenous drugs or inhaled pentyl nitrite (*poppers*), provided by the pharmacological-toxicological department of Raymond Poincaré hospital, Garches, France, were tested on BC-3 cells (ATCC®, CRL-2277) (Supplementary Table 1).

Cell viability assays

The effect of the compounds on BC-3 and BCP-1 (ATCC®, CRL-2294) cells viability was assessed using cell viability assay based on the CellTiter-Glo® 2.0 assay (Promega®). Briefly, cells (10^4 per well) were incubated in a 96-well microculture plate for 3h and 48h at 37°C with different recreational drugs at 10µM or with different concentrations of *poppers* (0.0001%, 0.001%, 0.01%, 0.1%, 0.5% and 1%). Values were normalized to the untreated cells (control). A trypan blue (Sigma) exclusion assay was also carried out in triplicate as in the CellTiter-Glo 2.0 assay. The half maximal inhibitory concentrations (IC50) were calculated with CellTiter-Glo data using GraphPad Prism6.0.

HHV-8 virion production

BC-3 cells (10^4 per well) were incubated with recreational drugs or *poppers*, as during the cytotoxicity test to obtain the same final concentration, during 48h (recreational drugs) or 3h, 6h and 24h (*poppers*). Some wells were left untreated as negative control. Supernatant from each well was cleared by centrifugation at 1500 rpm during 5 minutes followed by a second one at 3800 rpm for 30 minutes to remove cell debris [17]. After DNase I treatment and DNA extraction, HHV-8-DNA amplification was performed to quantify HHV-8 virion production; fold change of HHV-8-DNA was determined by dividing HHV-8-DNA concentration in supernatant of each condition by HHV-8-DNA concentration obtained with negative control.

Statistical analysis

Non-parametric tests were performed, specifically the Mann-Whitney *U* test and Spearman rank test for quantitative data and Fisher *t* test for qualitative data.

RESULTS

Forty-one PrEP users were enrolled with a median [IQR] age of 38[29-42] years. The majority (73%) was originated from countries with low HHV-8-seroprevalence rates, including 24(58%) from France. Participants reported a median of 5[2-10] different partners per month, about 40% [20-72.5] of condom-free anal intercourse, and 13(32%) used recreational oral drugs during sex (Table 1).

HHV-8-seropositivity and HHV-8-DNA shedding

Nine (22%) participants were HHV-8-seropositive and HHV-8-DNA was detected in 4(44%) of them in oral site but never in anal site. Median HHV-8-DNA viral load was 3.54 \log_{10} copies/ 10^6 cells [2.79-4.06].

Among HHV-8-seronegative participants, HHV-8-DNA was never detected in both sites except in the oral sample from one participant who seroconverted for HHV-8 during the study without clinical signs. In this participant at inclusion, HHV-8-serology was negative and high HHV-8-DNA viral load ($5.37 \log_{10}$ copies/ 10^6 cells) was detected from oral swab. A second serum collected 6 months later was HHV-8-seropositive and oral HHV-8-DNA viral load became undetectable. In peripheral blood compartment, HHV-8-DNA viral load was undetectable at both sampling times.

Overall, HHV-8-seroprevalence was 24% (10/41): 6 were originated from countries with low HHV-8-seroprevalence rate, 2 from Eastern Europe (including the one having seroconverted during the study), one from South America and one from Sub-Saharan Africa.

No significant difference were found between HHV-8-positive and negative participants except drugs use during sex (OR=5.14, 95%CI [1.21-19.01], $p=0.048$) (Table 1).

Drugs effects on HHV-8 virion production

None of the oral and intravenous drugs decreased the viability of BC-3 cells after 48h of incubation. However, we observed with the CellTiter Glo 2.0 assay that *poppers* reduced BC-3 cell viability in a dose-dependent manner. At 3h and 48h post-incubation, 92% to 100% of mortality was detected with *poppers* from 0.1 to 1%. Remarkably, no cytotoxicity of *poppers* was observed at 0.01% and below (Figure 1A). Similar results were observed with the BCP-1 cell line (Supplementary Table 2). The IC_{50} values of *poppers* against BC-3 and BCP-1 cell lines were 0.072% and 0.11% at 3h and 0.014% and 0.024% at 48h, respectively. The cytotoxicity of *poppers* after 3h and 48h was also confirmed by a trypan blue exclusion assay (Figure 1A). At this stage, we were not able to determine whether the decline of

viability was due to a direct cytotoxicity of the *poppers* or an induction of HHV-8 virion production leading to cytolysis.

Compared to untreated BC-3 cell, an increased quantity of HHV-8-DNA was observed from *poppers*-treated BC-3 cell supernatant. At 3h post-incubation, about 2.5-fold-more virion particles was detected in the supernatants of BC-3 cells treated with *poppers* at 0.0001%(2.6 fold), 0.001%(2.5 fold) and 0.01%(2.2 fold), despite no cytotoxic effect of the *poppers* (Figure 1B). These results showed that *poppers* induced *in vitro* HHV-8-reactivation at early time of BC-3 cells incubation, resulting in the production of virus particles (Supplementary Table 3). In contrast, none of the oral or intravenous drugs seems to affect HHV-8 particles production.

DISCUSSION

Our results confirm that HHV-8-seroprevalence is high in sexually active MSM compared to the general population of Western countries (24% *versus* <5% according to the literature) [1]. Intermittent but frequent HHV-8 shedding in saliva, occurring without clinical symptoms, probably contributes to HHV-8-transmission. In addition, the use of oral recreational drugs was associated with HHV-8-infection.

Although the exact route of HHV-8-transmission remains unknown in MSM, several sexual risk factors were reported in the literature [2]. In this study, a trend of association between HHV-8-infection and longer PrEP use duration (3.5 *versus* 0 months, $p=0.33$) or higher number of different partners (7.5 *versus* 3.5, $p=0.24$) was found. Otherwise, since number of participants was limited, oral recreational drugs were associated with HHV-8-infection, whereas in the literature mainly the association between HHV-8-infection and injection-drug users, and therefore the risk of parenteral HHV-8-transmission was studied [18–20]. As MSM

under HIV-PrEP constitute a population at high risk of STIs by frequenting dense sexual networks, *chemsex* may increase their risky sexual behavior by increasing their number of partners and sexual unprotected intercours in a restricted environment, as shown for other viral STIs (HIV or hepatitis A for example) and thus probably contributed to HHV-8-transmission especially when oral HHV-8 shedding occurred.

We also hypothesized that some drugs might influence HHV-8-virion production and promote oral shedding. The evaluation of 25 different drugs, known to be used as recreational drugs, on BC-3 virion production *in vitro* invalidated this hypothesis. However interestingly, we found that *poppers* were able to increase release of HHV-8 virus particles *in vitro* after 3 hours of incubation. *In vivo*, inhaled *poppers* may promote HHV-8 oral shedding in MSM population by stimulating directly and rapidly cells infected by HHV-8. Finally, our results suggest an *in vitro* mechanism explaining that the use of *poppers* in MSM was described as an independent risk factor for HHV-8-infection in epidemiological studies[21–23].

The main limitation of our study is the low number of participants although we report similar results already described in the literature. Furthermore, additional studies exploring HHV-8 viral particles infectivity or lytic gene expression *in vitro* are required to definitely assess *poppers* effect on PEL cell line.

In conclusion, this study highlights a high HHV-8-seroprevalence in MSM and HHV-8 shedding in saliva contributing to HHV-8-transmission. *Chemsex* by increasing sexual risk behavior as well as *poppers* by stimulating HHV-8-virion production in oral site may explain the higher HHV-8-transmission in MSM population using these drugs.

REFERENCES

1. Cesarman E, Damania B, Krown SE, Martin J, Bower M, Whitby D. Kaposi sarcoma. *Nat Rev Dis Primer*. 2019; 5(1):9.
2. Rohner E, Wyss N, Heg Z, et al. HIV and human herpesvirus 8 co-infection across the globe: Systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2016; 138(1):45–54.
3. Smith NA, Sabin CA, Gopal R, et al. Serologic evidence of human herpesvirus 8 transmission by homosexual but not heterosexual sex. *J Infect Dis*. 1999; 180(3):600–606.
4. Dukers NH, Renwick N, Prins M, et al. Risk factors for human herpesvirus 8 seropositivity and seroconversion in a cohort of homosexual men. *Am J Epidemiol*. 2000; 151(3):213–224.
5. Martin JN, Ganem DE, Osmond DH, Page-Shafer KA, Macrae D, Kedes DH. Sexual transmission and the natural history of human herpesvirus 8 infection. *N Engl J Med*. 1998; 338(14):948–954.
6. Koriyama C, Akiba S, Minakami Y, Eizuru Y. Environmental factors related to Epstein-Barr virus-associated gastric cancer in Japan. *J Exp Clin Cancer Res CR*. 2005; 24(4):547–553.
7. He Y-Q, Xue W-Q, Xu F-H, et al. The Relationship Between Environmental Factors and the Profile of Epstein-Barr Virus Antibodies in the Lytic and Latent Infection Periods in Healthy Populations from Endemic and Non-Endemic Nasopharyngeal Carcinoma Areas in China. *EBioMedicine*. 2018; 30:184–191.
8. Simonart T. Role of environmental factors in the pathogenesis of classic and African-endemic Kaposi sarcoma. *Cancer Lett*. 2006; 244(1):1–7.
9. Pelsler C, Dazzi C, Graubard BI, Lauria C, Vitale F, Goedert JJ. Risk of classic Kaposi sarcoma with residential exposure to volcanic and related soils in Sicily. *Ann Epidemiol*. 2009; 19(8):597–601.
10. Ziegler JL. Endemic Kaposi's sarcoma in Africa and local volcanic soils. *Lancet Lond Engl*. 1993; 342(8883):1348–1351.
11. Simonart T, Noel JC, Andrei G, et al. Iron as a potential co-factor in the pathogenesis of Kaposi's sarcoma? *Int J Cancer*. 1998; 78(6):720–726.
12. Laar TJ van de, Richel O. Emerging viral STIs among HIV-positive men who have sex with men: the era of hepatitis C virus and human papillomavirus. *Sex Transm Infect*. 2017; 93(5):368–373.

13. Chow EPF, Grulich AE, Fairley CK. Epidemiology and prevention of sexually transmitted infections in men who have sex with men at risk of HIV. *Lancet HIV*. 2019; 6(6):e396–e405.
14. Molina J-M, Capitant C, Spire B, et al. On-Demand Preexposure Prophylaxis in Men at High Risk for HIV-1 Infection. *N Engl J Med*. 2015; 373(23):2237–2246.
15. Vangipuram R, Tyring SK. Epidemiology of Kaposi sarcoma: review and description of the nonendemic variant. *Int J Dermatol*. 2018; .
16. Lallemand F, Desire N, Rozenbaum W, Nicolas JC, Marechal V. Quantitative analysis of human herpesvirus 8 viral load using a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(4):1404–1408.
17. Yu Y, Black JB, Goldsmith CS, Browning PJ, Bhalla K, Offermann MK. Induction of human herpesvirus-8 DNA replication and transcription by butyrate and TPA in BCBL-1 cells. *J Gen Virol*. 1999; 80 (Pt 1):83–90.
18. Rohner E, Wyss N, Heg Z, et al. HIV and human herpesvirus 8 co-infection across the globe: Systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2016; 138(1):45–54.
19. Cannon MJ, Dollard SC, Smith DK, et al. Blood-borne and sexual transmission of human herpesvirus 8 in women with or at risk for human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*. 2001; 344(9):637–643.
20. Fiore JR, Volpe A, Tosatti MA, et al. High seroprevalence of human herpesvirus 8 (HHV-8) in HIV-1-infected pregnant women of Southeastern Italy: association with injection drug use and hepatitis C virus infection. *J Med Virol*. 2004; 72(4):656–660.
21. Pauk J, Huang ML, Brodie SJ, et al. Mucosal shedding of human herpesvirus 8 in men. *N Engl J Med*. 2000; 343(19):1369–1377.
22. Casper C, Carrell D, Miller KG, et al. HIV serodiscordant sex partners and the prevalence of human herpesvirus 8 infection among HIV negative men who have sex with men: baseline data from the EXPLORE Study. *Sex Transm Infect*. 2006; 82(3):229–235.
23. Casper C, Wald A, Pauk J, Tabet SR, Corey L, Celum CL. Correlates of prevalent and incident Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection in men who have sex with men. *J Infect Dis*. 2002; 185(7):990–993.

Table 1: Characteristics of the 41 participants under HIV pre-exposure prophylaxis and according to HHV-8 status

<i>Participants characteristics</i>	Total	HHV-8+	HHV-8-	<i>Pvalue</i>
No of participants, n (%)	41 (100)	10 (24)	31 (76)	-
Age (years), median [IQR]	38 [29-42]	39 [35-42.5]	36 [26-42]	0.29 ¹
Native country, n (%)				
Countries with low HHV-8-seroprevalence rates (<10%) *	30 (73)	6 (60)	24 (77)	
Countries with intermediate HHV-8-seroprevalence rates (10%-20%) **	9 (22)	3 (30)	6 (19)	-
Countries with high HHV-8-seroprevalence rates (>50%) ***	2 (5)	1 (10)	1 (4)	
PrEP use duration (months), median [IQR]	0 [0-6.1]	3.05 [0.0-7.1]	0 [0.0-4.5]	0.33 ¹
No of different partners (per month), median [IQR]	5 [2-10]	7.5 [4.3-10]	3.5 [2-9.5]	0.24 ¹
Percentage of anal intercourse condom-free, median [IQR]	40 [20-72.5]	30 [20-62.5]	50 [20-77.5]	0.75 ¹
Oral drugs use during sex, n (%)	13 (32)	6 (60)	7 (23)	0.048 ²
History of STIs, n (%)	26 (63)	7 (70)	18 (58)	0.71 ²
Bacteria****	24 (59)	7 (70)	17 (55)	
Virus (Herpes simplex virus)	1 (2)	0	1 (3)	-
Condyroma	7 (17)	1 (10)	6 (19)	
Concurrent STIs, n (%)	7 (17)	2 (20)	5 (16)	¹ 2
Bacteria****	6 (15)	2 (20)	4 (13)	-
Virus (acute hepatitis A)	1 (2)	0 (0)	1 (3)	

HIV: Human Immunodeficiency virus; n: Number; PrEP: Pre-exposure prophylaxis; STI: sexually transmitted infection; IQR: interquartile

** Western Europe, North America, Asia*

*** Mediterranean Basin, Eastern Europe, South America*

**** Africa*

***** Trepanoma pallidum, Mycoplasma genitalium, Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae*

¹Mann-Whitney U test; ²Fisher t test

Accepted Manuscript

Figure 1: A. Cytotoxic effects of poppers on BC-3 cell line. KSHV-infected PEL cell line was incubated with various concentrations of poppers for 3h and 48h (x-axis). Cell viability was assessed by CellTiter Glo 2.0 and Trypan blue exclusion assays of triplicate cultures, expressed as a percentage of untreated control (y-axis). Data represent mean \pm SEM for at least two independent experiments. B. HHV-8 virion production in poppers-treated BC-3 cell line. This graph represents virus production compared to untreated cells (fold change) (y-axis) according to different concentrations of poppers (x-axis).

Accepted Manuscript

Figure 1A

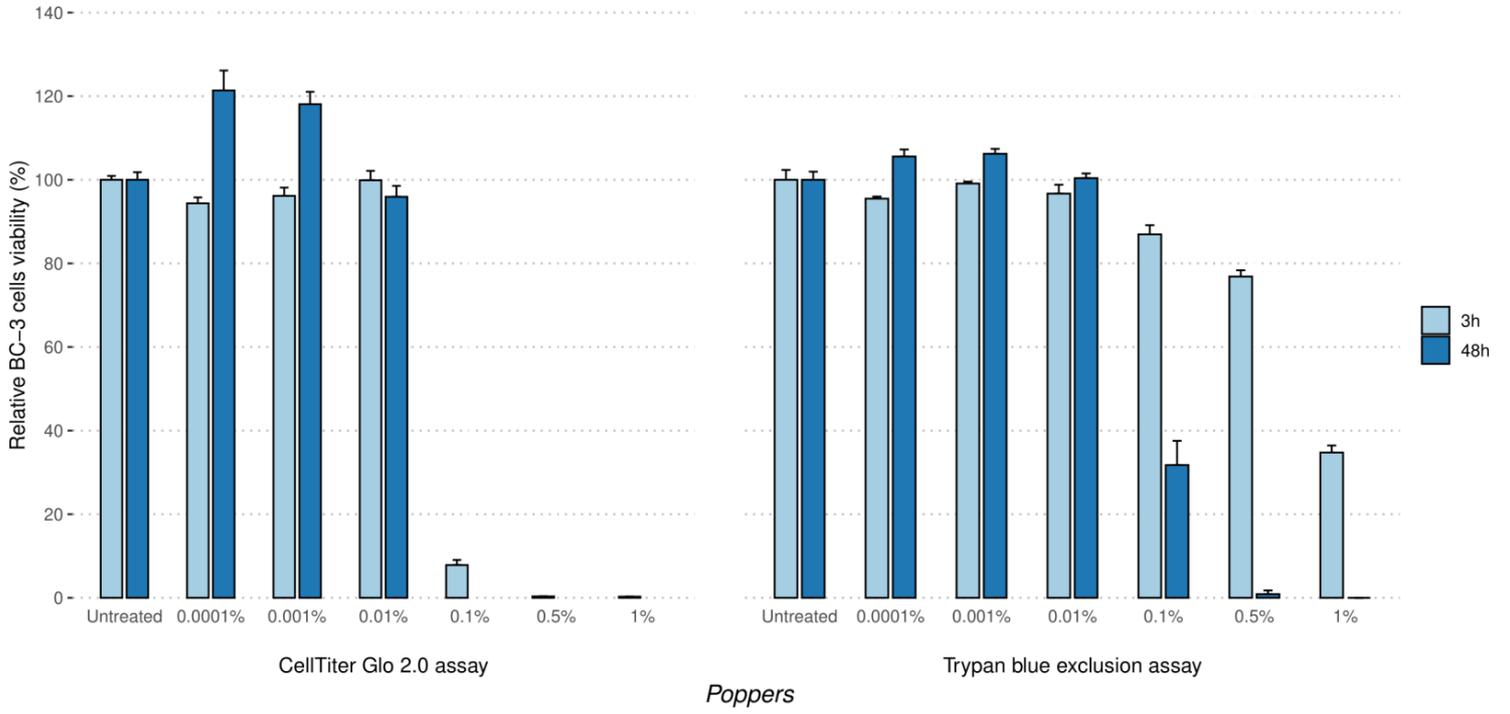
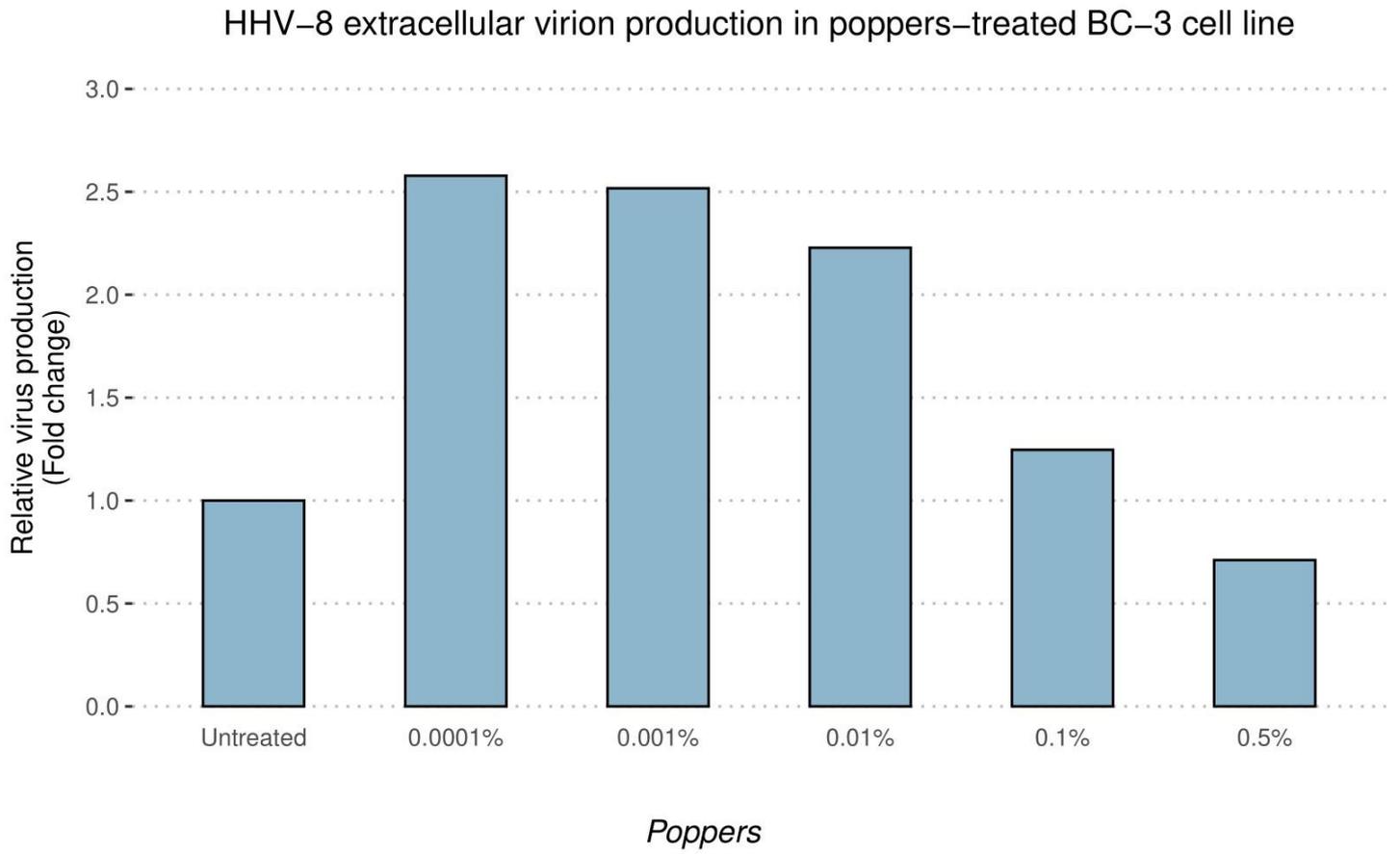


Figure 1B



Bibliographie

1. Gramolelli S, Schulz TF. The role of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus in the pathogenesis of Kaposi sarcoma: Kaposi sarcoma pathogenesis. *J Pathol.* janv 2015;235(2):368- 80.
2. Greene W, Kuhne K, Ye F, Chen J, Zhou F, Lei X, et al. Molecular Biology of KSHV in Relation to AIDS-Associated Oncogenesis. In: Meyers C, éditeur. *Aids-Associated Viral Oncogenesis* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2007 [cité 19 déc 2019]. p. 69- 127. Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-46816-7_3
3. Mesri EA, Cesarman E, Boshoff C. Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus. *Nat Rev Cancer.* oct 2010;10(10):707- 19.
4. Marigliò G, Koch S, Schulz TF. Kaposi sarcoma herpesvirus pathogenesis. *Phil Trans R Soc B.* 19 oct 2017;372(1732):20160275.
5. Moore PS, Gao S-J, Dominguez G, Cesarman E, Lungu O, Knowles DM, et al. Primary Characterization of a Herpesvirus Agent Associated with Kaposi's Sarcoma. *J VIROL.* 1996;70:12.
6. Vega F, Miranda RN, Medeiros LJ. KSHV/HHV8-positive large B-cell lymphomas and associated diseases: a heterogeneous group of lymphoproliferative processes with significant clinicopathological overlap. *Mod Pathol.* janv 2020;33(1):18- 28.
7. Dupin N. Update on oncogenesis and therapy for Kaposi sarcoma. 2020;32(2):7.
8. Cesarman E, Knowles DM. The role of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/ HHV-8) in lymphoproliferative diseases. :10.
9. Ganem D. KSHV and the pathogenesis of Kaposi sarcoma: listening to human biology and medicine. *J Clin Invest.* 1 avr 2010;120(4):939- 49.

10. Purushothaman P, Dabral P, Gupta N, Sarkar R, Verma SC. KSHV Genome Replication and Maintenance. *Front Microbiol* [Internet]. 1 févr 2016 [cité 14 janv 2020];7. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.00054>
11. Yan L, Majerciak V, Zheng Z-M, Lan K. Towards Better Understanding of KSHV Life Cycle: from Transcription and Posttranscriptional Regulations to Pathogenesis. *Virol Sin.* avr 2019;34(2):135- 61.
12. Cancian L, Hansen A, Boshoff C. Cellular origin of Kaposi's sarcoma and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-induced cell reprogramming. *Trends in Cell Biology.* sept 2013;23(9):421- 32.
13. Angius F, Ingianni A, Pompei R. Human Herpesvirus 8 and Host- Cell Interaction: Long-Lasting Physiological Modifications, Inflammation and Related Chronic Diseases. *Microorganisms.* 11 mars 2020;8(3):388.
14. Kaplan LD. Human herpesvirus-8: Kaposi sarcoma, multicentric Castleman disease, and primary effusion lymphoma. *Hematology.* 6 déc 2013;2013(1):103- 8.
15. Bravo Cruz AG, Damania B. In Vivo Models of Oncoproteins Encoded by Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. *J Virol* [Internet]. 15 mai 2019 [cité 29 juin 2020];93(11). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6532075/>
16. Cesarman E, Damania B, Krown SE, Martin J, Bower M, Whitby D. Kaposi sarcoma. *Nat Rev Dis Primers.* déc 2019;5(1):9.
17. Chandran B. Early Events in Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection of Target Cells. *Journal of Virology.* 1 mars 2010;84(5):2188- 99.
18. Chen L, Lagunoff M. Establishment and Maintenance of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Latency in B Cells. *Journal of Virology.* 15 nov 2005;79(22):14383- 91.
19. Li Y, Zhong C, Liu D, Yu W, Chen W, Wang Y, et al. Evidence for Kaposi Sarcoma Originating from Mesenchymal Stem Cell through KSHV-induced Mesenchymal-to-Endothelial Transition. *Cancer Res.* 1 janv 2018;78(1):230- 45.

20. Dupin N, Fisher C, Kellam P, Ariad S, Tulliez M, Franck N, et al. Distribution of human herpesvirus-8 latently infected cells in Kaposi's sarcoma, multicentric Castleman's disease, and primary effusion lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 13 avr 1999;96(8):4546- 51.
21. Cesarman E. Gammaherpesvirus and lymphoproliferative disorders in immunocompromised patients. *Cancer Letters*. juin 2011;305(2):163- 74.
22. Purushothaman P, Thakker S, Verma SC. Transcriptome Analysis of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus during *De Novo* Primary Infection of Human B and Endothelial Cells. Longnecker RM, éditeur. *J Virol*. 15 mars 2015;89(6):3093- 111.
23. Jones T, Ye F, Bedolla R, Huang Y, Meng J, Qian L, et al. Direct and efficient cellular transformation of primary rat mesenchymal precursor cells by KSHV [Internet]. American Society for Clinical Investigation; 2012 [cité 29 août 2020]. Disponible sur: <https://www-jci-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/articles/view/58530/pdf>
24. Cavallin LE, Goldschmidt-Clermont P, Mesri EA. Molecular and Cellular Mechanisms of KSHV Oncogenesis of Kaposi's Sarcoma Associated with HIV/AIDS. Condit RC, éditeur. *PLoS Pathog*. 10 juill 2014;10(7):e1004154.
25. Mutlu AD, Cavallin LE, Vincent L, Chiozzini C, Eroles P, Duran EM, et al. In Vivo-Restricted and Reversible Malignancy Induced by Human Herpesvirus-8 KSHV: A Cell and Animal Model of Virally Induced Kaposi's Sarcoma. *Cancer Cell*. 13 mars 2007;11(3):245- 58.
26. Gao S-J, Deng J-H, Zhou F-C. Productive Lytic Replication of a Recombinant Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus in Efficient Primary Infection of Primary Human Endothelial Cells. *Journal of Virology*. 15 sept 2003;77(18):9738- 49.
27. Ciufu DM, Cannon JS, Poole LJ, Wu FY, Murray P, Ambinder RF, et al. Spindle Cell Conversion by Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus: Formation of Colonies and Plaques with Mixed Lytic and Latent Gene Expression in Infected Primary Dermal Microvascular Endothelial Cell Cultures. *Journal of Virology*. 15 juin 2001;75(12):5614- 26.

28. Bruce AG, Barcy S, DiMaio T, Gan E, Garrigues HJ, Lagunoff M, et al. Quantitative Analysis of the KSHV Transcriptome Following Primary Infection of Blood and Lymphatic Endothelial Cells. *Pathogens*. 19 mars 2017;6(1):11.
29. Dai L, Trillo-Tinoco J, Bai L, Kang B, Xu Z, Wen X, et al. Systematic Analysis of a Xenograft Mice Model for KSHV+ Primary Effusion Lymphoma (PEL). Gao S-J, éditeur. *PLoS ONE*. 28 févr 2014;9(2):e90349.
30. Wu W, Rochford R, Toomey L, Harrington W, Feuer G. Inhibition of HHV-8/KSHV infected primary effusion lymphomas in NOD/SCID mice by azidothymidine and interferon- α . *Leukemia Research*. mai 2005;29(5):545- 55.
31. Strahan R, Uppal T, Verma S. Next-Generation Sequencing in the Understanding of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (KSHV) Biology. *Viruses*. 31 mars 2016;8(4):92.
32. Biggar RJ, Whitby D, Marshall V, Linhares AC, Black F. Human Herpesvirus 8 in Brazilian Amerindians: A Hyperendemic Population with a New Subtype. *J INFECT DIS*. mai 2000;181(5):1562- 8.
33. Whitby D, Marshall VA, Bagni RK, Wang CD, Gamache CJ, Guzman JR, et al. Genotypic characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in asymptomatic infected subjects from isolated populations. *Journal of General Virology*. 1 janv 2004;85(1):155- 63.
34. Kajumbula H, Wallace RG, Zong J-C, Hokello J, Sussman N, Simms S, et al. Ugandan Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Phylogeny: Evidence for Cross-Ethnic Transmission of Viral Subtypes. *Intervirology*. 2006;49(3):133- 43.
35. Jary A, Leducq V, Desire N, Petit H, Palich R, Joly V, et al. New Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus variant in men who have sex with men associated with severe pathologies. *The Journal of Infectious Diseases*. 15 oct 2020;222(8):1320- 8.
36. Gompels UA, French C, Monze M, Kasolo FC, Obel N, Anderson RA. Sequence analyses of human herpesvirus-8 strains from both African human immunodeficiency virus-negative and -positive childhood endemic Kaposi's sarcoma show a close relationship with strains

- identified in febrile children and high variation in the K1 glycoprotein. *Journal of General Virology*. 1 déc 1998;79(12):3055- 65.
37. Pauk J, Huang M-L, Brodie SJ, Wald A, Koelle DM, Schacker T, et al. Mucosal Shedding of Human Herpesvirus 8 in Men [Internet]. <http://dx.doi.org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1056/NEJM200011093431904>. Massachusetts Medical Society; 2009 [cité 22 juill 2020]. Disponible sur: https://www-nejm-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/10.1056/NEJM200011093431904?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0www.ncbi.nlm.nih.gov
 38. Brayfield BP, Kankasa C, West JT, Muyanga J, Bhat G, Klaskala W, et al. Distribution of Kaposi Sarcoma–Associated Herpesvirus/Human Herpesvirus 8 in Maternal Saliva and Breast Milk in Zambia: Implications for Transmission. *J INFECT DIS*. 15 juin 2004;189(12):2260- 70.
 39. Mbulaiteye SM, Engels EA. Kaposi's sarcoma risk among transplant recipients in the United States (1993–2003). *International Journal of Cancer*. 2006;119(11):2685- 91.
 40. Goncalves PH, Ziegelbauer J, Uldrick TS, Yarchoan R. Kaposi-Sarcoma Herpesvirus Associated Cancers and Related Diseases. *Curr Opin HIV AIDS*. janv 2017;12(1):47- 56.
 41. Shimada K, Hayakawa F, Kiyoi H. Biology and management of primary effusion lymphoma. *Blood*. 1 nov 2018;132(18):1879- 88.
 42. Rohner E, Wyss N, Heg Z, Faralli Z, Mbulaiteye SM, Novak U, et al. HIV and human herpesvirus 8 co-infection across the globe: Systematic review and meta-analysis. *International Journal of Cancer*. 2016;138(1):45- 54.
 43. Jary A, Gothland A, Palich R, Leducq V, Monsel G, Imbert S, et al. *Poppers* by inducing HHV-8 virion production can act as a promoter for HHV-8 transmission in MSM. *Open Forum Infectious Diseases*. 31 mars 2021;ofab166.
 44. Casper C. HIV serodiscordant sex partners and the prevalence of human herpesvirus 8 infection among HIV negative men who have sex with men: baseline data from the EXPLORE Study. *Sexually Transmitted Infections*. 1 juin 2006;82(3):229- 35.

45. Casper C, Wald A, Pauk J, Tabet SR, Corey L, Celum CL. Correlates of Prevalent and Incident Kaposi's Sarcoma–Associated Herpesvirus Infection in Men Who Have Sex with Men. *J INFECT DIS.* avr 2002;185(7):990- 3.
46. Goedert JJ. Risk Factors for Classical Kaposi's Sarcoma. *CancerSpectrum Knowledge Environment.* 20 nov 2002;94(22):1712- 8.
47. Simonart T, Noel J-C, Andrei G, Parent D, Vooren J-PV, Hermans P, et al. Iron as a potential co-factor in the pathogenesis of Kaposi's sarcoma? :7.
48. Simonart T. Iron: a target for the management of Kaposi's sarcoma? *BMC Cancer.* déc 2004;4(1):1.
49. Cousins E, Nicholas J. Molecular Biology of Human Herpesvirus 8: Novel Functions and Virus–Host Interactions Implicated in Viral Pathogenesis and Replication. In: Chang MH, Jeang K-T, éditeurs. *Viruses and Human Cancer [Internet].* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014 [cité 19 déc 2019]. p. 227- 68. Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-38965-8_13
50. Chadburn A, Said J, Gratzinger D, Chan JKC, de Jong D, Jaffe ES, et al. HHV8/KSHV-Positive Lymphoproliferative Disorders and the Spectrum of Plasmablastic and Plasma Cell Neoplasms. *American Journal of Clinical Pathology.* févr 2017;147(2):171- 87.
51. Bechtel JT, Liang Y, Hvidding J, Ganem D. Host Range of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus in Cultured Cells. *Journal of Virology.* 1 juin 2003;77(11):6474- 81.
52. Grossmann C, Podgrabinska S, Skobe M, Ganem D. Activation of NF- B by the Latent vFLIP Gene of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Is Required for the Spindle Shape of Virus-Infected Endothelial Cells and Contributes to Their Proinflammatory Phenotype. *Journal of Virology.* 15 juill 2006;80(14):7179- 85.
53. Chang H, Wachtman LM, Pearson CB, Lee J-S, Lee H-R, Lee SH, et al. Non-Human Primate Model of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection. Wong S, éditeur. *PLoS Pathog.* 2 oct 2009;5(10):e1000606.

54. Flore O, Rafii S, Ely S, O'Leary JJ, Hyjek EM, Cesarman E. Transformation of primary human endothelial cells by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Nature*. août 1998;394(6693):588- 92.
55. Rezaee SAR. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus immune modulation: an overview. *Journal of General Virology*. 1 juill 2006;87(7):1781- 804.
56. De Paoli P. Human herpesvirus 8: an update. *Microbes and Infection*. mars 2004;6(3):328- 35.
57. Ceccarelli M, Facciola A, Taibi R, Pellicanò GF, Nunnari G, Rullo EV. The treatment of Kaposi's sarcoma: present and future options, a review of the literature. :10.
58. Delyon J, Bizot A, Battistella M, Madelaine I, Vercellino L, Lebbé C. PD-1 blockade with nivolumab in endemic Kaposi sarcoma. *Annals of Oncology*. avr 2018;29(4):1067- 9.
59. Galanina N, Goodman AM, Cohen PR, Frampton GM, Kurzrock R. Successful Treatment of HIV-Associated Kaposi Sarcoma with Immune Checkpoint Blockade. *Cancer Immunol Res*. oct 2018;6(10):1129- 35.
60. Sullivan RJ, Pantanowitz L. New drug targets in Kaposi sarcoma. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. déc 2010;14(12):1355- 66.
61. Centre de référence de la maladie de Castleman (CRMdC), Maladies rares immuno-hématologiques. Protocole national de diagnostic et de soin (PNDS)- maladie de Castleman. 2019.
62. Baba Y, Shigemi Z, Hara N, Moriguchi M, Ikeda M, Watanabe T, et al. Arctigenin induces the apoptosis of primary effusion lymphoma cells under conditions of glucose deprivation. *Int J Oncol [Internet]*. 1 déc 2017 [cité 17 déc 2020]; Disponible sur: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2017.4215>
63. Boulanger E, Gérard L, Gabarre J, Molina J-M, Rapp C, Abino J-F, et al. Prognostic Factors and Outcome of Human Herpesvirus 8-Associated Primary Effusion Lymphoma in Patients With AIDS. *JCO*. 1 juill 2005;23(19):4372- 80.

64. Banerjee S, Uppal T, Strahan R, Dabral P, Verma SC. The Modulation of Apoptotic Pathways by Gammaherpesviruses. *Front Microbiol* [Internet]. 27 avr 2016 [cité 14 janv 2020];7. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00585/abstract>
65. Lopez J, Tait SWG. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *Br J Cancer*. mars 2015;112(6):957- 62.
66. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. juin 2007;35(4):495- 516.
67. Fulda S, Debatin K-M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. août 2006;25(34):4798- 811.
68. Moore PS. KSHV manipulation of the cell cycle and apoptosis. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, et al., éditeurs. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis* [Internet]. Cambridge: Cambridge University Press; 2007 [cité 28 avr 2021]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47432/>
69. Liu L, Eby MT, Rathore N, Sinha SK, Kumar A, Chaudhary PM. The Human Herpes Virus 8-encoded Viral FLICE Inhibitory Protein Physically Associates with and Persistently Activates the I κ B Kinase Complex. *J Biol Chem*. 19 avr 2002;277(16):13745- 51.
70. Liou G-Y, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Research*. janv 2010;44(5):479- 96.
71. Sinha K, Das J, Pal PB, Sil PC. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Arch Toxicol*. juill 2013;87(7):1157- 80.
72. Kumari S, Badana AK, G MM, G S, Malla R. Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival. *Biomark Insights*. janv 2018;13:117727191875539.
73. Schieber M. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. 24(10):10.

74. Ozben T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *J Pharm Sci.* sept 2007;96(9):2181- 96.
75. Shen H-M, Liu Z. JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radical Biology and Medicine.* mars 2006;40(6):928- 39.
76. McLean L, Soto U, Agama K, Francis J, Jimenez R, Pommier Y, et al. Aminoflavone induces oxidative DNA damage and reactive oxidative species-mediated apoptosis in breast cancer cells. *Int J Cancer.* 1 avr 2008;122(7):1665- 74.
77. Lo AK-F, Dawson CW, Young LS, Lo K-W. The role of metabolic reprogramming in γ -herpesvirus-associated oncogenesis. *International Journal of Cancer.* 2017;141(8):1512- 21.
78. Ma Q, Cavallin LE, Leung HJ, Chiozzini C, Goldschmidt-Clermont PJ, Mesri EA. A Role for Virally Induced Reactive Oxygen Species in Kaposi's Sarcoma Herpesvirus Tumorigenesis. *Antioxidants & Redox Signaling.* janv 2013;18(1):80- 90.
79. Dai L, Cao Y, Chen Y, Parsons C, Qin Z. Targeting xCT, a cystine-glutamate transporter induces apoptosis and tumor regression for KSHV/HIV-associated lymphoma. *J Hematol Oncol.* 2014;7(1):30.
80. Ma Q, Cavallin LE, Yan B, Zhu S, Duran EM, Wang H, et al. Antitumorigenesis of antioxidants in a transgenic Rac1 model of Kaposi's sarcoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 26 mai 2009;106(21):8683- 8.
81. Gonnella R, Yadav S, Gilardini Montani MS, Granato M, Santarelli R, Garufi A, et al. Oxidant species are involved in T/B-mediated ERK1/2 phosphorylation that activates p53-p21 axis to promote KSHV lytic cycle in PEL cells. *Free Radical Biology and Medicine.* nov 2017;112:327- 35.
82. Li X, Feng J, Sun R. Oxidative Stress Induces Reactivation of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus and Death of Primary Effusion Lymphoma Cells. *Journal of Virology.* 15 janv 2011;85(2):715- 24.

83. Ishikawa C, Mori N. The anti-malaria agent artesunate exhibits cytotoxic effects in primary effusion lymphoma. *Invest New Drugs* [Internet]. 3 sept 2020 [cité 8 sept 2020]; Disponible sur: <http://link.springer.com/10.1007/s10637-020-00996-1>
84. Masud Alam Md, Kariya R, Kawaguchi A, Matsuda K, Kudo E, Okada S. Inhibition of autophagy by chloroquine induces apoptosis in primary effusion lymphoma in vitro and in vivo through induction of endoplasmic reticulum stress. *Apoptosis*. oct 2016;21(10):1191- 201.
85. Matsuno T, Matsuno T, Kariya R, Kariya R, Yano S, Yano S, et al. Diethyldithiocarbamate induces apoptosis in HHV-8-infected primary effusion lymphoma cells via inhibition of the NF- κ B pathway. *International Journal of Oncology*. 1 avr 2012;40(4):1071 - 8.
86. Shigemi Z, Manabe K, Hara N, Baba Y, Hosokawa K, Kagawa H, et al. Methylseleninic acid and sodium selenite induce severe ER stress and subsequent apoptosis through UPR activation in PEL cells. *Chemico-Biological Interactions*. mars 2017;266:28- 37.
87. Wang Y-F, Chen C-Y, Chung S-F, Chiou Y-H, Lo H-R. Involvement of oxidative stress and caspase activation in paclitaxel-induced apoptosis of primary effusion lymphoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* [Internet]. oct 2004 [cité 13 janv 2020];54(4). Disponible sur: <http://link.springer.com/10.1007/s00280-004-0831-0>
88. Matta H, Chaudhary PM. The proteasome inhibitor bortezomib (PS-341) inhibits growth and induces apoptosis in primary effusion lymphoma cells. *Cancer Biology & Therapy*. janv 2005;4(1):84- 9.
89. Granato M, Gilardini Montani MS, Romeo MA, Santarelli R, Gonnella R, D'Orazi G, et al. Metformin triggers apoptosis in PEL cells and alters bortezomib-induced Unfolded Protein Response increasing its cytotoxicity and inhibiting KSHV lytic cycle activation. *Cellular Signalling*. déc 2017;40:239- 47.
90. Urra H, Dufey E, Lisbona F, Rojas-Rivera D, Hetz C. When ER stress reaches a dead end. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. déc 2013;1833(12):3507- 17.

91. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress- induced apoptosis. *EMBO Rep.* sept 2006;7(9):880- 5.
92. Franco R, Cidlowski JA. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death Differ.* oct 2009;16(10):1303- 14.
93. Dai L, Cao Y, Chen Y, Kaleeba JAR, Zabaleta J, Qin Z. identification of novel targets against AIDS-associated. :13.
94. Mahdi AA, Rizvi SHM, Parveen A. Role of Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Responses in Health and Diseases. *Indian J Clin Biochem.* avr 2016;31(2):127- 37.
95. Osowski CM, Urano F. Measuring ER Stress and the Unfolded Protein Response Using Mammalian Tissue Culture System. In: *Methods in Enzymology* [Internet]. Elsevier; 2011 [cité 5 févr 2020]. p. 71- 92. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123851147000040>
96. Merlot AM, Shafie NH, Yu Y, Richardson V, Jansson PJ, Sahni S, et al. Mechanism of the induction of endoplasmic reticulum stress by the anti-cancer agent, di-2-pyridylketone 4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone (Dp44mT): Activation of PERK/eIF2 α , IRE1 α , ATF6 and calmodulin kinase. *Biochemical Pharmacology.* juin 2016;109:27- 47.
97. Johnston BP, Pringle ES, McCormick C. KSHV activates unfolded protein response sensors but suppresses downstream transcriptional responses to support lytic replication. Swaminathan S, éditeur. *PLoS Pathog.* 2 déc 2019;15(12):e1008185.
98. Johnston BP, McCormick C. Herpesviruses and the Unfolded Protein Response. *Viruses.* 21 déc 2019;12(1):17.
99. Rozpedek W, Pytel D, Mucha B, Leszczynska H, Diehl JA, Majsterek I. The Role of the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP Signaling Pathway in Tumor Progression During Endoplasmic Reticulum Stress. *CMM.* 21 juill 2016;16(6):533- 44.
100. Sano R, Reed JC. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* déc 2013;1833(12):3460- 70.

101. Anania VG, Yu K, Gnad F, Pferdehirt RR, Li H, Ma TP, et al. Uncovering a Dual Regulatory Role for Caspases During Endoplasmic Reticulum Stress-induced Cell Death. *Mol Cell Proteomics*. juill 2016;15(7):2293- 307.
102. Shigemi Z, Baba Y, Hara N, Matsuhiro J, Kagawa H, Watanabe T, et al. Effects of ER stress on unfolded protein responses, cell survival, and viral replication in primary effusion lymphoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. janv 2016;469(3):565- 72.
103. Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ*. avr 2004;11(4):381- 9.
104. Boriushkin E, Wang JJ, Zhang SX. Role of p58IPK in Endoplasmic Reticulum Stress-associated Apoptosis and Inflammation. *JOURNAL OF OPHTHALMIC AND VISION RESEARCH*. 9(1):10.
105. Wang N, Zeng G-Z, Yin J-L, Bian Z-X. Artesunate activates the ATF4-CHOP-CHAC1 pathway and affects ferroptosis in Burkitt's Lymphoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. nov 2019;519(3):533- 9.
106. Rohini M, Haritha Menon A, Selvamurugan N. Role of activating transcription factor 3 and its interacting proteins under physiological and pathological conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*. déc 2018;120:310- 7.
107. Scheffer D, Kulcsár G, Nagyéri G, Kiss-Merki M, Rékási Z, Maloy M, et al. Active mixture of serum-circulating small molecules selectively inhibits proliferation and triggers apoptosis in cancer cells via induction of ER stress. *Cellular Signalling*. janv 2020;65:109426.
108. Mungrue IN, Pagnon J, Kohannim O, Gargalovic PS, Lusic AJ. CHAC1/MGC4504 Is a Novel Proapoptotic Component of the Unfolded Protein Response, Downstream of the ATF4-ATF3-CHOP Cascade. *J Immunol*. 1 janv 2009;182(1):466- 76.
109. Crawford RR, Prescott ET, Sylvester CF, Higdon AN, Shan J, Kilberg MS, et al. Human CHAC1 Protein Degrades Glutathione, and mRNA Induction Is Regulated by the

Transcription Factors ATF4 and ATF3 and a Bipartite ATF/CRE Regulatory Element. *J Biol Chem.* 19 juin 2015;290(25):15878- 91.

110. Nakajima S, Kitamura M. Bidirectional regulation of NF- κ B by reactive oxygen species: A role of unfolded protein response. *Free Radical Biology and Medicine.* 1 déc 2013;65:162- 74.
111. McCullough KD, Martindale JL, Klotz L-O, Aw T-Y, Holbrook NJ. Gadd153 Sensitizes Cells to Endoplasmic Reticulum Stress by Down-Regulating Bcl2 and Perturbing the Cellular Redox State. *Mol Cell Biol.* 15 févr 2001;21(4):1249- 59.
112. Verma G, Datta M. The critical role of JNK in the ER-mitochondrial crosstalk during apoptotic cell death. *J Cell Physiol.* mai 2012;227(5):1791- 5.
113. Dhanasekaran DN, Reddy EP. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene.* oct 2008;27(48):6245- 51.
114. Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol.* mars 2011;13(3):184- 90.
115. Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N- terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation [Internet]. [cité 3 juin 2021]. Disponible sur: <https://www.embopress.org/doi/epdf/10.1093/emboj/18.23.6845>
116. Christian F, Smith EL, Carmody RJ. The Regulation of NF- κ B Subunits by Phosphorylation. *Cells* [Internet]. 18 mars 2016 [cité 4 juin 2021];5(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4810097/>
117. Ben-Neriah Y, Karin M. Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker. *Nat Immunol.* août 2011;12(8):715- 23.
118. Kiessling MK, Klemke CD, Kamiński MM, Galani IE, Krammer PH, Gülow K. Inhibition of Constitutively Activated Nuclear Factor- κ B Induces Reactive Oxygen Species- and Iron-Dependent Cell Death in Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Cancer Res.* 15 mars 2009;69(6):2365- 74.

119. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int.* juin 2019;43(6):582- 92.
120. Lee Y-S, Lee D-H, Choudry HA, Bartlett DL, Lee YJ. Ferroptosis-Induced Endoplasmic Reticulum Stress: Cross-talk between Ferroptosis and Apoptosis. *Mol Cancer Res.* juill 2018;16(7):1073- 6.
121. Berghe TV, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H, Vandenabeele P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* févr 2014;15(2):135- 47.
122. Ganesan S, Chaurasiya ND, Sahu R, Walker LA, Tekwani BL. Understanding the mechanisms for metabolism-linked hemolytic toxicity of primaquine against glucose 6-phosphate dehydrogenase deficient human erythrocytes: Evaluation of eryptotic pathway. *Toxicology.* mars 2012;294(1):54- 60.
123. Ganesan S, Tekwani BL, Sahu R, Tripathi LM, Walker LA. Cytochrome P450-dependent toxic effects of primaquine on human erythrocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology.* nov 2009;241(1):14- 22.
124. Duparc S, Beutler E. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency and Antimalarial Drug Development. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 1 oct 2007;77(4):779- 89.
125. Cappellini MD, Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *2008;371:11.*
126. Sarosiek KA, Cavallin LE, Bhatt S, Toomey NL, Natkunam Y, Blasini W, et al. Efficacy of bortezomib in a direct xenograft model of primary effusion lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 20 juill 2010;107(29):13069- 74.
127. Jenner RG, Maillard K, Cattini N, Weiss RA, Boshoff C, Wooster R, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-infected primary effusion lymphoma has a plasma cell gene expression profile. *PNAS.* 2 sept 2003;100(18):10399- 404.

Remerciements

Aux Professeurs Diane Descamps et Patrice Morand, pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse et d'en être les rapporteurs. Merci aux Professeurs Angèle Soria et Sylvain Choquet ainsi qu'au Docteur François-Loïc Cosset, pour avoir également accepté de participer à ce jury de thèse.

Aux Professeurs Anne-Geneviève Marcelin et Vincent Calvez, pour m'avoir accueilli au sein de votre équipe de recherche, pour m'avoir permis de partager votre intérêt pour la virologie et pour m'avoir confié ce projet de recherche thérapeutique qui m'a passionné. Merci de votre confiance, de votre soutien et de votre accompagnement toujours valorisant.

Aux Professeurs Nicolas Dupin, Ousmane Faye, Almoustapha Issiaka Maiga, ainsi qu'au Docteur Laurianne Beauvais Remigereau, pour votre participation à ce projet et pour avoir permis sa réalisation sur le plan clinique.

A Isabelle Malet, pour ton soutien toujours rassurant et bienveillant, pour les (si nombreuses !) relectures de ce manuscrit et pour tes précieux conseils.

A Philippe Grange, pour ton aide précieuse et ton accompagnement tout au long de ce projet. Merci pour tes conseils toujours pertinents, pour ta patience et pour tes multiples relectures, y compris les 17 pages de ma discussion de thèse ;).

A Sophie Sayon et Nathalie Désiré, pour votre accueil chaleureux lors de mes premiers jours au labo, pour votre présence et votre aide régulière dans mes manip. Grâce à vous, la culture cellulaire n'a plus de secret pour moi, dès lors qu'il n'y a pas de paire de ciseaux aux alentours ;).

A Valentin Leducq, pour ta présence au quotidien. Merci pour ta patience et ton calme, même après la 75^{ème} modification des figures de l'article ;).

A Basma Abdi, pour ton soutien et ta bonne humeur inflexible. Je suis heureuse d'avoir pu partager avec toi ces années de thèse, tout particulièrement la dernière (!) qui n'aurait vraiment pas été la même sans toi.

A Aude Jary, pour ton aide et tes relectures dans ce manuscrit. Vivement le prochain projet Chemsex 2.0 !

A toute l'équipe de recherche de Virologie, avec qui travailler et échanger est un plaisir au quotidien.

Aux techniciens et biologistes du service de Virologie, pour votre accueil et votre bonne humeur. Merci tout particulièrement pour ces moments chaleureux et conviviaux lors des week-ends de garde.

A Isabelle Cousin, pour ton écoute bienveillante, pour nos discussions passionnantes et pour ton aide à de si nombreuses occasions.

A Emmanuel Laplantine, pour m'avoir accueillie chaleureusement dans ton laboratoire. Merci d'avoir partagé avec moi tes connaissances aussi bien sur le plan technique que scientifique. A quand le prochain café !

A mes parents, Raphaële et Philippe, pour votre soutien et votre amour inconditionnels. Pour les valeurs que vous m'avez tendrement inculquées qui font de moi la personne que je suis aujourd'hui.

A mon frère Adrien, pour ton écoute toujours bienveillante et ton affection complice.

A mes amis, notamment la team « Gwada » (Laury, Ludo, Myriam et Val), la team « Jussieu » (Lloyd, Vivi et Juju) et la team « 13^{ème} » (Eli, Léonid et Mau), pour votre soutien et votre affection inflexibles. Merci pour tous ces moments d'évasion (même à distance !) indispensables et tellement précieux.

Résumé

L'Herpèsvirus Humain 8 (HHV-8) est l'un des sept virus humains reconnus à caractère oncogénique. Les principales pathologies tumorales associées au virus HHV-8, à savoir la maladie de Kaposi (KS), le lymphome primitif des séreuses (PEL) et la maladie de Castleman multicentrique (MCD), représentent encore à ce jour un véritable défi clinique, étant donné le peu d'options thérapeutiques disponibles et efficaces pour y faire face. Au cours de nos études *in vitro* nous avons pu démontrer l'effet cytotoxique et pro-apoptotique de l'antipaludéen primaquine diphosphate, spécifique aux lignées cellulaires de PEL infectées par l'HHV-8. Nous avons également pu mettre en évidence que l'induction d'un stress oxydatif, ainsi que des voies pro-apoptotiques de l'UPR liées à un stress sévère du réticulum endoplasmique, prenait part aux mécanismes d'actions mis en œuvre dans l'effet pro-apoptotique de la primaquine. Enfin, des études *in vivo* ont permis de montrer une efficacité anti-tumorale très encourageante de la primaquine, d'une part chez un modèle de souris PEL et d'autre part, au cours d'une étude pilote chez des patients présentant une forme sévère du KS. Aucuns effets secondaires manifestes n'ont été observés chez les souris et les patients traités à la primaquine. Ces études précliniques et cliniques permettent donc de considérer la primaquine diphosphate comme un nouveau candidat très prometteur pour le traitement des cancers associés à l'HHV-8.

Abstract

The Human Herpesvirus 8 (HHV-8) is one of seven recognized human cancer causing viruses. HHV-8 is a principal causative agent of several human cancers including Kaposi's sarcoma (KS), multicentric Castleman's disease (MCD) and primary effusion lymphoma (PEL), which represent important and difficult to treat clinical problem, with very few therapeutic options. In the present *in vitro* study, we demonstrated the specific cytotoxic and pro-apoptotic effect of the antimalarial primaquine diphosphate in HHV-8-infected PEL cells, without any toxicity on different uninfected cells. We also found that primaquine-induced oxidative stress and pro-apoptotic UPR activated by excessive reticulum endoplasmic stress, to be part of the pro-apoptotic mechanisms of action of primaquine in PEL cells. Finally, PQ treatment had a clinical positive effect on tumor growth in a *in vivo* NOD/SCID xenograft PEL mouse model, as well as in a pilot clinical study in human harboring very severe KS. Importantly, primaquine was well tolerated and none adverse event and overt toxic effects were observed in both primaquine-treated mice and patients. The combination of preclinical and clinical observations and results from our analysis thereby raising the possibility that primaquine may be used as a promising targeted agent in treatment of HHV-8-associated cancers.