



HAL
open science

Principales cibles d'intérêt pour le développement d'un vaccin prophylactique ou thérapeutique contre le virus d'Epstein-Barr : focus sur la glycoprotéine gB

Vincent Jean-Pierre

► To cite this version:

Vincent Jean-Pierre. Principales cibles d'intérêt pour le développement d'un vaccin prophylactique ou thérapeutique contre le virus d'Epstein-Barr : focus sur la glycoprotéine gB. Sciences pharmaceutiques. 2021. dumas-03423475

HAL Id: dumas-03423475

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03423475v1>

Submitted on 10 Nov 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance.

La propriété intellectuelle du document reste entièrement celle du ou des auteurs. Les utilisateurs doivent respecter le droit d'auteur selon la législation en vigueur, et sont soumis aux règles habituelles du bon usage, comme pour les publications sur papier : respect des travaux originaux, citation, interdiction du pillage intellectuel, etc.

Il est mis à disposition de toute personne intéressée par l'intermédiaire de [l'archive ouverte DUMAS](#) (Dépôt Universitaire de Mémoires Après Soutenance).

Si vous désirez contacter son ou ses auteurs, nous vous invitons à consulter la page de DUMAS présentant le document. Si l'auteur l'a autorisé, son adresse mail apparaîtra lorsque vous cliquerez sur le bouton « Détails » (à droite du nom).

Dans le cas contraire, vous pouvez consulter en ligne les annuaires de l'ordre des médecins, des pharmaciens et des sages-femmes.

Contact à la Bibliothèque universitaire de Médecine Pharmacie de Grenoble :

bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

Année : 2021

**PRINCIPALES CIBLES D'INTÉRÊT POUR LE DÉVELOPPEMENT
D'UN VACCIN PROPHYLACTIQUE OU THÉRAPEUTIQUE CONTRE
LE VIRUS D'EPSTEIN-BARR : FOCUS SUR LA GLYCOPROTÉINE GB**

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

SPÉCIALITÉ : BIOLOGIE MÉDICALE

Par M. Vincent JEAN-PIERRE

[Données à caractère personnel]

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Le : 15/10/2021

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury :

Mme le Professeur Muriel CORNET

Membres :

M. le Professeur Olivier ÉPAULARD

Mme le Docteur Raphaële GERMI (directrice de thèse)

M. le Docteur Julien LUPO

L'UFR de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

ENSEIGNANTS - CHERCHEURS Année 2020 / 2021

Doyen de la Faculté - **Pr. Michel SEVE**
Vice-Doyen Pédagogie - **Mr Pierre CAVAILLES**
Vice-Doyen Recherche – **Pr. Walid RACHIDI**

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
MCF	ALDEBERT	DELPHINE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheREx
PU-PH	ALLENET	BENOIT	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, THEMAS
PU	BAKRI	ABDELAZIZ	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
CDD	BARDET	JEAN-DIDIER	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, THEMAS
MCF	BATANDIER	CECILE	LBFA – INSERM U1055
PU-PH	BEDOUCHE	PIERRICK	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, THEMAS
MCF	BELAIDI-CORSAT	ELISE	HP2, Inserm U1042
MAST	BELLET	BEATRICE	-
MCF	BOUCHERLE	BENJAMIN	DPM - UMR 5063 CNRS
PU	BOUMENDJEL	AHCENE	LRB /INSERM U 1039
MCF	BOURGOIN	SANDRINE	TIMC
MCF	BRETON	JEAN	LCIB – UMR E3 CEA
MCF	BRIANCON-MARJOLLET	ANNE	HP2 – INSERM U1042
PU	BURMEISTER	WILHEM	UVHCI- UMI 3265 EMBL CNRS
MCU-PH	BUSSER	BENOIT	Institute for Advanced Biosciences, UGA / Inserm U 1209 / CNRS 5309
Professeur Emérite	CALOP	JEAN	
MCF	CAVAILLES	PIERRE	IAB
MCU-PH	CHANOINE	SEBASTIEN	CR UGA - INSERM U1209 - CNRS 5309
AHU	CHEVALIER	SIMON	TIMC IMAG
MCF	CHOISNARD	LUC	DPM – UMR 5063 CNRS
MCU-PH	CHOVELON	BENOIT	DPM – UMR 5063 CNRS
PU-PH	CORNET	MURIEL	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheREx
Professeur Emérite	DANEL	VINCENT	-
PU	DECOUT	JEAN-LUC	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF Emérite	DELETRAZ-DELPORTE	MARTINE	LPSS – EAM 4129 LYON
MCF	DEMEILLERS	CHRISTINE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
PU-PH	DROUET	CHRISTIAN	GREPI EA7408
PU	DROUET	EMMANUEL	IBS – UMR 5075 CEA CNRS HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale
MCF	DURMORT	CLAIRE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS
PU-PH	FAURE	PATRICE	DPM – UMR5063
MCF	FAURE-JOYEUX	MARIE	HP2 – INSERM U1042

Mise à jour le 11/05/2021 Sana HACHANI

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
PRCE	FITE	ANDREE	-
MCU-PH	GARNAUD	CECILE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX
PRAG	GAUCHARD	PIERRE-ALEXIS	-
MCU-PH	GERMI	RAPHAELE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale
MCF	GEZE	ANNABELLE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF Emérite	GILLY	CATHERINE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	GODIN-RIBUOT	DIANE	HP2 – INSERM U1042
MCF	GONINDARD	CHRISTELLE	LECA – UMR CNRS 5553
Professeure Emérite	GRILLOT	RENEE	-
MCF Emérite	GROSSET	CATHERINE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	GUIEU	VALERIE	DPM – UMR 5063 CNRS
CDD	HENNEBIQUE	AURELIE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX
MCF	HININGER-FAVIER	ISABELLE	LBFA – INSERM U1055
MCF	KHALEF	NAWEL	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
MCF	KOTZKI	SYLVAIN	HP2 – UMR S1042
MCF	KRIVOBOK	SERGE	DPM – UMR 5063 CNRS
AHU	LEENHARDT	JULIEN	INSERM – U1039
PU	LENORMAND	JEAN-LUC	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX
PU	MARTIN	DONALD	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
PRCE	MATTHYS	LAURENCE	-
AHU	MINOVES	MELANIE	HP2 – INSERM U1042
PU	MOINARD	CHRISTOPHE	LBFA - INSERM U1055
PU-PH	MOSSUZ	PASCAL	IAB – INSERM U1209
MCF	MOUHAMADOU	BELLO	LECA – UMR 5553 CNRS
MCF	NICOLLE	EDWIGE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	OUKACINE	FARID	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	PERES	BASILE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	PEUCHMAUR	MARINE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	PEYRIN	ERIC	DPM – UMR 5063 CNRS
AHU	PLUCHART	HELENE	TIMC-IMAG – UMR 5525 CNRS, THEMAS
PU	RACHIDI	WALID	BGE/BIOMICS/ CEA
MCF	RAVELET	CORINNE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	RIBUOT	CHRISTOPHE	HP2 – INSERM U1042
PAST	RIEU	ISABELLE	-
Professeure Emérite	ROUSSEL	ANNE-MARIE	-
PU-PH	SEVE	MICHEL	TIMC
MCF	SOUARD	FLORENCE	DPM – UMR 5063 CNRS

Mise à jour le 11/05/2021 Sana HACHANI

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
MCF	SPANO	MONIQUE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS
MCF	TARBOURIECH	NICOLAS	IBS – UMR 5075 CEA CNRS
MCF	VANHAVERBEKE	CECILE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	WARTHER	DAVID	DPM
Professeur Emérite	WOUESSIDJEWÉ	DENIS	-

AHU : Assistant Hospitalo-Universitaire

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches

BCI : Biologie du Cancer et de l'Infection

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CIB : Centre d'Innovation en Biologie

CRI : Centre de Recherche INSERM

CNRS : Centre National de Recherche Scientifique

DCE : Doctorants Contractuels Enseignement

DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire

HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire

IAB : Institute for Advanced Biosciences

IBS : Institut de Biologie Structurale

LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes

LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée

LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux

LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie

LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine

LPSS : Laboratoire Parcours Santé Systémique

LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques

MAST : Maître de Conférences Associé à Temps Partiel

MCF : Maître de Conférences des Universités

MCU-PH : Maître de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers

PAST : Professeur Associé à Temps Partiel

PRAG : Professeur Agrégé

PRCE : Professeur certifié affecté dans l'enseignement

PU : Professeur des Universités

PU-PH : Professeur des Universités et Praticiens Hospitaliers

SyMMES : Systèmes Moléculaires et nanoMatériaux pour l'Énergie et la Santé

TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation

UMR : Unité Mixte de Recherche

UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury

À Madame le Professeur Muriel CORNET,

Merci de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse. J'ai été heureux d'avoir pu travailler à vos côtés dans le service de Parasitologie-Mycologie pendant mon 5^{ème} semestre d'internat. Soyez assurée de mon profond respect.

À Monsieur le Professeur Olivier EPAULARD,

Merci de me faire l'honneur de juger ce travail. Je vous suis reconnaissant pour les connaissances que vous m'avez transmises lors du DU « Thérapeutiques anti-infectieuses ». Vos compétences professionnelles m'inspirent le plus grand respect.

À Madame le Docteur Raphaële GERMI,

Merci de m'avoir accompagné tout au long de ce travail, depuis le Master 2 jusqu'à aujourd'hui en tant que directrice de thèse. Merci de m'avoir proposé de publier mon premier article scientifique. Merci pour ta disponibilité et ton aide précieuse pour la correction de cette thèse.

À Monsieur le Docteur Julien LUPO,

Merci de me faire l'honneur de participer à mon jury de thèse. Merci pour tout l'intérêt que tu as porté à ce travail. Merci pour ton soutien, pour ton humour et pour nos échanges complices en regardant Belledonne.

À l'équipe de recherche de l'IBS

À Monsieur le Professeur Pascal POIGNARD,

Merci de m'avoir accueilli à l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble et d'avoir partagé ton expertise dans le domaine des anticorps neutralisants.

À Madame le Docteur Marlyse BUISSON,

Merci pour toutes les heures passées à me former sur des techniques essentielles en recherche, pour toutes tes idées qui ont fait avancer le projet, pour tout le savoir que tu as su me transmettre et pour les nombreux moments de complicité qu'on a pu partager.

À Madame Laurence GROSSI,

Merci d'avoir pris le temps de m'expliquer les bases techniques de la neutralisation, pour ton investissement à mes côtés durant mon année-recherche et pour notre complicité.

À Monsieur le Docteur Sébastien DERGAN-DYLON et Madame Sylvie BERTHIER,

Merci d'avoir pris le temps de m'initier à la cytométrie en flux et au logiciel FlowJo.

À Axelle, Benjamin, Jean-Mathieu et Romy,

Merci de m'avoir intégré rapidement à l'équipe de recherche, merci pour votre humour, vos moments de folie et pour votre soutien.

Aux équipes des laboratoires croisées lors de mon internat,

à Saint-Étienne, à Voiron, à Grenoble et à Nîmes.

À tous ceux avec qui j'ai vécu à l'internat,

À mes autres amis,

Et à ma famille...

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	7
LISTE DES TABLEAUX	7
LISTE DES ABRÉVIATIONS	8
TRAVAIL BIBLIOGRAPHIQUE.....	10
1. Introduction	10
2. Entrée du virus et vaccins prophylactiques	12
2.1. <i>Entrée de l'EBV dans les cellules B</i>	13
2.2. <i>Entrée de l'EBV dans les cellules épithéliales</i>	16
2.3. <i>Tropisme de l'infection à EBV</i>	17
2.4. <i>Autres glycoprotéines de surface de l'EBV</i>	19
2.5. <i>Principaux vaccins prophylactiques anti-gp350/220</i>	20
3. Latence virale, réplication virale, et vaccins thérapeutiques	24
3.1. <i>Cycle de latence de l'EBV</i>	24
3.2. <i>Cycle lytique de l'EBV</i>	28
3.3. <i>Principaux vaccins thérapeutiques anti-EBV testés chez l'homme</i>	30
4. Optimisation des stratégies vaccinales anti-EBV	35
4.1. <i>Optimisation des vaccins prophylactiques</i>	35
4.2. <i>Optimisation des vaccins thérapeutiques</i>	41
5. Discussion	43
TRAVAIL EXPÉRIMENTAL	44
1. Introduction	44
2. Matériel & Méthodes	47
2.1. <i>Culture cellulaire</i>	47
2.2. <i>Production de mutants de gB</i>	48
2.3. <i>Transformation</i>	50
2.4. <i>Transfection</i>	50
2.5. <i>Évaluation de l'expression de gB et ses mutants à la surface des cellules</i>	51
2.6. <i>Évaluation de la présence d'anticorps anti-gB dans les sérums de patients</i>	52
2.7. <i>Production de virus EBV B95-8F à tropisme cellulaire B</i>	52
2.8. <i>Test de neutralisation de l'infection par EBV des cellules B Raji, par le sérum de patients</i>	53
3. Résultats	56
3.1. <i>Construction de mutants de gB</i>	56
3.2. <i>Expression des mutants de gB à la surface cellulaire</i>	58
3.3. <i>Détection d'anticorps anti-gB dans le sérum de patients séropositifs pour l'EBV</i>	59
3.4. <i>Mise en évidence du pouvoir neutralisant du sérum de sujets séropositifs pour l'EBV</i>	66
3.5. <i>Mise en évidence du pouvoir neutralisant de deux spécialités d'immunoglobulines humaines polyvalentes</i>	68
3.6. <i>Corrélation entre le taux d'anticorps anti-VCA, le taux d'anticorps anti-gB et le pouvoir neutralisant</i>	70
4. Discussion	73
5. Perspectives	79

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Entrée de l'EBV par endocytose dans les cellules B.....	15
Figure 2 : Entrée de l'EBV par fusion directe dans les cellules épithéliales.	18
Figure 3 : Structure générale de l'EBV.....	20
Figure 4 : Stratégies vaccinales prophylactiques utilisant l'antigène gp350/220.	23
Figure 5 : Profils d'expression des gènes de latence de l'EBV et implication de l'immunité cellulaire, de l'expression des gènes de latence et de la mutation des gènes cellulaires dans les cancers associés à l'EBV.	27
Figure 6 : Expression séquentielle des gènes impliqués dans le cycle lytique d'EBV.	30
Figure 7 : Stratégies vaccinales thérapeutiques.	34
Figure 8 : Optimisation des stratégies vaccinales prophylactiques.....	40
Figure 9 : Optimisation des stratégies vaccinales thérapeutiques.	42
Figure 10 : Représentation schématique de la glycoprotéine gB de l'EBV.....	45
Figure 11 : Production de mutants de gB avec le protocole In-Fusion® (exemple de gB ₇₈₁).	49
Figure 12 : Test de neutralisation de l'infection par EBV des cellules B, par le sérum de patients.	55
Figure 13 : Séquence nucléotidique du domaine C-terminal de gB et amorces sens et anti-sens utilisées pour générer les mutants gB ₇₈₁ , gB ₈₂₅ , gB ₈₃₇ et gB ₈₄₃	57
Figure 14 : Expression de gB _{WT} et ses mutants à la surface des cellules HEK 293T.....	59
Figure 15 : Évaluation de la capacité des constructions gB _{WT} et gB ₇₈₁ à mettre en évidence des anticorps anti-gB dans le sérum de patients.	62
Figure 16 : Évaluation de la présence d'anticorps anti-gB dans les sérums de patients.....	63
Figure 17 : Évaluation de la présence d'anticorps anti-gB dans les sérums de patients.....	65
Figure 18 : Neutralisation de l'infection des cellules B Raji par le virus EBV B95-8F, par les sérums de patients.	67
Figure 19 : Neutralisation de l'infection des cellules B Raji par le virus EBV B95-8F, par les spécialités d'immunoglobulines humaines polyvalentes CLAIRYG® et TEGELINE®.	69
Figure 20 : Droites de corrélation linéaire entre le taux d'IgG anti-gB mesuré avec la construction gB ₇₈₁ (A) ou la construction gB ₈₂₅ (B) et les DI50 obtenues avec les sérums 1, 2 et 3.....	72
Figure 21 : Expression de gB _{WT} et des mutants de gB d'après Garcia et al. (89).	75
Figure 22 : Test de neutralisation de l'infection par EBV des cellules épithéliales, par le sérum de patients.....	80
Figure 23 : Expérience de déplétion d'un sérum de patient séropositif pour l'EBV (EBV +), en anticorps anti-gB (exemple de gB ₈₂₅).	82
Figure 24 : Production d'anticorps monoclonaux anti-gB et caractérisation des épitopes cibles.	84

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Séquençage des mutants de gB.....	56
Tableau II : Résultats des sérologies EBV des cinq sérums sélectionnés.....	60
Tableau III : Résultats des sérologies EBV de CLAIRYG® et de TEGELINE®.	68
Tableau IV : Données de sérologie (anticorps anti-VCA et anti-gB) et de neutralisation.	70

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2 nd	Anticorps secondaire
AD	Domaine antigénique
Ad5	Adénovirus de type 5
APC	Allophycocyanine
CD	Cellule dendritique
CD35, CR21	Récepteur du complément de type 1
CHO	Chinese hamster ovary
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	Cytomégalovirus
CNP	Carcinome nasopharyngé
CR2	Récepteur du complément de type 2
CTD	Domaine de la queue cytoplasmique
CTLD	Domaine lectine de type C
DI50	Dilution inhibitrice 50%
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
EBER	Epstein-Barr encoded small RNA
EBNA	Epstein-Barr nuclear antigen
EBV	Virus d'Epstein-Barr
EBV B95-8F	EBV B95-8 F-Factor
EGC	EBV GFP cells
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EphA2	Récepteur à éphrine de type tyrosine kinase A2
Fab	Fragment antigen binding
FBN	Fibronectine
G, gp	Glycoprotéine
gB _{WT}	gB sauvage
GFP	Green fluorescent protein
GLA/SE	Glucopyranosyl lipide A / émulsion stable
HHV-4	Herpesvirus humain de type 4
HSV-1	Virus herpès simplex 1
IgIV	Immunoglobuline humaine normale
LBD	Ligand binding domain
L-g/P/S	L-glutamine / pénicilline / streptomycine

LMP	Latent membrane protein
LNCR	Loi normale centrée réduite
LS	Lumazine synthase
miARN	Micro-ARN viraux
MNI	Mononucléose infectieuse
MVA	Virus de la vaccine Ankara modifié
NDV	Virus de la maladie de Newcastle
NRP1	Neuropiline-1
NS	Sans sérum
NT	Non transfecté
PBS	Solution saline tamponnée
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PE	Phycoérythrine
RPMI	Roswell park memorial institute
SLPT	Syndrome lymphoprolifératif post-transplantation
SV40	Virus simian 40
SVF	Sérum de veau fœtal
Sx	Sérum x
TM	Domaine transmembranaire
VCA	Antigène de capsid virale
VLP	Virus-like particle
VSV	Virus de la stomatite vésiculaire
VV	Virus de la vaccine

TRAVAIL BIBLIOGRAPHIQUE

1. Introduction

Le virus d'Epstein-Barr (EBV), aussi connu sous le nom d'Herpesvirus humain de type 4 (HHV-4), appartient à la famille des *Herpesviridae* et à la sous-famille des *Gammaherpesvirinae*. Ce virus enveloppé à ADN double brin qui mesure 150 à 200 nm de diamètre, a été découvert en 1964 à partir de cellules tumorales de lymphome de Burkitt (1).

La transmission interhumaine de ce virus se fait principalement par la salive. Dans les pays en voie de développement, presque tous les enfants sont infectés avant l'âge de quatre ans. Dans les pays développés, moins de 50% des enfants entre cinq et dix ans sont séropositifs pour l'EBV (2). La primo-infection à EBV est le plus souvent asymptomatique mais peut être associée à la mononucléose infectieuse (MNI) qui se caractérise notamment par une angine, une lymphadénopathie, de la fièvre et de la fatigue. Plus la primo-infection survient tardivement dans la vie d'un individu (à l'adolescence ou à l'âge adulte) plus le risque de développer une MNI est important (3). Cette maladie généralement bénigne peut cependant entraîner des complications graves dans 1% des cas (encéphalite, myocardite, complications hépatiques etc...) ou invalidantes, telle que la fatigue chronique qui se poursuit jusqu'à six mois au moins après l'infection virale, pour 10% des patients (4).

Après la primo-infection, l'EBV persiste à vie dans les lymphocytes B mémoires de l'hôte infecté, en général sans conséquence pathologique pour l'individu. Cependant, cette latence virale peut parfois être associée au développement d'un cancer. L'EBV est d'ailleurs classé dans le groupe 1 des agents cancérigènes pour l'homme. Il est le premier virus humain oncogène à avoir été découvert et reste à

ce jour, le seul pathogène humain qui peut immortaliser et transformer les cellules *in vitro* (5). Ayant notamment un tropisme pour les cellules B, l'infection à EBV peut-être associée à des lymphomes B de type Hodgkin ou Burkitt, mais aussi à des syndromes lymphoprolifératifs observés dans un contexte d'immunodépression, surtout chez les patients greffés d'organe solide ou de cellules souches hématopoïétiques, dans la première année suivant la greffe (6). Ayant aussi un tropisme pour les cellules épithéliales, l'EBV est à l'origine des carcinomes du nasopharynx et peut être associé aux carcinomes de l'estomac (7). Cependant, comme le virus ne persiste pas au niveau des cellules épithéliales, les tumeurs épithéliales proviennent du réservoir viral latent présent dans les cellules B (8). On estime à 200 000, le nombre de nouveaux cas de cancers induits par l'EBV chaque année, ce qui représente 1,5% des cancers recensés au niveau mondial (9). Ces cancers sont responsables d'environ 164 000 morts par an dans le monde (10).

L'EBV pourrait aussi être associé au développement de maladies inflammatoires et auto-immunes comme la sclérose en plaques (11), le lupus érythémateux disséminé (12), la polyarthrite rhumatoïde (13) et le syndrome de Sjögren (14), mais ces associations restent controversées.

Ainsi, en infectant plus de 90% de la population adulte mondiale, l'EBV est l'un des virus les plus répandus dans le monde et pourtant, à ce jour, aucun traitement efficace ni vaccin anti-EBV ne sont disponibles (15).

Par conséquent, les bénéfices d'un vaccin prophylactique (prévenant l'infection à EBV et protégeant ainsi des maladies associées) ou d'un vaccin thérapeutique (traitant directement les pathologies associées à l'EBV), seraient considérables en santé publique.

Le pouvoir oncogène de l'EBV empêche son utilisation sous forme atténuée ou inactivée dans des projets vaccinaux. Ainsi, le développement d'un vaccin anti-EBV implique de connaître au mieux, l'ensemble des acteurs qui contribuent au cycle de vie du virus. Il s'agit des protéines virales et cellulaires impliquées dans l'entrée du virus dans les cellules hôtes, pour les vaccins prophylactiques et des protéines impliquées dans la latence virale, pour les vaccins thérapeutiques.

2. Entrée du virus et vaccins prophylactiques

Lors de la primo-infection, le virus traverse la barrière des cellules épithéliales des muqueuses par transcytose pour ensuite infecter les cellules B dans les tissus lymphoïdes secondaires sous-muqueux (16).

L'entrée de l'EBV peut se résumer en deux étapes successives. La première étape est la liaison du virus aux cellules cibles impliquant des glycoprotéines virales et des récepteurs d'attachement cellulaires, qui rapprochent et concentrent le virus à la surface des cellules cibles sans déclencher les mécanismes de fusion. Contrairement à la plupart des autres virus enveloppés, qui utilisent seulement une ou deux glycoprotéines, plusieurs glycoprotéines d'enveloppe virales jouent un rôle primordial dans les mécanismes d'entrée de l'EBV dans les cellules B et les cellules épithéliales.

La seconde étape est la fusion du virus à la membrane endocyttaire des cellules B ou à la membrane plasmique des cellules épithéliales, impliquant les protéines de la machinerie de fusion hautement conservées au sein des *Herpesviridae* et des récepteurs primaires d'entrée (17). De façon intéressante, les mécanismes et les glycoprotéines d'entrée du virus dans la cellule B et dans la cellule épithéliale, diffèrent. L'entrée de l'EBV dans les cellules B se fait par endocytose tandis qu'elle

se fait par fusion directe des membranes virale et cellulaire, dans les cellules épithéliales (18).

2.1. *Entrée de l'EBV dans les cellules B*

La glycoprotéine 350/220 (gp350/220), exprimée sur l'enveloppe de l'EBV, se présente sous deux formes, l'une de 350 kDa et l'autre de 220 kDa environ (épissage alternatif du même transcrit primaire d'ARN). Elle est largement impliquée dans l'infection des cellules B alors que son action est limitée dans l'infection des cellules épithéliales. L'entrée de l'EBV dans les cellules B démarre avec la liaison de la gp350/220 *via* ses résidus 1 à 470 situés à l'extrémité N-terminale, au récepteur du complément de type 2 (CR2), également appelé CD21, ou au récepteur du complément de type 1 (CD35 ou CR21) (17). La **Figure 1** permet de comprendre le détail de ces interactions.

Interviennent ensuite les glycoprotéines H (gH), L (gL) et 42 (gp42), qui régulent l'activation de la glycoprotéine B (gB), acteur direct de la fusion membranaire (19). Ces quatre glycoprotéines forment, ensemble, l'appareil de fusion permettant à l'EBV d'entrer dans les cellules B.

La glycoprotéine gH est composée de quatre domaines allant de D-I (en N-terminal) à D-IV (en C-terminal). La glycoprotéine gL interagit avec le domaine D-I pour former le complexe hétérodimérique gH/gL (appelé aussi gp85/gp25) (20). L'extrémité N-terminale allongée de la gp42 s'enroule autour des domaines D-II, D-III et D-IV de gH et se lie notamment au motif de liaison KGD présent au sein du domaine D-II (21).

Après la liaison de gp350/220 avec le CR2, la gp42, grâce à son domaine lectine de type C (CTLN situé en C-terminal), interagit spécifiquement avec les chaînes β

des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II (22) (23). Cette interaction élargit la poche hydrophobe du CTLD de gp42 et permet au complexe gH/gL (par les résidus glutamine (Q) 54 et lysine (K) 94 de la glycoprotéine gL) de se lier à la forme pré-fusionnelle de gB (résidus 450 à 800 de gB) (24). La liaison de gH/gL à gB déclenche le changement conformationnel de gB en une forme intermédiaire qui permet l'insertion des boucles de fusion de gB (résidus hydrophobes WY₁₁₂₋₁₁₃ et WLIW₁₉₃₋₁₉₆) dans la membrane de la cellule B. La fusion des bicouches virale et cellulaire permet la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme des cellules cibles et la gB se retrouve dans une conformation stable post-fusionnelle (25). À l'heure actuelle, seule la structure post-fusionnelle de gB est connue.

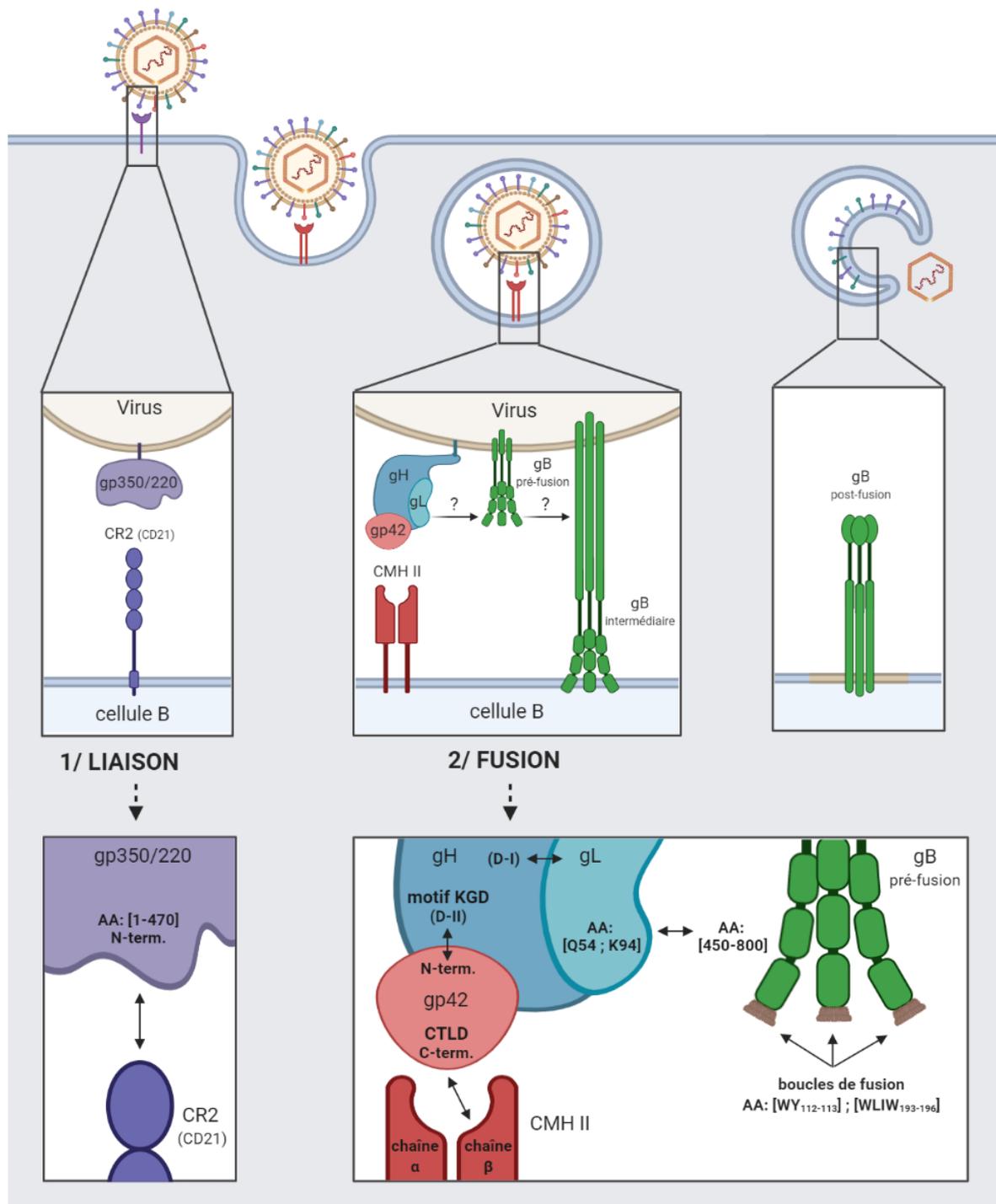


Figure 1 : Entrée de l'EBV par endocytose dans les cellules B.

1/ Liaison du virus à la cellule B faisant intervenir la gp350/220 virale et le récepteur cellulaire CR2. 2/ Fusion des membranes virale et cellulaire faisant intervenir les glycoprotéines virales gH/gL, gp42 et gB et le CMH de classe II cellulaire.

2.2. *Entrée de l'EBV dans les cellules épithéliales*

Le CR2, auquel gp350/220 se lie pour entrer dans les cellules B, n'est pas constamment présent au sein des cellules épithéliales. Ceci rend le rôle de gp350/220 mineur dans l'entrée d'EBV dans ces cellules épithéliales. Cependant, la liaison du virus aux cellules épithéliales CR2-négatives est cinq fois plus faible qu'aux cellules épithéliales CR2-positives (26).

L'interaction entre l'intégrine cellulaire $\alpha\beta 1$ et le motif de liaison aux intégrines RGD (arginine/glycine/acide aspartique) de la protéine virale BMRF2 est une première étape facilitatrice de l'entrée, mais elle n'est pas obligatoire (**Figure 2**) (17). La protéine BMRF2 peut aussi former un complexe avec la protéine virale BDLF2 (non représentée dans la **Figure 2**). BDLF2 est une protéine membranaire de type II qui participe au réarrangement du réseau cellulaire d'actine ce qui augmente les contacts entre les cellules et favorise la diffusion du virus de cellules en cellules (27).

Le complexe gH/gL du virus s'attache ensuite aux intégrines cellulaires $\alpha\beta 5$, $\alpha\beta 6$ et $\alpha\beta 8$ grâce au motif KGD de gH (17) (28). Le motif KGD a donc la capacité de se lier de manière compétitive, soit aux intégrines des cellules épithéliales, soit à la gp42. C'est cette double fonctionnalité du motif KGD de gH qui fait de gp42, un acteur déterminant pour le tropisme cellulaire de l'EBV (29). En effet la présence de gp42 masque le motif KGD de gH aux intégrines des cellules épithéliales et inhibe la fusion du virus à ces cellules.

L'étape suivante fait intervenir la protéine cellulaire EphA2 (récepteur à éphrine de type tyrosine kinase A2) (30). L'ectodomaine de cette protéine est composé de quatre régions : une région LBD (ligand binding domain) qui peut se lier à gH/gL et à gB, une région riche en cystéine et deux régions fibronectines (FBN) qui

interagissent avec gB. Cette étape est essentielle puisqu'en l'absence d'EphA2, la fusion entre les membranes virales et cellulaires est réduite de plus de 90% et l'infection de 85%. A l'opposé, sa surexpression facilite la fusion et l'infection des cellules épithéliales (26).

Le processus de fusion, précédemment décrit pour les cellules B, peut alors s'initier grâce à l'interaction entre gH/gL et la forme pré-fusionnelle de gB et permettre l'entrée du virus dans la cellule épithéliale.

Un autre acteur cellulaire a été décrit comme ayant un rôle dans l'étape de fusion de l'EBV aux cellules épithéliales. La neuropiline-1 (NRP1) est une protéase cellulaire qui, lorsqu'elle est surexprimée, augmente significativement l'infection des cellules épithéliales par EBV et lorsqu'elle est inhibée, diminue de 50% l'infection (31). On peut noter que la NRP1 n'est que très faiblement exprimée par les cellules B par rapport aux cellules épithéliales.

2.3. Tropisme de l'infection à EBV

La gp42 n'intervient pas dans le mécanisme d'entrée de l'EBV dans les cellules épithéliales et détermine le tropisme cellulaire du virus (21). En effet, lorsque les virions néosynthétisés sortent de la cellule B, la gp42 reste séquestrée dans la cellule par son interaction avec les molécules du CMH de classe II. Ainsi, les virions matures qui sortent des cellules B sont, pour la plupart, déficients en gp42 et ne peuvent pas réinfecter une autre cellule B (24). À l'inverse, l'absence de gp42 à la surface de ces virions favorise l'infection des cellules épithéliales. Lorsque les virions néosynthétisés sortent des cellules épithéliales (qui sont dépourvues de CMH de classe II), la gp42 n'est pas séquestrée et les virions matures sont enrichis en gp42 ce qui facilite leur entrée dans les cellules B, et ainsi de suite (32).

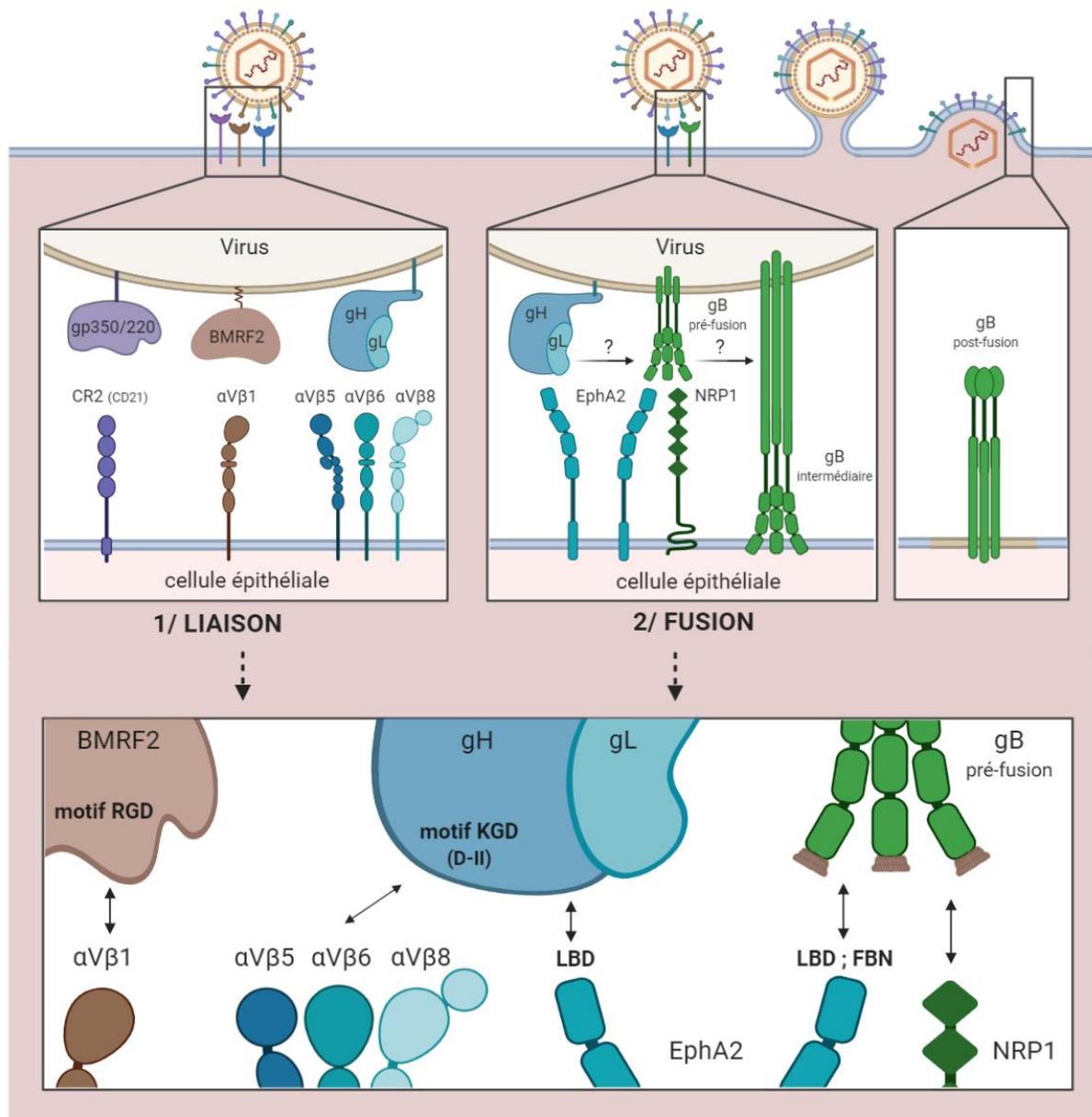


Figure 2 : Entrée de l'EBV par fusion directe dans les cellules épithéliales.

1/ Liaison du virus à la cellule épithéliale faisant intervenir les glycoprotéines virales gp350/220, BMRF2 et gH/gL et le récepteur cellulaire CR2 (cas des cellules épithéliales CR2+) et les intégrines cellulaires ($\alpha V\beta 1$, 5, 6 et 8). 2/ Fusion des membranes virale et cellulaire faisant intervenir les glycoprotéines virales gH/gL et gB et les protéines cellulaires EphA2 et NRP1.

2.4. *Autres glycoprotéines de surface de l'EBV*

En dehors des glycoprotéines dont nous venons de parler, qui participent activement à l'entrée du virus dans les cellules hôtes, il existe d'autres glycoprotéines qui sont probablement moins pertinentes à cibler pour un projet vaccinal et dont le rôle dans le cycle viral est à clarifier (33) (**Figure 3**).

Parmi elles, on peut citer la glycoprotéine N (gN) codée par le gène BLRF1 et la glycoprotéine M (gM), formée de plusieurs domaines transmembranaires et codée par le gène BBRF3. Ces glycoprotéines fortement conservées au sein des *Herpesviridae*, forment le complexe gN/gM (34). L'absence d'expression du complexe gN/gM diminue la liaison du virus aux cellules cibles, bloque la dissociation entre la capsid virale et les membranes cellulaires (empêchant sa migration vers le noyau) et diminue la libération des nouveaux virions (34).

La glycoprotéine 150 (gp150) codée par le gène BDLF3, est capable de se lier aux héparanes sulfates présents à la surface des cellules épithéliales, sans que cette liaison ne provoque l'infection des cellules cibles (35).

Enfin, la glycoprotéine 78/55 (gp78/55) codée par le gène BILF2, ne semble pas avoir de rôle dans l'entrée du virus (36).

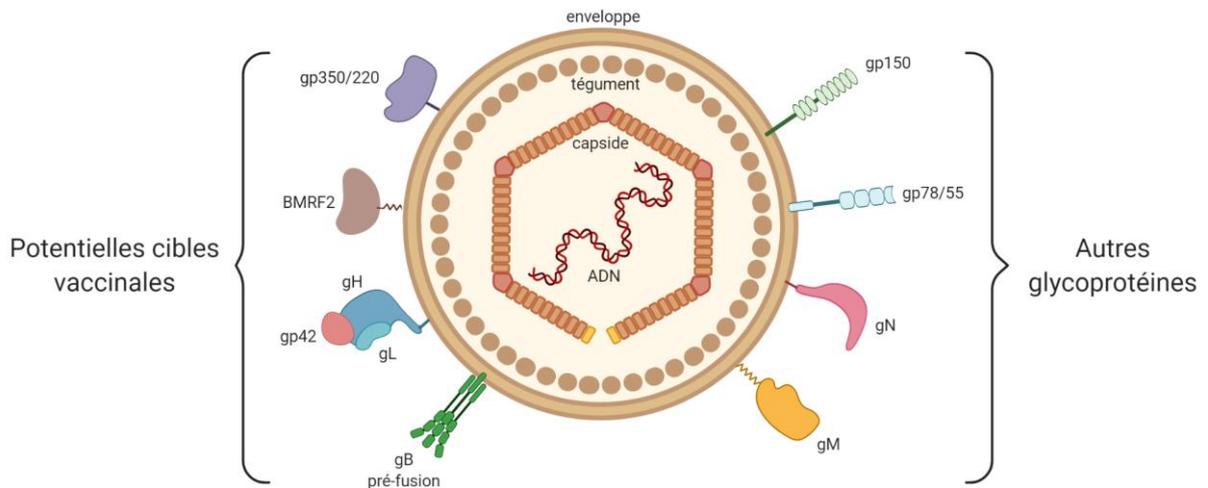


Figure 3 : Structure générale de l'EBV.

De l'intérieur vers l'extérieur sont représentés : l'ADN double-brin de l'EBV, la capsidie icosaédrique, le tégument et l'enveloppe. À gauche, sont représentées les glycoprotéines d'enveloppe virales qui jouent un rôle clé dans les processus d'entrée du virus dans les cellules hôtes (gp350/220, BMRF2, gH/gL, gp42 et gB). À droite, sont représentées les glycoprotéines virales peu ou pas impliquées dans l'entrée (gp150, gp78/55, gN et gM).

2.5. Principaux vaccins prophylactiques anti-gp350/220

Les premières et principales approches de vaccins prophylactiques ont naturellement ciblé la gp350/220 puisqu'elle est la glycoprotéine la plus abondante à la surface de l'EBV et des cellules infectées et qu'elle est la cible principale des anticorps neutralisants anti-EBV (37). Ces différentes approches vaccinales sont résumées dans la **Figure 4**.

Le premier essai clinique vaccinal anti-EBV a été développé en 1995 par une équipe chinoise qui a utilisé comme vecteur, un virus de la vaccine vivant (VV) exprimant la gp350/220. Ce vaccin a été administré en dose unique i) à des adultes séropositifs pour l'EBV et pour le VV, ii) à des adolescents séropositifs pour l'EBV

mais séronégatifs pour le VV et iii) à des enfants séronégatifs pour ces deux virus. Les résultats ont été analysés 16 mois après l'administration du vaccin. Chez les adultes, le VV n'a pas pu se multiplier du fait de leur immunité anti-VV et le vaccin a été sans effet. Au contraire, les adolescents vaccinés ont vu leur titre d'anticorps neutralisants anti-EBV augmenter et parmi les neuf enfants séronégatifs vaccinés, seuls trois ont été infectés par l'EBV alors que les dix enfants non vaccinés ont tous été infectés (38). Cette première étude clinique n'a pas été poursuivie du fait des normes de biosécurité imposées en vaccinologie.

Ce n'est qu'en 2007 que l'équipe de Moutschen *et al.* a publié les résultats de deux nouveaux essais cliniques réalisés chez 148 adultes sains (l'un de phase I et l'autre de phase I/II). Ces études ont montré la sécurité et l'immunogénicité d'un monomère recombinant de gp350 soluble, associé ou non à un adjuvant. Ce candidat vaccinal a été obtenu à partir de cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) exprimant le gène de la gp350/220 muté au niveau du site d'épissage, empêchant ainsi la formation de l'isoforme gp220. Les préparations associées à un adjuvant (hydroxyde d'aluminium seul ou combiné avec du monophosphoryl lipide A) induisaient des titres d'anticorps anti-gp350 significativement plus élevés que les préparations sans adjuvant et les trois formulations testées de ce candidat vaccinal ont bien été tolérées (39).

Pour confirmer la sécurité et l'immunogénicité de ce vaccin anti-EBV et évaluer son efficacité, Sokal *et al.* ont mené un essai clinique de phase II, randomisé, en double aveugle. Le monomère recombinant de gp350 soluble associé à l'hydroxyde d'aluminium/monophosphoryl lipide A a été distribué, en trois doses, chez 181 jeunes adultes séronégatifs pour l'EBV et comparé à un placebo constitué d'hydroxyde d'aluminium seul. Une réponse anticorps anti-gp350 neutralisante

durable a été observée sur une période supérieure à 18 mois, chez 98,7% des patients vaccinés. Cette réponse humorale n'a pas suffi à prévenir l'infection à EBV mais a permis de réduire significativement l'incidence de la MNI de 78%, dans le groupe vacciné. En effet le nombre de MNI était 4,8 fois plus élevé dans le groupe placebo que dans le groupe vacciné (40). Ainsi, les anticorps neutralisants anti-gp350 semblent atténuer la gravité de la maladie associée à l'infection par EBV sans prévenir l'infection elle-même (16).

Deux ans plus tard, une autre étude de phase I a évalué l'effet du monomère recombinant de gp350 associé à l'hydroxyde d'aluminium, dans la prévention des syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation (SLPT) chez 16 enfants séronégatifs pour EBV, atteints d'une maladie rénale chronique en attente de transplantation. L'objectif de ce vaccin était de stimuler l'immunité humorale anti-EBV avant la transplantation, afin de diminuer l'apparition ou la sévérité des SLPT. Les deux doses testées de ce vaccin (12,5 µg et 25 µg) ont bien été tolérées et ont induit des titres similaires d'anticorps anti-gp350 chez l'ensemble des patients vaccinés, mais seuls quatre patients ont développé des anticorps neutralisants anti-gp350. Cependant, les réponses immunitaires anti-gp350 (neutralisantes ou non) ont rapidement chuté quelques semaines après la dernière injection et les charges virales EBV sanguines mesurées par PCR (réaction de polymérisation en chaîne), 26 semaines après la transplantation, étaient similaires entre les enfants vaccinés et non-vaccinés. Ceci a rendu peu probable un effet préventif du vaccin sur l'apparition de SLPT (41).

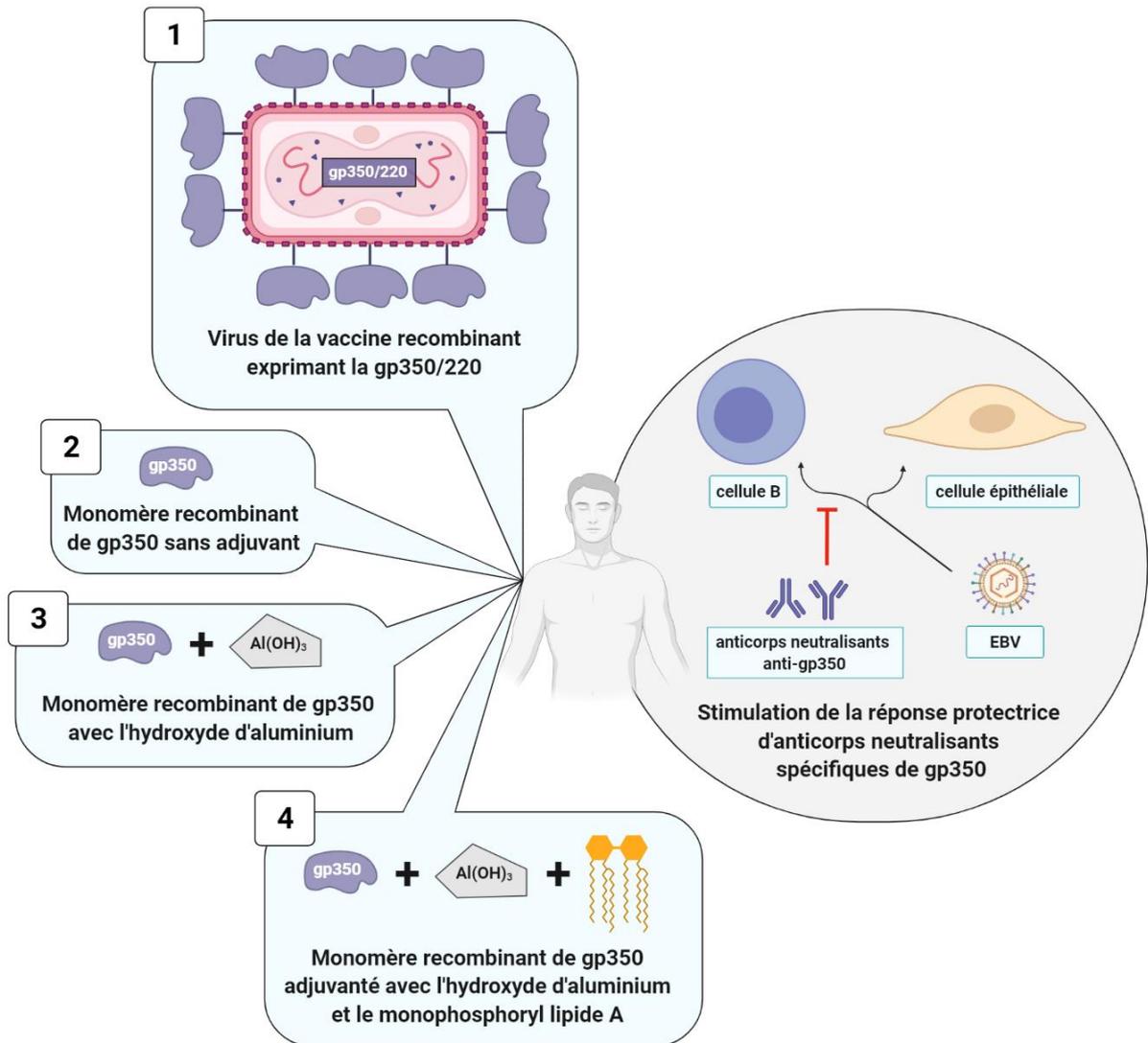


Figure 4 : Stratégies vaccinales prophylactiques utilisant l'antigène gp350/220.

Les quatre stratégies induisent une réponse immunitaire humorale neutralisante anti-gp350. Les stratégies avec adjuvant (3 et 4), induisent des titres d'anticorps anti-gp350 plus élevés que la stratégie sans adjuvant (2). La stratégie avec du monophosphoryl lipide A (4) induit une réponse humorale anti-gp350 neutralisante plus intense et durable que la stratégie sans monophosphoryl lipide A (3). Les données recueillies pour la stratégie 1 ne sont pas suffisantes pour la comparer aux autres stratégies.

1 (38); 2 (39); 3 (39) (41); 4 (39) (40).

3. Latence virale, réplication virale, et vaccins thérapeutiques

La seconde stratégie vaccinale anti-EBV consiste à stimuler l'immunité cellulaire T anti-EBV et/ou rétablir le contrôle immunitaire des patients atteints de cancers liés à l'EBV. Ces vaccins dits thérapeutiques, utilisent principalement les protéines de latence impliquées dans la transformation et l'immortalisation des cellules infectées et donc dans le développement de cancers. Certaines protéines du cycle lytique sont également apparues comme importantes pour l'établissement de la persistance virale. Les vaccins thérapeutiques pourraient représenter une alternative à l'utilisation de radiothérapies et chimiothérapies, habituellement utilisées pour traiter les cancers associés à l'EBV mais responsables d'effets indésirables importants.

Le développement de ces vaccins thérapeutiques implique de connaître les étapes et les protéines impliquées dans le cycle de latence et dans le cycle réplicatif de l'EBV chez les sujets infectés.

3.1. Cycle de latence de l'EBV

Après la primo-infection, l'EBV persiste sous forme latente épisomale dans les lymphocytes B mémoires infectés. Il existe alors un équilibre entre la latence, la réplication du virus dans l'organisme et l'élimination des cellules infectées par les défenses immunitaires. La latence est caractérisée par l'expression des gènes viraux de latence : six codent pour des protéines nucléaires EBNA (Epstein-Barr nuclear antigen), trois pour des protéines membranaires LMP (Latent membrane protein), et deux pour des ARNs non codants EBER (Epstein-Barr encoded small RNA). Un grand nombre de micro-ARN viraux (miARN) sont également exprimés

(44 issus du gène BART et trois issus du gène BHRF1) (42) (**Figure 5**). Ce sont ces protéines de latence et les ARN non codants du virus l'EBV qui sont à l'origine de la capacité de l'EBV à immortaliser et à faire proliférer indéfiniment des cellules B. Il existe différents profils d'expression de ces gènes de latence qui permettent au génome de persister dans ces lymphocytes B lors de la division cellulaire. Ces différents profils s'expriment au cours des différentes phases naturelles d'établissement de la latence mais également dans les différentes pathologies cancéreuses associées à l'EBV. Dans les trois types de latence, l'expression de l'EBNA1 permet le maintien du génome viral sous forme d'épisome et sa réplication par l'ADN polymérase cellulaire. Pendant cette phase de latence, le virus se réplique de façon synchrone avec les cellules B mémoires infectées qui deviennent alors, le site principal de persistance de l'EBV (43).

La latence de type III correspond à l'expression, dans les cellules B naïves, de l'ensemble des gènes de latence. Ce type de latence est principalement retrouvé dans les lymphomes non-Hodgkiniens tels que les SLPT ou certains lymphomes B diffus à grandes cellules associés à EBV. Ce type de lymphome se rencontre, la plupart du temps, chez les individus immunodéprimés où la diminution de l'immunosurveillance entraîne une prolifération incontrôlée des cellules B ce qui favorise l'apparition d'altérations génétiques et le développement d'un cancer (3).

La latence de type II correspond à l'expression, dans les centres germinatifs, d'EBNA1, de LMP1 et 2 et des ARN non codants EBER et miARN et se retrouve dans les lymphomes de Hodgkin associés à EBV et les carcinomes nasopharyngés (CNP).

La latence de type I/0 est présente dans les cellules B mémoires où seuls l'EBNA1 et les ARN non codants EBER et miARN sont exprimés et se retrouve dans les lymphomes de Burkitt et les carcinomes gastriques associés à EBV.

Dans les lymphomes de Hodgkin, de Burkitt et les CNP, l'expression de l'EBV est donc limitée à quelques gènes de latence et la diminution de l'immunité a une importance limitée. En revanche le rôle des mutations des gènes cellulaires y est plus important (**Figure 5**).

Par conséquent, la protéine EBNA1 (exprimée dans toutes les tumeurs malignes associées à EBV), les protéines de signalisation membranaire LMP1 (oncogène impliqué dans la transformation et la survie cellulaires) et LMP2 (régulateur de la réactivation virale à partir de la latence) ainsi que les ARN non codants (impliqués dans l'échappement immunitaire plutôt que dans la transformation cellulaire), représentent autant de cibles prometteuses pouvant rentrer dans la composition d'un vaccin thérapeutique anti-EBV (7) (44).

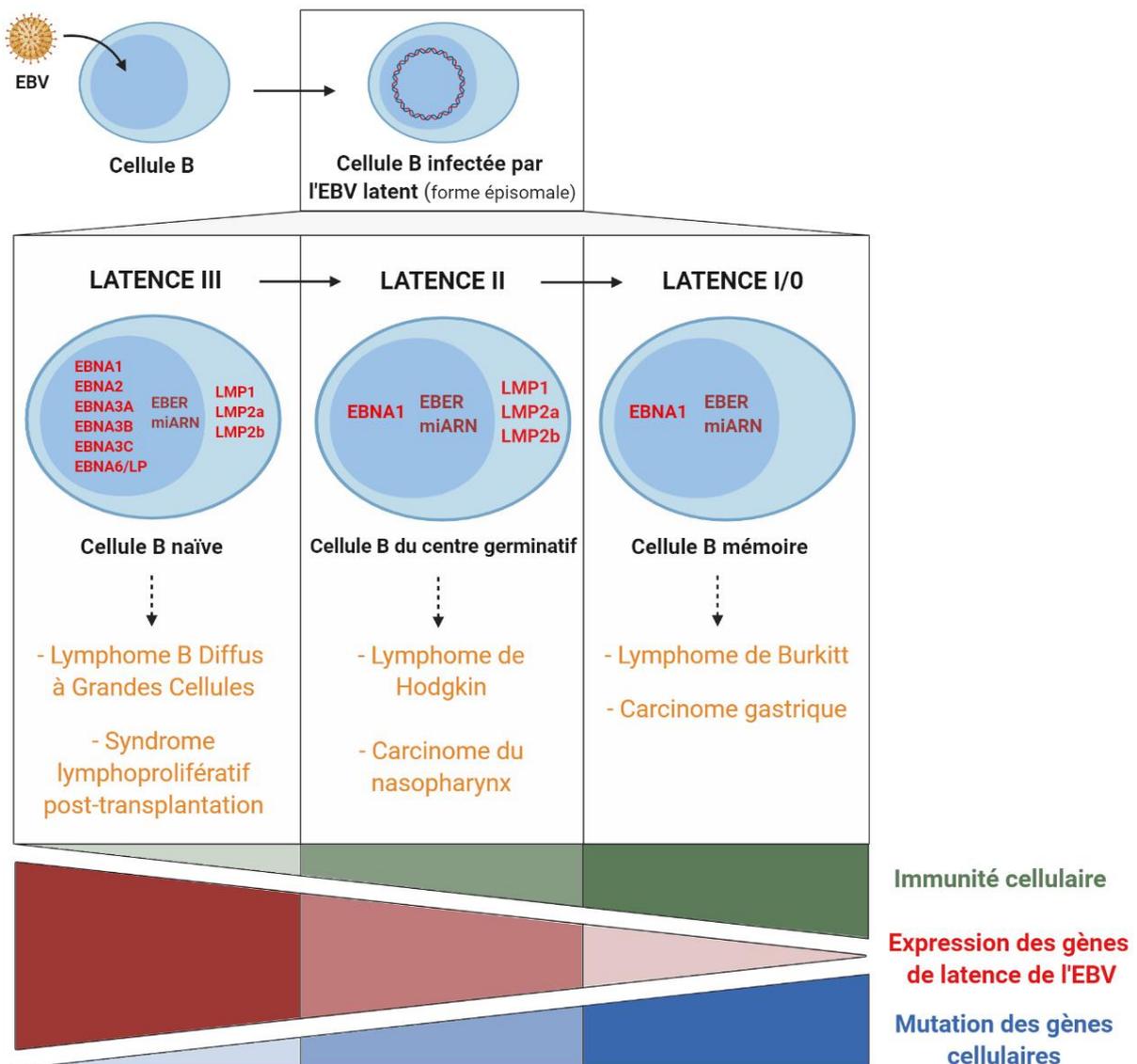


Figure 5 : Profils d'expression des gènes de latence de l'EBV et implication de l'immunité cellulaire, de l'expression des gènes de latence et de la mutation des gènes cellulaires dans les cancers associés à l'EBV.

Les cancers associés à la latence de type III de l'EBV, sont principalement retrouvés chez le patient immunodéprimé. À l'inverse, les cancers associés à la latence de type I de l'EBV, sont principalement retrouvés chez le patient immunocompétent et liés à un fort taux de mutation des gènes cellulaires de l'hôte infecté (45) (46).

3.2. Cycle lytique de l'EBV

Si l'étude des cancers liés à l'EBV a longtemps été exclusivement associée à l'étude des protéines de latence, le rôle du cycle lytique semble avoir été sous-estimé.

Le cycle lytique (aussi appelé cycle répliatif ou de multiplication) de l'EBV, est divisé en trois phases séquentielles (très précoce, précoce et tardive) durant lesquelles plus de 80 protéines sont exprimées.

Les premiers gènes à être transcrits durant la phase très précoce sont les gènes BZLF1 et BRLF1, codant respectivement pour les facteurs de transcription ZEBRA (ou Zta ou Z) et Rta (ou R). Les protéines ZEBRA et Rta activent ensuite les promoteurs des gènes précoces qui codent soit pour le complexe de réplication (comprenant notamment l'ADN polymérase virale, son facteur de processivité, la thymidine kinase et le complexe hélicase-primase) soit pour les protéines impliquées dans l'expression des gènes tardifs. Enfin, sont exprimés les gènes tardifs codant pour les protéines de structure comme les antigènes de capsid virale (VCA), la protéase virale nécessaire à la maturation de la capsid et les glycoprotéines d'enveloppe, le tout permettant la fabrication de nouvelles particules virales (47) (**Figure 6**).

Les protéines très précoces ZEBRA et Rta sont plus souvent la cible des cellules TCD8+ alors que les protéines précoces et tardives sont plus souvent la cible des cellules TCD4+ (48). Ainsi, les glycoprotéines de surface de l'EBV (protéines tardives) ne sont pas simplement la cible de l'immunité humorale avec les anticorps neutralisants mais sont aussi ciblées par l'immunité cellulaire TCD4+ capable de reconnaître les cellules B récemment infectées par l'EBV (8).

De nombreux arguments sont aujourd'hui en faveur d'un rôle du cycle lytique dans l'initiation et l'extension des phénomènes cancéreux liés à l'EBV.

Parmi ces arguments, on peut citer le succès partiel de l'immunothérapie anti-EBV ciblant des antigènes du cycle lytique dans les cancers associés à l'EBV (49). Aussi, il a été montré que des modèles de souris humanisées développaient moins de lymphomes B lorsqu'elles étaient infectées avec un mutant EBV délété du gène lytique BZLF1 qu'avec un EBV non muté (50).

Par conséquent, les protéines du cycle lytique et plus précisément les protéines très précoces, peuvent être intéressantes à associer aux protéines de latence dans la conception d'un vaccin thérapeutique. Un vaccin composé des principales protéines lytiques, pourrait stimuler l'immunité cellulaire TCD4+ et TCD8+ spécifique de ces antigènes et détruire les cellules infectées limitant ainsi la formation de nouveaux virions, l'infection et la transformation de nouvelles cellules.

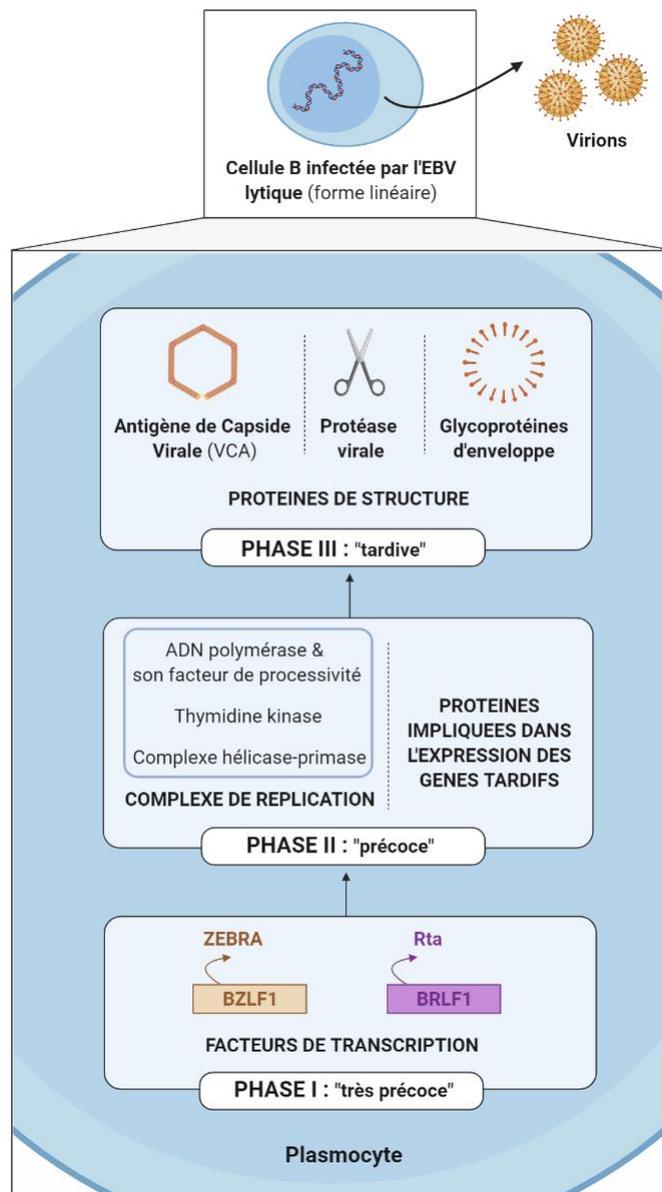


Figure 6 : Expression séquentielle des gènes impliqués dans le cycle lytique d'EBV.

3.3. Principaux vaccins thérapeutiques anti-EBV testés chez l'homme

La plupart des vaccins thérapeutiques anti-EBV ont été développés pour le traitement du carcinome nasopharyngé (CNP) qui représente la troisième cause la plus fréquente de cancers dans le sud de la Chine (51). Le CNP est une tumeur épithéliale étroitement associée à l'EBV (100% des cas) dans laquelle les cellules

tumorales expriment un profil de latence de type II. Les protéines EBNA1 et LMP2 contribuent fortement à la transformation des cellules normales en cellules cancéreuses. La protéine EBNA1 comprend des épitopes majoritairement ciblés par les cellules TCD4+ mais aussi plus modestement par les cellules TCD8+. À l'inverse, la protéine LMP2 contient des épitopes majoritairement ciblés par les cellules TCD8+ et peu d'épitopes des cellules TCD4+ (7).

Par conséquent, EBNA1 et LMP2 sont les deux principaux antigènes ciblés dans les vaccins thérapeutiques.

Il existe trois approches de vaccins thérapeutiques résumées dans la **Figure 7**. La première est basée sur les cellules dendritiques (CD), une autre, sur l'utilisation de vecteurs viraux. La troisième approche est mixte. La stratégie basée sur les CD est à l'interface de la vaccination et de l'immunothérapie. Elle a été testée lors d'une étude clinique de phase I réalisée chez 16 patients atteints d'un stade avancé de CNP. Les CD autologues sont d'abord prélevées puis mises au contact de différents épitopes de la protéine LMP2 (A1101, A2402 ou B40011) *ex vivo* et enfin réinjectées au niveau des ganglions lymphatiques inguinaux des patients. Les CD sont des cellules présentatrices d'antigènes qui jouent un rôle central dans l'induction de la réponse immunitaire cellulaire T. Des réponses immunitaires cellulaires TCD8+ dirigées contre les épitopes de LMP2 ont été observées chez neuf patients vaccinés et une réduction partielle de la tumeur a même été observée chez deux d'entre eux. Cependant, six mois après la première injection, les cellules TCD8+ spécifiques de LMP2 retrouvaient leur niveau d'avant vaccination (52).

La seconde technologie vaccinale utilise un virus appelé vecteur viral [adénovirus ou virus de la vaccine Ankara modifié (MVA)]. Le génome de ces vecteurs viraux est modifié en y insérant la séquence d'ADN d'un ou plusieurs antigènes de l'EBV. Une étude clinique de phase I réalisée chez 24 patients atteints d'un CNP à un stade avancé, a démontré la sécurité et l'immunogénicité d'un adénovirus de type 5 (Ad5) recombinant (l'un des moins pathogènes pour l'homme) exprimant la protéine LMP2 (53). De manière étonnante, ce vaccin n'augmentait pas significativement le taux de lymphocytes TCD8+ mais uniquement le taux de lymphocytes TCD4+ et seulement chez les patients vaccinés avec la plus forte dose de vaccin testée (54).

Dans les approches à vecteur viral, deux équipes ont réussi à améliorer la réponse immunitaire TCD8+ (52) en associant des épitopes de l'antigène EBNA1, aux épitopes de LMP2 et en utilisant comme vecteur viral, le virus MVA atténué et recombinant. En effet, les cellules TCD4+ jouent un rôle crucial dans le maintien d'une réponse cellulaire TCD8+ mémoire, efficace dans le temps (55). Ce virus modifié appelé MVA-EL, codait pour une protéine de fusion contenant la partie C-terminale de la protéine EBNA1 et de la totalité de LMP2.

Un premier essai clinique de phase I a été réalisé à Hong Kong en 2013 avec 18 patients atteints d'un CNP en rémission depuis plus de 12 semaines afin d'évaluer la sécurité et l'immunogénicité du vaccin MVA-EL (56). Le même essai clinique a été mené au Royaume-Uni en 2014 chez 14 patients (57). Pour 15 des 18 patients de Hong Kong et pour 8 des 14 patients au Royaume-Uni ayant reçu trois injections intradermiques du vaccin MVA-EL à trois semaines d'intervalle, la réponse immunitaire cellulaire T, dirigée contre au moins un des deux antigènes vaccinaux (EBNA1 ou LMP2), était augmentée.

Ces deux études menées en parallèle ont donc montré que le candidat vaccin MVA-EL était bien toléré et augmentait les réponses immunitaires spécifiques TCD8+ et TCD4+.

La troisième stratégie est mixte. Elle met en jeu les CD mais les antigènes tumoraux sont intégrés au sein d'un vecteur adénoviral.

Une étude clinique de phase II, réalisée chez 16 patients atteints d'un CNP à un stade avancé, a évalué la sécurité et l'effet antitumoral de CD transduites avec un Ad5 recombinant, codant pour une protéine LMP1 tronquée et une protéine LMP2 non tronquée. Si ce vaccin a bien été toléré, son efficacité s'est révélée limitée car il n'a pas été observé d'augmentation significative du taux de cellules T spécifiques de LMP1 ni de LMP2 *in vivo* et seuls trois des 16 patients vaccinés ont montré des bénéfices cliniques partiels (58).

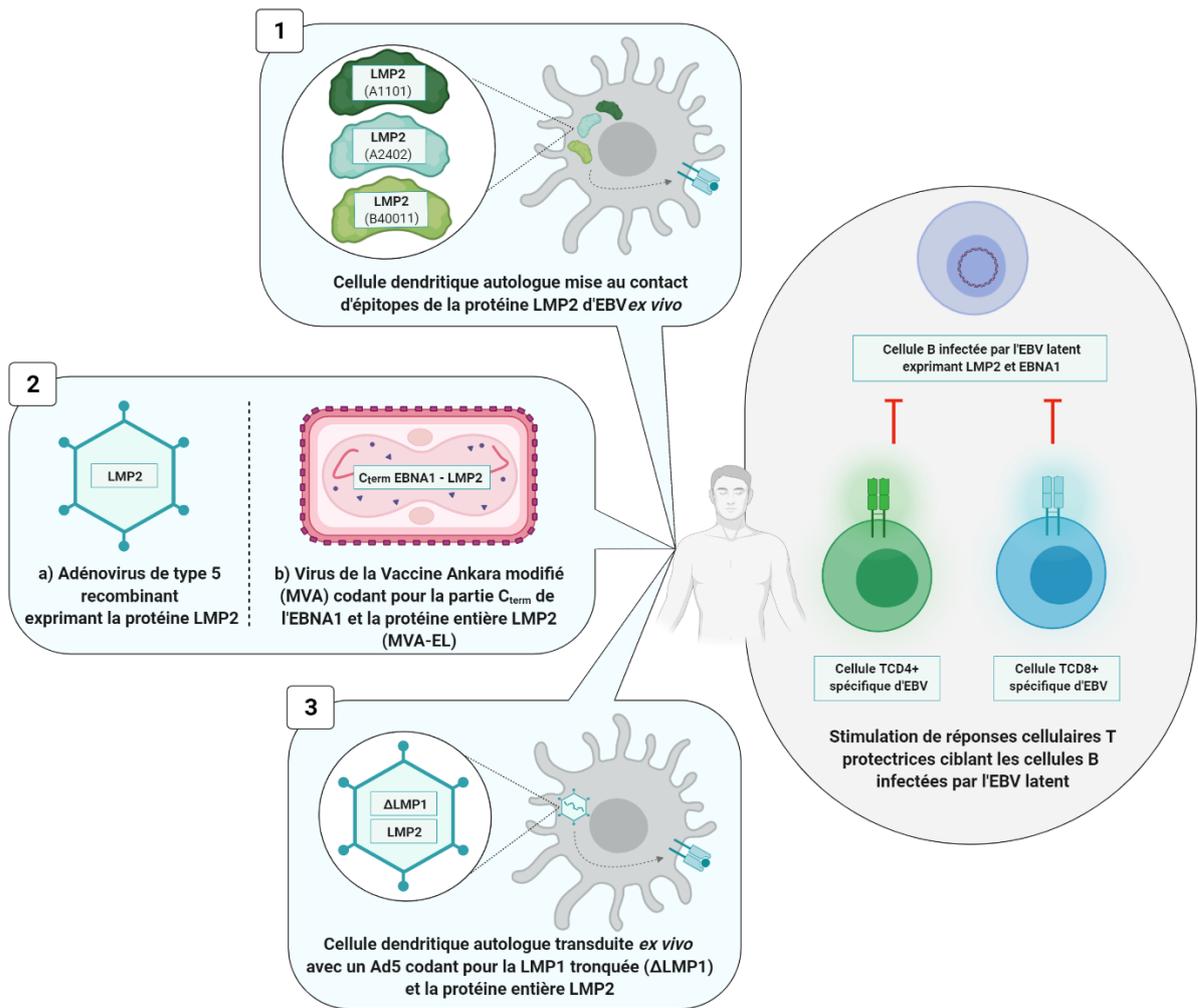


Figure 7 : Stratégies vaccinales thérapeutiques.

Les trois types de stratégies induisent une réponse immunitaire cellulaire TCD8+ et/ou TCD4+. Les stratégies basées sur les vecteurs viraux (2a et 2b), induisent une immunité cellulaire plus intense et surtout plus durable que la stratégie basée sur les cellules dendritiques (1) et que la stratégie mixte (3).

1 (52); **2a**) (53); **2b**) (56) (57); **3** (58).

4. Optimisation des stratégies vaccinales anti-EBV

Les premières études menées sur les vaccins anti-EBV sont encourageantes mais des améliorations concernant l'immunogénicité ou le choix des épitopes vaccinaux semblent nécessaires pour envisager un vaccin plus efficace. De nouvelles formulations vaccinales ont donc été développées.

Concernant les vaccins prophylactiques, la gp350/220 a été la première cible vaccinale identifiée et reste la plus étudiée mais de récents travaux ont montré que les glycoprotéines gH/gL, gp42 et gB étaient aussi la cible d'anticorps neutralisants (59). De plus, des approches mixtes combinant à la fois des protéines du cycle lytique de l'EBV et du cycle de latence virale, tendent à se développer (**Figure 8**).

Concernant les vaccins thérapeutiques, la vaccination homologue avec le même vecteur viral pour la première injection et les injections de boost, laisse place à des stratégies plus efficaces de vaccination hétérologue avec deux constructions vaccinales différentes (**Figure 9**).

4.1. *Optimisation des vaccins prophylactiques*

4.1.1. Stratégies anti-gp350/220

L'amélioration des vaccins de type monomères solubles de gp350 a d'abord consisté à développer des tétramères de gp350/220 qui ont permis d'induire chez la souris BALB/c des taux plus élevés d'anticorps neutralisants anti-gp350/220 (60). Une autre approche a consisté à développer des nanoparticules auto-assemblées de ferritine exprimant un épitope du site de liaison de la gp350/220 au CR2 cellulaire. Cette approche a permis de multiplier par 10 (chez le macaque) et par plus de 100 (chez la souris BALB/c), les titres d'anticorps anti-gp350/220 (61).

Une autre stratégie a permis d'augmenter de 10 à 100 fois, les titres en anticorps anti-gp350/220 neutralisants chez la souris BALB/c en fusionnant l'ectodomaine de la gp350/220 au fragment Fc de l'IgG2a de souris (62).

Enfin, une équipe a développé des particules virales dépourvues d'ADN viral appelées VLPs (virus-like particles) issues de la nucléocapside HBc149 du virus de l'hépatite B (VLP-HBc149-gp350/220) et qui présentaient une combinaison de trois épitopes dérivés du site de liaison de la gp350/220 au CR2 cellulaire. Ces VLPs ont induit chez les souris BALB/c immunisées, des taux élevés d'anticorps neutralisants (63).

Enfin, Kang *et al.* ont démontré l'immunogénicité des 425 premiers résidus de l'ectodomaine de gp350/220 exprimés sur deux nanoparticules auto-assemblées différentes qui imitent la forme et la taille de l'EBV : lumazine synthase (LS) et I3-01. Les nanoparticules gp350/220₁₋₄₂₅-LS et gp350/220₁₋₄₂₅-I3-01 associées à de l'hydroxyde d'aluminium ou du MF59 comme adjuvant, ont provoqué chez les souris des titres d'anticorps neutralisants respectivement 133 et 65 fois plus élevés que ceux induits par le monomère gp350 correspondant (64).

Ces nouvelles stratégies n'ont jamais été comparées entre-elles mais apparaissent toutes plus immunogènes que les monomères solubles de gp350 et semblent donc être des approches prometteuses pour augmenter l'immunogénicité des vaccins anti-gp350/220.

L'amélioration des vaccins anti-gp350/220 ne passe pas simplement par des modifications structurales de la gp350/220 mais aussi par l'utilisation de nouveaux adjuvants capables d'optimiser la réaction immunitaire anti-gp350/220. C'est le cas du glucopyranosyl lipide A intégré dans une émulsion stable (GLA/SE), qui

augmente significativement et durablement les taux d'anticorps neutralisants et la réponse cellulaire T anti-gp350/220, chez les souris et lapins vaccinés (65).

4.1.2. Stratégies basées sur les autres glycoprotéines d'intérêt de l'EBV

Les glycoprotéines gH/gL et gB, comme la gp350/220, jouent un rôle essentiel dans l'entrée du virus dans les cellules B mais également dans les cellules épithéliales (contrairement à la gp350/220) (66).

Une étude réalisée chez des lapins immunisés avec les formes monomériques ou trimériques des protéines gH/gL, trimérique de gB et monomérique ou tétramérique de gp350/220, a montré que l'animal produisait des titres plus élevés d'anticorps neutralisants contre les glycoprotéines gH/gL et gB que contre la gp350/220. De plus, les formes multimérisées étaient plus immunogènes que leurs homologues monomères et la glycoprotéine gH/gL était la plus immunogène quelle que soit sa forme (67).

Cinq ans plus tard, la même équipe a montré que l'immunisation de lapins avec la combinaison de gH/gL (forme monomérique) et de gB (forme native trimérique) provoquait des titres d'anticorps neutralisants plus élevés (à la fois pour les cellules B et les cellules épithéliales) que ceux induits par la gH/gL ou la gB seule. De plus, ils ont démontré que les sérums de lapins immunisés avec cette combinaison de gH/gL et de gB diminuaient la charge d'EBV dans le sang périphérique de souris humanisées et protégeaient ces souris de la mort causée par une dose létale d'EBV (68).

Une autre équipe a comparé les réponses humorales développées par des macaques contre des nanoparticules de ferritine exprimant les glycoprotéines gH/gL seules ou combinées avec gp42, aux nanoparticules exprimant la gp350/220.

Le complexe vaccinal gH/gL/gp42-ferritine conférait un titre en anticorps neutralisants très supérieur au complexe gp350-ferritine. Ils ont aussi observé que l'ajout de gp42 aux nanoparticules de gH/gL augmentait de quatre à huit fois les titres d'anticorps qui neutralisent l'infection des cellules B, sans que cela ait un impact significatif pour les cellules épithéliales. Enfin, l'association des nanoparticules gp350-ferritine aux nanoparticules gH/gL/gp42-ferritine, permettait d'obtenir de meilleurs taux de neutralisation qu'avec les gH/gL/gp42-ferritine seules (69).

Pour finir, un travail récent a évalué chez le lapin, l'injection de VLP-NDV (issues du virus de la maladie de Newcastle) exprimant les cinq glycoprotéines virales essentielles à l'entrée de l'EBV dans les cellules cibles (gp350/220, gp42, gH, gL et gB) associées à des adjuvants (hydroxyde d'aluminium combiné avec du monophosphoryl lipide A). Ce vaccin pentavalent a stimulé la production d'anticorps spécifiques des cinq glycoprotéines capables de neutraliser l'infection par EBV à la fois des cellules B et des cellules épithéliales. Les taux d'IgG anti-gp350/220 et anti-gB étaient nettement supérieurs aux taux d'IgG anti-gp42 et anti-gH/gL (70).

4.1.3. Stratégie basée sur le gène de latence EBNA3A

Une approche originale de vaccin prophylactique anti-EBV a eu pour objectif de prévenir le développement d'une MNI par l'intermédiaire d'une réponse de l'immunité cellulaire TCD8+ dirigée contre l'EBNA3A, capable de contrôler l'expansion des cellules B infectées par EBV. En raison du pouvoir transformant de l'EBNA3A, un épitope de cet antigène viral a été utilisé (FLRGRAYGL) plutôt que la protéine entière et a été associé à l'anatoxine tétanique comme adjuvant, dans une émulsion eau-huile. La sécurité et l'immunogénicité de cet épitope vaccinal ont

été montrées lors d'un essai clinique de phase I regroupant 14 adultes volontaires sains et séronégatifs pour EBV. Le suivi des patients, réalisé jusqu'à 12 ans après la vaccination, montre que quatre individus sur les huit ayant reçu une faible dose de vaccin (5 µg) ont été infectés par l'EBV sans développer de MNI. Sur les deux individus vaccinés avec une forte dose d'épitope vaccinal (50 µg), un seul a été infecté par EBV et a développé des symptômes minimes de MNI. Enfin deux individus sur les quatre ayant reçu un placebo ont été infectés par EBV et l'un d'eux a développé une MNI. Cependant, le faible effectif des populations étudiées ne permet pas d'affirmer le succès de ce candidat vaccinal dans la prévention de la MNI (71).

4.1.4. Stratégies basées sur l'association des gènes de latence et du cycle lytique à la surface de VLPs

Perez *et al.* ont étudié chez la souris BALB/c, des combinaisons vaccinales gH/gL-EBNA1 et gB-LMP2, exprimées par des VLP-NDV et les ont comparées aux VLP-NDV-gp350/220. Les souris immunisées avec les VLP-NDV-gH/gL-EBNA1 ou VLP-NDV-gB-LMP2, ont développé une réponse cellulaire T spécifique d'EBNA1 et de LMP2. Les titres d'anticorps neutralisants de ces souris étaient aussi plus élevés que ceux des souris immunisées avec les VLP-NDV-gp350/220 (72).

Une autre stratégie encore plus audacieuse a consisté à utiliser des VLPs issues directement de particules d'EBV non infectieuses et non oncogènes car dépourvues d'ADN viral, dans lesquelles ont été introduites les protéines de latence EBNA1 et EBNA3C fusionnées à la protéine BNRF1 (principale protéine du tégument de l'EBV) (73). L'injection de ces VLP-EBV modifiés, à des souris humanisées, a permis le développement d'une réponse de l'immunité cellulaire TCD4+ à la fois

spécifique de protéines de structure (BNRF1) et de protéines de latence (EBNA1 et EBNA3C) (74) (75).

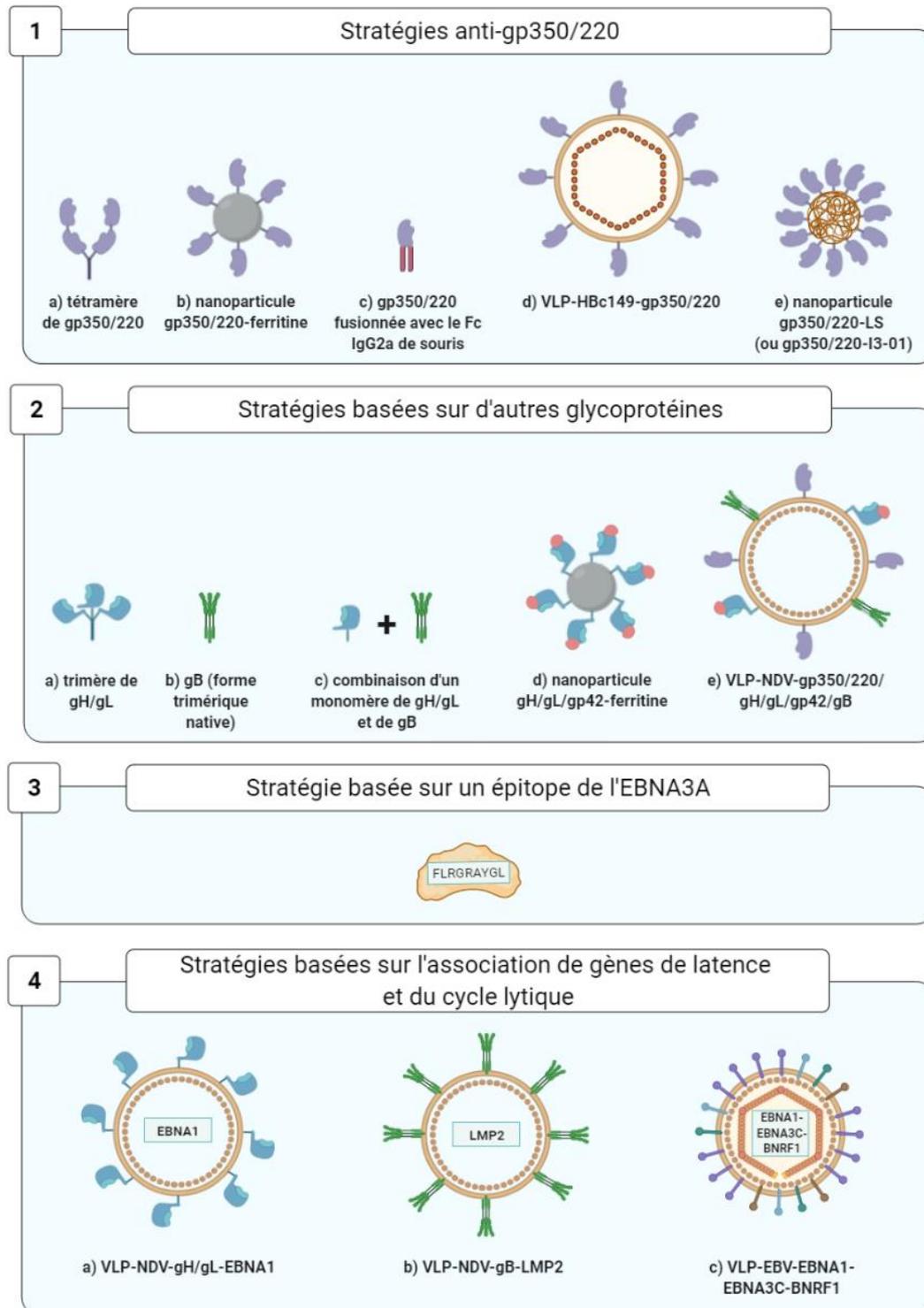


Figure 8 : Optimisation des stratégies vaccinales prophylactiques.

1a) (60); **1b)** (61); **1c)** (62); **1d)** (63); **1e)** (64); **2a) b)** (67); **2c)** (68); **2d)** (69); **2e)** (70); **3** (71); **4a) b)** (72); **4c)** (74).

4.2. Optimisation des vaccins thérapeutiques

Pour améliorer l'immunogénicité de la vaccination thérapeutique anti-EBV basée sur des vecteurs viraux, de nouvelles approches de vaccination hétérologue sont apparues (**Figure 9**). Elles consistent à utiliser lors de l'injection de boost, une construction différente de celle utilisée lors de la première injection. Cette approche limite l'apparition d'anticorps neutralisants anti-vecteur et améliore l'efficacité du vaccin. Les deux essais de l'équipe de Rühl *et al.* en sont un bon exemple.

Dans un premier essai, cette équipe a utilisé en première injection, un vecteur viral Ad5 recombinant exprimant un polyépitope EBNA1-LMP et en seconde injection, un vecteur viral MVA atténué et recombinant exprimant la protéine EBNA1.

Dans un autre essai, cette équipe a utilisé en première injection, une construction protéique d'un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur DEC-205 des CD fixé à la protéine EBNA1. Cette construction facilite l'entrée et la présentation de la protéine EBNA1 par les CD. Cette première injection était suivie de l'injection d'un vecteur viral Ad5 exprimant le polyépitope EBNA1-LMP.

Ces deux approches ont permis le développement d'une réponse cellulaire de type TCD4+ et TCD8+ spécifique de la protéine EBNA1, protégeant efficacement la souris contre les lymphomes de type T et B qui expriment l'EBNA1, justifiant ainsi leur utilisation comme vaccins thérapeutiques anti-EBV dans des études cliniques futures (76).

Une autre stratégie de vaccination thérapeutique, basée sur la capacité de la protéine ZEBRA à initier la transition entre la phase de latence virale et la phase lytique, a été utilisée sur un modèle de souris hu-PBL-SCID capables de présenter des maladies lymphoprolifératives liées à l'EBV (77). Cette stratégie vaccinale a mis en jeu des CD humaines transduites avec un Ad5 recombinant codant pour la

protéine ZEBRA et a permis le développement de réponses cellulaires TCD8+ spécifiques de ZEBRA, capables de reconnaître et d'éliminer les cellules transformées par l'EBV et de retarder significativement la mort des souris atteintes de maladies lymphoprolifératives (78).

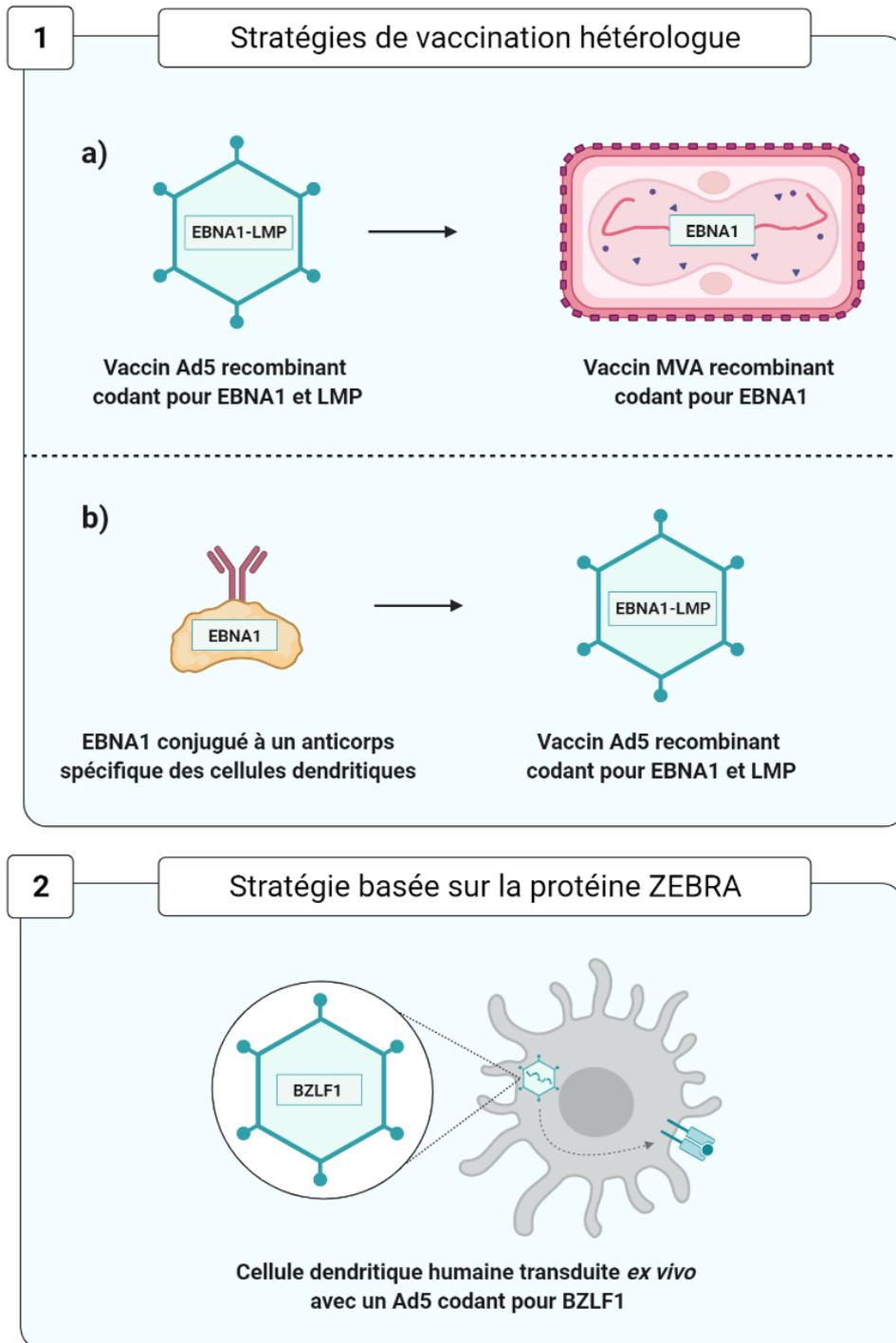


Figure 9 : Optimisation des stratégies vaccinales thérapeutiques.

1a) b) (76); 2 (78).

5. Discussion

Malgré tous les efforts déployés, il n'y a à ce jour, aucun vaccin anti-EBV commercialisé capable de prévenir l'infection, la MNI ou les cancers associés à ce virus. De plus, la vaccination anti-EBV reste confrontée à plusieurs obstacles de taille (79).

Concernant les vaccins prophylactiques, l'objectif d'une immunité stérilisante empêchant complètement l'infection par l'EBV semble difficile à atteindre chez l'homme. En effet, il a été montré qu'un individu pouvait héberger de multiples souches d'EBV probablement acquises par de multiples infections. Ceci montre que l'immunité anti-EBV n'empêche pas les réinfections (80). Le risque d'un vaccin empêchant transitoirement l'infection serait de retarder la primo-infection par l'EBV à un âge où la MNI est plus fréquente (81). Si l'objectif du vaccin anti-EBV est de limiter l'apparition des cancers liés à ce virus, la faible incidence de ces cancers et leur délai d'apparition très long complique considérablement le développement d'essais cliniques capables de prouver l'efficacité d'un tel vaccin.

Enfin un dernier obstacle important est l'absence de modèles animaux performants qui impacte non seulement le développement de vaccins prophylactiques mais également les recherches sur les vaccins thérapeutiques (82).

L'espoir d'un vaccin anti-EBV repose aujourd'hui sur la combinaison de plusieurs stratégies et sur l'utilisation de plusieurs protéines, de la latence et du cycle lytique, qui permettraient d'induire un large spectre d'anticorps neutralisants et une réponse cellulaire TCD8+ et TCD4+. L'objectif étant de bloquer l'ensemble des étapes essentielles du cycle viral, depuis l'entrée jusqu'à la persistance dans les cellules cibles et d'apporter une protection contre l'infection à EBV (effet prophylactique) et les maladies qui lui sont associées (effet thérapeutique).

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL

1. Introduction

Comme nous venons de le voir, plusieurs glycoprotéines d'enveloppe virales jouent un rôle primordial dans les mécanismes d'entrée de l'EBV dans ses cellules hôtes. Notre étude expérimentale s'est focalisée sur la glycoprotéine gB, protéine de fusion essentielle à l'entrée du virus à la fois dans les cellules B et dans les cellules épithéliales.

La glycoprotéine gB (ou gp110) est codée par le gène BALF-4 et comporte 857 acides-aminés. Elle est composée de trois grands domaines : l'ectodomaine en N-terminal, le domaine transmembranaire (TM) qui sert de point d'ancrage et le domaine de la queue cytoplasmique (CTD) en C-terminal (**Figure 10**).

L'ectodomaine est lui-même divisé en cinq domaines (D-I à D-V de N-terminal vers C-terminal). Ces derniers, contiennent tous des structures secondaires de type hélices *alpha* et feuillets *beta*, classant la gB dans une nouvelle classe de protéines de fusion : la classe III (83). Cet ectodomaine de 16 nm de longueur, comporte neuf sites potentiels de N-glycosylation et un site de clivage « R-X-K/R-R », reconnu par une protéase cellulaire nommée furine (84). Cette séquence (acides-aminés 428 à 431) est le site de liaison à la NRP1, qui sert de porte d'entrée de l'EBV dans les cellules épithéliales (**Figure 10**). Des expériences de délétion de ce motif de clivage par la furine, ont démontré son implication dans le repliement en trimère de la forme pré-fusionnelle de gB, conformation essentielle pour la fusion du virus aux cellules hôtes (26).

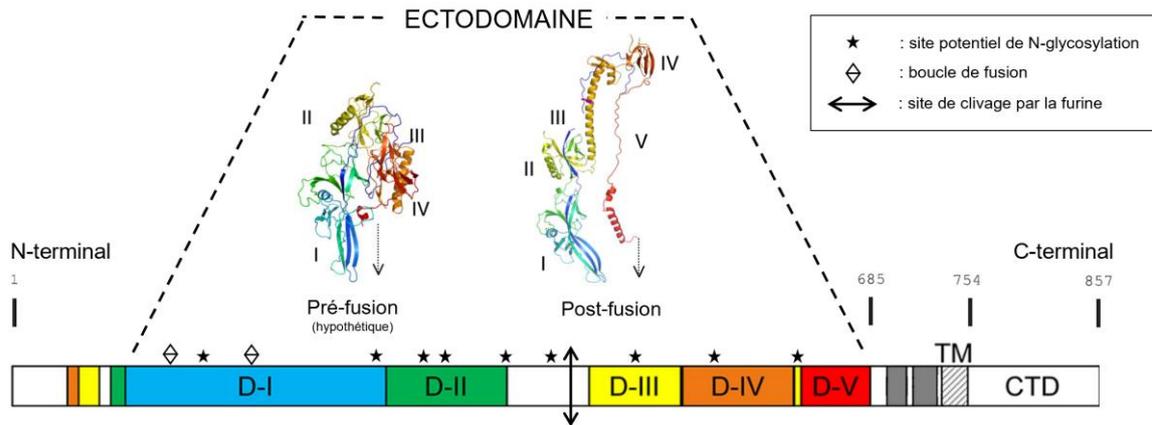


Figure 10 : Représentation schématique de la glycoprotéine gB de l'EBV.
(inspiré de Möhl et al. (25) et Backovic et al. (83))

Une fois infectées par l'EBV, les cellules cibles vont exprimer les glycoprotéines virales à leur surface avant qu'elles ne soient incorporées dans les virions matures à la sortie de la cellule. Contrairement à la gp350, la quantité de gB exprimée à la surface cellulaire, *in vitro*, n'est pas la même selon les lignées cellulaires infectées. De ce fait, les virus issus de lignées cellulaires différentes ont des taux variables de gB. Ainsi, la lignée B95-8 de cellules lymphoblastoïdes de ouistiti (immortalisée par la souche virale de référence d'EBV, B95-8) présente peu, voire pas, de gB au niveau de la membrane plasmique des cellules puisque la glycoprotéine gB est exprimée principalement au niveau de la membrane nucléaire et au niveau du réticulum endoplasmique. En revanche, les cellules M-ABA (issues d'un carcinome nasopharyngé) et les cellules Akata (provenant d'un lymphome de Burkitt japonais) expriment des forts taux de gB au niveau de la membrane plasmique. D'après l'équipe de Neuhierl *et al.*, les souches virales de type Akata, qui expriment fortement la gB, sont 100 fois plus efficaces pour infecter des cellules lymphoïdes ou épithéliales, que celles qui l'expriment faiblement, comme la souche B95-8 (85).

En plus de sa capacité à permettre l'infection virale par son implication dans la fusion, la gB jouerait un rôle essentiel dans la maturation du virus. En effet, la délétion du gène BALF-4 inhibe la maturation virale, et la production de virions par les cellules (83).

L'ensemble des travaux de recherche récents sur la glycoprotéine gB, principalement réalisés chez l'animal, montrent qu'elle est une cible intéressante à étudier pour les anticorps neutralisants anti-EBV et le développement d'un vaccin contre les pathologies associées au virus [(67) (72) (59) (70) (68)].

Ainsi, l'objectif principal de notre étude était de développer des outils permettant d'explorer la réponse anticorps neutralisante anti-gB chez l'homme à la suite d'une infection par l'EBV.

Ces outils pourront être exploités dans le futur pour i) isoler des anticorps monoclonaux anti-gB neutralisants et ii) identifier leurs épitopes par des approches fonctionnelles et structurales, étapes faisant partie de la stratégie de vaccinologie inverse. La vaccinologie inverse repose sur l'étude des anticorps monoclonaux neutralisants. Une fois isolés du sérum de patients, ces anticorps sont utilisés pour identifier des antigènes ou épitopes dits neutralisants au sein d'un complexe antigène-anticorps. Ces épitopes immunogènes peuvent être utilisés dans une stratégie vaccinale et permettre la production des anticorps monoclonaux à visée prophylactique ou thérapeutique (86).

2. Matériel & Méthodes

2.1. Culture cellulaire

Différents types cellulaires ont été utilisés dans cette étude.

Les cellules adhérentes HEK 293T sont des cellules épithéliales de rein d'embryons humains. Elles sont cultivées dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) + L-glutamine (29,2 mg/mL) + pénicilline (10 000 unités/mL) + streptomycine (10 000 µg/mL) (L-g/P/S) (gibco) complété avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) à 37°C sous 5% d'atmosphère CO₂.

La lignée cellulaire HEK 293T développée par Delecluse *et al.*, produisant un virus EBV porteur du gène de la GFP (Green Fluorescent Protein) a été renommée ici EGC pour EBV GFP Cells (87). Il s'agit de cellules HEK 293 qui contiennent un bacmide codant pour le génome complet de la souche B95-8 d'EBV, modifié avec le gène de résistance à l'hygromycine, le F-Factor (permettant la multiplication du bacmide) et le gène de la GFP, nommé EBV B95-8 F-Factor (EBV B95-8F).

Les cellules Raji sont des cellules B non adhérentes dérivées d'un lymphome de Burkitt, qui contiennent un virus EBV délété pour l'oncogène BARF-1 et le gène BALF-2, impliqué dans la réplication virale (88). Par conséquent, l'expression des protéines précoces de cet EBV déficient peut toujours se faire mais le cycle viral est avorté. Elles sont cultivées dans un milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute) + L-g/P/S complété avec 10% de SVF, à 37°C sous 5% d'atmosphère CO₂.

2.2. *Production de mutants de gB*

Les mutants gB₇₈₁, gB₈₂₅, gB₈₃₇ et gB₈₄₃ ont été construits à l'aide du kit In-Fusion[®] HD Cloning Plus (Takara), à partir du plasmide pRK5 (4661 pb) contenant le gène BALF-4 (2574 pb) qui code pour gB (séquence AFY97983) (89) et un gène de résistance à l'ampicilline (non représenté dans la **Figure 11**). Le principe de ce kit utilisé pour le clonage, est basé sur le design d'amorces sens et anti-sens qui se superposent l'une avec l'autre sur 15 pb à leur extrémité 5' et qui contiennent la mutation d'intérêt. La séquence de ces amorces est donnée dans la **Figure 13**. Le protocole In-Fusion[®] consiste à amplifier les vecteurs d'intérêt linéarisés, à l'aide d'une PCR utilisant les amorces préalablement construites. Les vecteurs sont ensuite re-circularisés au niveau du site de chevauchement des 15 pb et contiennent la mutation souhaitée (substitution d'une base correspondant à l'insertion d'un codon stop) qui permet de tronquer le domaine CTD des quatre mutants de gB (**Figure 11**).

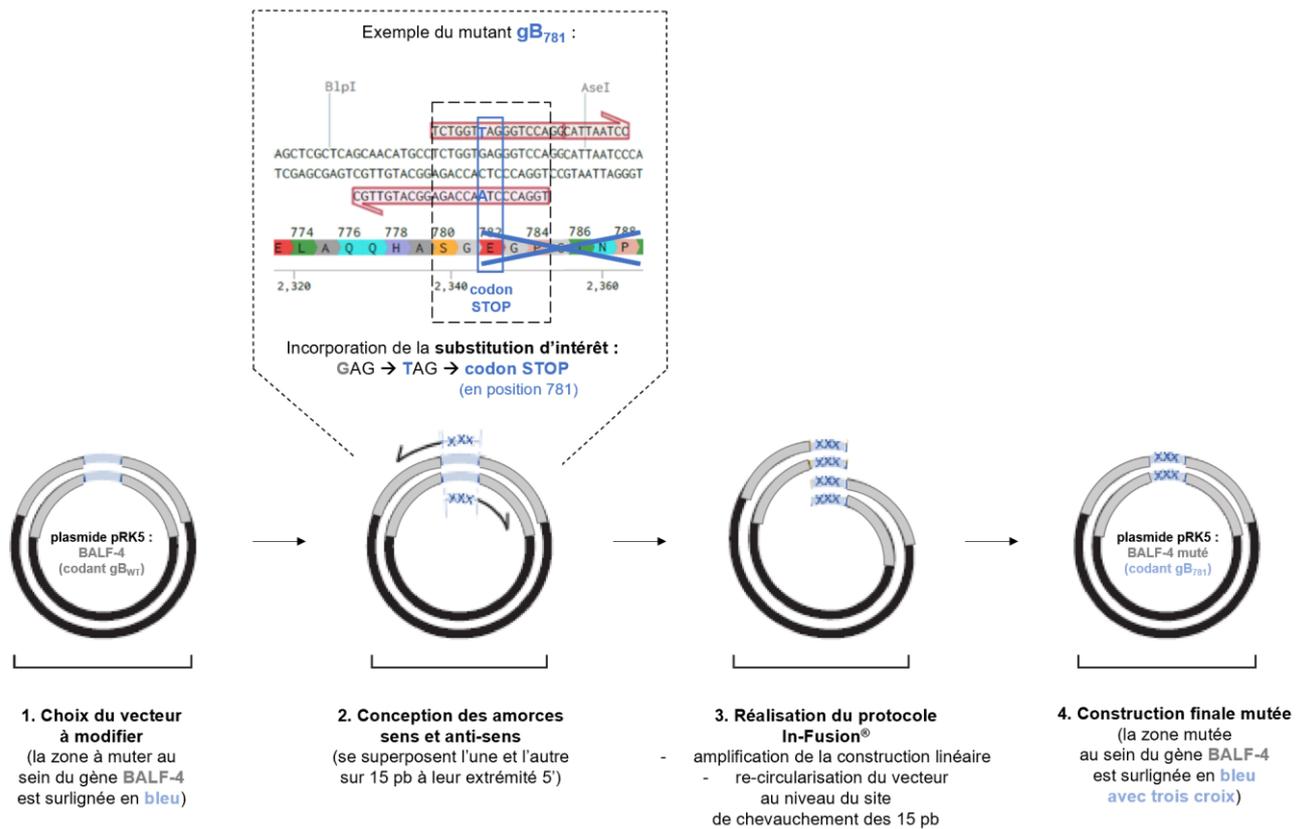


Figure 11 : Production de mutants de gB avec le protocole In-Fusion® (exemple de gB₇₈₁).

En pratique, un volume de 12,5 µL de CloneAmp™ HiFi PCR Premix (ADN polymérase + dNTP + solution tampon) est mélangé avec 0,5 µM des amorces sens et anti-sens et 100 ng de plasmide pour un volume réactionnel final de 25 µL. Les 35 cycles de PCR ont été définis en fonction de la température de fusion des amorces et de la longueur des fragments à amplifier (7235 pb) : 10 secondes à 98°C puis 15 secondes à 55°C puis 3,6 minutes à 72°C (30 secondes pour 1000 pb) pour chaque cycle. Les produits d'amplification sont ensuite recircularisés au niveau des 15 pb grâce à l'enzyme In-Fusion®, pendant 15 minutes à 50°C. Les ADN extraits sont déposés sur gel d'agarose (1%), pour vérifier la taille des fragments d'ADN, correspondant environ à 110 kDa pour gB.

2.3. Transformation

La transformation est réalisée en cellules bactériennes Stellar™ fournies avec le kit In-Fusion® selon les modalités suivantes.

Pour chaque mutant de gB, 2,5 µL du produit de la réaction In-Fusion® est ajouté à 50 µL de cellules Stellar™ puis incubé 30 minutes dans la glace. Un choc thermique est réalisé à 42°C pendant 45 secondes suivi de 2 minutes dans la glace. Une partie des cellules transformées est étalée sur des géloses avec 100 µg/mL d'ampicilline (les plasmides contiennent un gène de résistance à cet antibiotique) qui sont ensuite incubées à 37°C jusqu'au lendemain. Le jour suivant, quelques colonies de bactéries sont prélevées sur chaque gélose et sont mises en culture pendant 24h à 37°C. Les plasmides sont purifiés à partir de la culture bactérienne grâce au kit QIAprep® Spin Miniprep (QIAGEN) selon les recommandations du fournisseur. Le séquençage des plasmides a été réalisé par la société Eurofins.

2.4. Transfection

Les cellules HEK 293T sont incubées la veille de la transfection pour avoir 70% de confluence le jour de la transfection. Avec le kit Helix-IN™ (OZBIOSCIENCES), nous avons déterminé un ratio optimal de transfectant de 3,3:1 (3,3 µL Helix-IN™/µg ADN). Pour chaque transfection, 200 µL de milieu OPTIMEM (gibco) sont mélangés avec 15 µg de plasmide de mutants de gB ou de gB_{WT} et 50 µL d'Helix-IN™. Le mélange est laissé pendant 30 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière avant de le répartir au goutte à goutte dans les cultures cellulaires. Ensuite, 100 µL de HIB 100X (OZBIOSCIENCES), un amplificateur de la transfection, sont ajoutés et les cellules sont incubées à 37°C pendant 48h afin que la transfection soit optimale.

2.5. *Évaluation de l'expression de gB et ses mutants à la surface des cellules*

Pour étudier l'expression de la gB_{WT} et des mutants de gB à la surface des cellules transfectées, nous avons utilisé un anticorps primaire monoclonal d'origine murine dirigé contre la gB, appelé l'anticorps 5B2 (IgG₁) (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Inc.).

Une suspension cellulaire de HEK 293T transfectées est préparée à la concentration de 10×10^6 cellules/mL dans du FACS Buffer (invitrogen), une solution saline tamponnée (PBS 1X) contenant du SVF (0,5%) et de l'azote de sodium (0,05%). Un volume d'1 μ L d'anticorps 5B2 (100 μ g/mL) est incubé avec 50 μ L de la suspension cellulaire pendant 1h dans la glace, à l'abri de la lumière. Les cellules sont ensuite lavées (1 mL de FACS Buffer puis centrifugation à 300g pendant 10 min à 4°C) et incubées avec 50 μ L d'anticorps secondaire (400 μ g/mL) dilué au 1:100 dans du FACS Buffer, pendant 30 minutes dans les mêmes conditions. Il s'agit d'un anticorps de chèvre dirigé contre le Fab (Fragment antigen binding) des IgG murines, conjugué à une protéine fluorescente, l'allophycocyanine (APC) (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Inc.).

Après lavage, les cellules sont fixées avec 350 μ L de FACS Buffer à 1% de paraformaldéhyde et l'intensité de la fluorescence émise par les cellules ayant lié l'anticorps 5B2, est évaluée par le cytomètre de flux BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson), disponible au CHU de Grenoble.

2.6. *Évaluation de la présence d'anticorps anti-gB dans les sérums de patients*

Pour analyser l'interaction entre les anticorps anti-gB, potentiellement présents dans les sérums de patients et les cellules transfectées qui expriment la gB_{WT} ou l'une des mutations de gB, nous avons utilisé les mêmes conditions que décrit précédemment (2.5.) en utilisant cette fois-ci un anticorps secondaire dirigé contre le Fab des IgG humaines et conjugué à la phycoérythrine (PE), protéine fluorescente. L'intensité de la fluorescence émise par les cellules ayant lié les anticorps anti-gB des sérums de patients, est évaluée par le même cytomètre de flux BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson) (2.5.).

2.7. *Production de virus EBV B95-8F à tropisme cellulaire B*

Les cellules EGC sont cultivées dans une plaque 24 puits à fond plat pendant 24h. Pour induire la production des virus EBV B95-8F et augmenter l'infectiosité des virions produits, deux plasmides d'expression sont transfectés dans les cellules EGC. Les cellules sont incubées à 37°C avec 0,6 µg du plasmide BZLF1 (codant pour Zebra, principal transactivateur qui induit le cycle lytique d'EBV) et 0,6 µg du plasmide BALF-4 (codant pour la gB, qui augmente l'infectiosité des virions produits), dans 50 µL de milieu OptiMEM (gibco) contenant 2,2 µL de lipofectamine 2000 (invitrogen) (**Figure 12**). Après 48h de culture, le surnageant contenant les virions produits est recueilli puis centrifugé pour éliminer les cellules et débris restants. La suspension virale est congelée à -80°C jusqu'à son utilisation.

2.8. *Test de neutralisation de l'infection par EBV des cellules B Raji, par le sérum de patients*

Les sérums de patients sont préalablement décomplémentés à 56°C pendant 30 minutes. Des dilutions en cascade des sérums sont réalisées en milieu RPMI + L-g/P/S complété avec 10% de SVF et chaque dilution de sérum est testée en triplicat. Cinquante microlitres de suspension contenant les virus EBV B95-8F sont incubés avec un volume équivalent du sérum à tester pendant 2h à 37°C. Ce mélange virus-anticorps est incubé 48h avec 10⁴ cellules Raji (**Figure 12**). La quantification des cellules fluorescentes (cellules infectées par un virus EBV B95-8F) est réalisée avec le cytomètre de flux BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson).

Les calculs permettant d'aboutir au pourcentage de neutralisation relative (axe des ordonnées de la régression non linéaire) pour chaque dilution de sérum (axe des abscisses de la régression non linéaire) sont décrits ci-dessous.

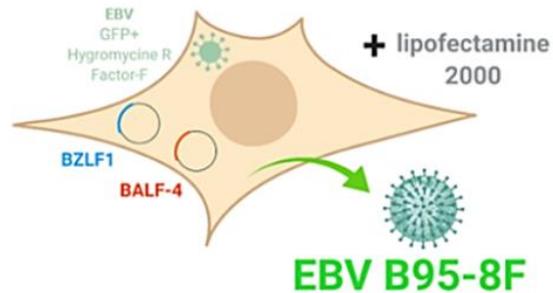
La moyenne (A) du pourcentage de cellules infectées par le virus (donc fluorescentes) en l'absence de sérum est calculée. Elle correspond au contrôle de l'infection en l'absence de toute neutralisation. Le contrôle de l'infection (A) représente le taux maximal d'infection des cellules Raji. Pour chaque dilution de sérum, la moyenne (B) du pourcentage de cellules infectées par le virus en présence de sérum dilué est calculée. Le pourcentage d'infection relative est calculé, pour chaque dilution de sérum, par le rapport : $\frac{B \times 100}{A}$. Enfin, le pourcentage de neutralisation relative est obtenu, pour chaque dilution de sérum, par la soustraction : 100 – infection relative (%).

La DI50 des sérums des patients est définie comme étant la dilution du sérum qui inhibe 50% de l'infection virale. Elle permet d'évaluer la capacité des sérums de patients à neutraliser l'infection virale des cellules Raji. Pour calculer la DI50,

l'équation ($y = ax + b$) de la tangente de la courbe de neutralisation relative au point d'ordonnée 50%, est déterminée. La DI50 correspond à la valeur d'abscisse x , pour une valeur d'ordonnée y égale à 50.

1/ Production de virus EBV B95-8F :

HEK 293 EBV GFP Cells : EGC



2/ Incubation des virus EBV B95-8F avec les sérums à tester :



3/ Infection des cellules Raji :

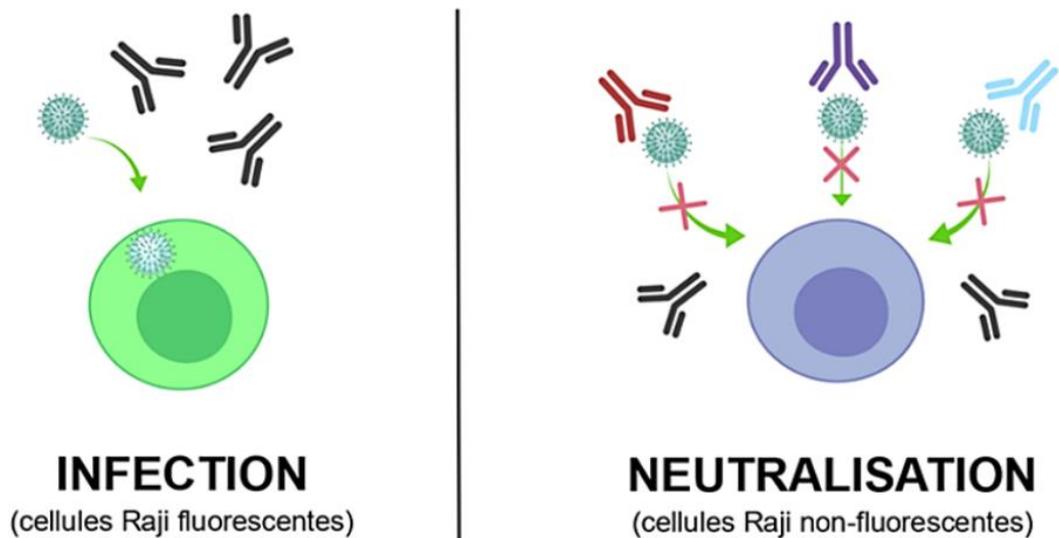


Figure 12 : Test de neutralisation de l'infection par EBV des cellules B, par le sérum de patients.

BZLF-1, BALF-4 = plasmides d'expression contenant les gènes BZLF-1 et BALF-4 du virus d'Epstein-Barr ; EBV + = séropositif pour l'EBV ; Contrôle NÉGATIF = sérum de patient séronégatif pour l'EBV.

3. Résultats

3.1. Construction de mutants de gB

Dans notre étude, nous avons décidé de maintenir la gB dans sa forme pré-fusionnelle à la surface de cellules HEK, en conservant les domaines transmembranaires et CTD. Cependant, l'expression de la gB sauvage (gB_{WT}) à la surface des cellules épithéliales est décrite comme étant faible (83). Afin de pallier à la faible expression de gB_{WT} et d'explorer les réponses anticorps dirigées contre la gB dans sa forme pré-fusionnelle, nous avons construit quatre mutants de gB (gB₇₈₁, gB₈₂₅, gB₈₃₇ et gB₈₄₃) décrits par l'équipe de Garcia *et al.* comme étant mieux exprimés que la gB_{WT} (89). Les amorces sens et anti-sens utilisées pour la mutagenèse sont présentées dans la **Figure 13**.

La construction des mutants a été répétée trois fois pour espérer avoir au moins un mutant de chaque qui contient la séquence attendue. La comparaison avec la séquence AFY97983 de la gB sauvage a permis de vérifier que l'ensemble des mutants de gB construits contenaient bien la séquence mutée souhaitée, confirmant le succès de la mutagenèse (**Tableau I**).

Tableau I : Séquençage des mutants de gB.

	Type de mutant de gB (ou gB _{WT})	Séquence primaire d'acides-aminés du CTD des mutants de gB (par comparaison à gB _{WT})	Succès de la mutagenèse
plasmide pRK5	781	RRTRQMSQQPVQMLYPGIDELAQQHASG	1 sur 3
	825	RRTRQMSQQPVQMLYPGIDELAQQHASGEGPGINPISKTELQAIMLALHEQNQEQRKAAQRAAGPSVASRAL	3 sur 3
	837	RRTRQMSQQPVQMLYPGIDELAQQHASGEGPGINPISKTELQAIMLALHEQNQEQRKAAQRAAGPSVASRALQAARDRFPGLRR	2 sur 3
	843	RRTRQMSQQPVQMLYPGIDELAQQHASGEGPGINPISKTELQAIMLALHEQNQEQRKAAQRAAGPSVASRALQAARDRFPGLRRRRYHDP	1 sur 3
	WT	RRTRQMSQQPVQMLYPGIDELAQQHASGEGPGINPISKTELQAIMLALHEQNQEQRKAAQRAAGPSVASRALQAARDRFPGLRRRRYHDPETAALLGEAETEF	



Figure 13 : Séquence nucléotidique du domaine C-terminal de gB et amorces sens et anti-sens utilisées pour générer les mutants gB₇₈₁, gB₈₂₅, gB₈₃₇ et gB₈₄₃. Les nucléotides mutés sont représentés en rouge.

3.2. Expression des mutants de gB à la surface cellulaire

L'expression cellulaire de gB_{WT} et des différents mutants a été évaluée par une méthode basée sur de l'immunofluorescence cellulaire. Les cellules HEK 293T transfectées avec gB_{WT} (ou ses mutants) sont incubées avec des anticorps anti-gB commerciaux (5B2) puis avec des anticorps secondaires conjugués à l'APC. L'intensité de fluorescence et, par conséquent, la quantité de complexes « anticorps secondaire-APC / anticorps 5B2 / gB », est mesurée par cytométrie de flux et est indicative de la quantité de gB exprimée à la surface des cellules.

Les intensités de fluorescence maximales ont été obtenues avec les cellules transfectées avec les mutants gB₇₈₁ et gB₈₂₅ et dans une moindre mesure gB₈₃₇, dont les niveaux de fluorescence étaient respectivement 61, 56 et 14 fois plus élevés que la fluorescence obtenue avec la gB_{WT}. En revanche, l'intensité de fluorescence (et donc l'expression cellulaire) obtenue avec les cellules transfectées avec gB₈₄₃, semble très légèrement inférieure à la fluorescence obtenue avec la gB_{WT} (**Figure 14**).

En conclusion, avec l'anticorps monoclonal commercial 5B2, nous avons mis en évidence une expression différentielle des mutants de gB à la surface des cellules HEK 293T. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par l'équipe de Garcia *et al.*, qui utilisait aussi un anticorps commercial mais différent du nôtre.

Avec ces anticorps 5B2, la gB sauvage semble moins exprimée que les mutants, à l'exception du mutant gB₈₄₃. Cependant, il n'est pas exclu que cette différence d'expression apparente soit due à une affinité moindre de l'anticorps commercial pour la gB_{WT}, comparé aux mutants.

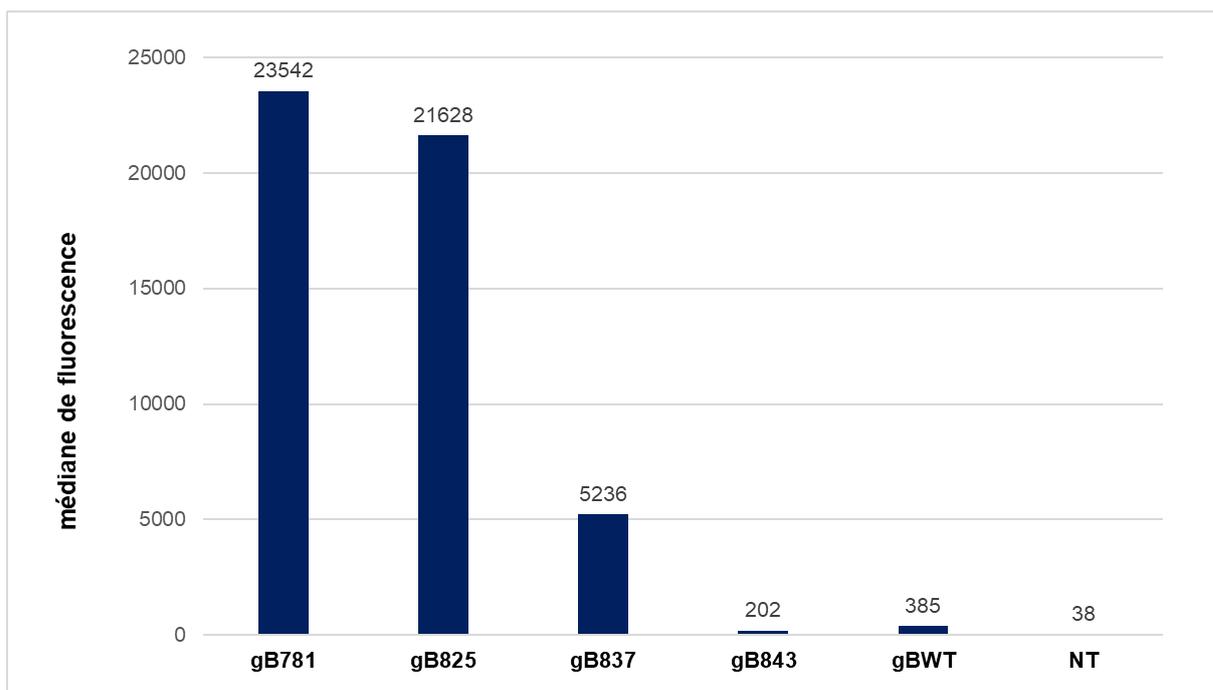


Figure 14 : Expression de gB_{WT} et ses mutants à la surface des cellules HEK 293T.

Les cellules HEK 293T transfectées par les plasmides d'expression de la gB sauvage (gB_{WT}) ou de ses mutants, sont analysées en cytométrie de flux après avoir été marquées par l'anticorps anti-gB 5B2 et révélées par un anticorps secondaire fluorescent. La hauteur des barres de l'histogramme correspond à la médiane de fluorescence obtenue pour chacune des transfections réalisées.

3.3. Détection d'anticorps anti-gB dans le sérum de patients séropositifs pour l'EBV

Nous avons émis l'hypothèse que la probabilité de détecter des anticorps anti-gB était plus grande chez des patients présentant un taux élevé d'anticorps anti-EBV, avec les kits de sérologie utilisés au laboratoire de Virologie du CHU de Grenoble (LIAISON[®] XL Analyzer, DiaSorin). Nous avons sélectionné quatre sérums de patients séropositifs pour l'EBV (EBV +) disponibles au laboratoire : trois, sélectionnés pour leur fort taux (> 750 UI/mL) en IgG dirigés contre la capsidie antigénique virale (VCA) de l'EBV et un, sélectionné pour son volume important et son taux moyen d'anticorps. Enfin, nous avons aussi sélectionné un sérum de patient séronégatif pour l'EBV (EBV -) (**Tableau II**).

Tableau II : Résultats des sérologies EBV des cinq sérums sélectionnés.

Sérum	Sérologie* (UI/mL)			Interprétation
	IgM anti-VCA	IgG anti-VCA	IgG anti-EBNA	
Sérum 1	<10	1200	748	Infection ancienne (ou réactivée) à EBV
Sérum 2	<10	17800	4340	Infection ancienne (ou réactivée) à EBV
Sérum 3	<10	1580	181	Infection ancienne (ou réactivée) à EBV
Sérum 4	<10	248	364	Infection ancienne (ou réactivée) à EBV
Sérum EBV -	<10	<10	<3	Séronégatif : absence d'infection à EBV

*kit sérologique : LIAISON® XL Analyzer, DiaSorin.

La détection des anticorps anti-gB dans les sérums de patients EBV + est une méthode basée, comme précédemment, sur de l'immunofluorescence cellulaire. Les cellules HEK 293T transfectées avec gB_{WT} ou ses mutants sont incubées avec le sérum de patients. Si des anticorps anti-gB sont présents dans le sérum, ils se lient aux cellules transfectées et peuvent ensuite interagir avec les anticorps secondaires conjugués à la PE. L'intensité de fluorescence et, par conséquent, la quantité de complexes « anticorps secondaire-PE / anticorps anti-gB / gB », est mesurée par cytométrie de flux et est indicative de la concentration d'anticorps anti-gB présents dans les sérums.

Dans un premier temps, nous avons utilisé les cellules transfectées par la gB₇₈₁ (mutant le plus exprimé à la surface des cellules) et celles transfectées par la gB_{WT} avec les sérums 1, 2 et 3, sélectionnés pour leur fort taux d'anticorps anti-EBV. L'objectif était, tout d'abord, de comparer les résultats d'expression de gB obtenus avec ces sérums et ceux précédemment obtenus avec l'anticorps 5B2 et aussi d'évaluer la capacité des deux constructions (gB₇₈₁ et gB_{WT}) à mettre en évidence des anticorps anti-gB dans le sérum de patients.

Pour évaluer le bruit de fond de notre technique nous avons réalisé trois contrôles négatifs. Le premier (NT-NS-No2nd), correspond aux cellules non transfectées (NT),

sans sérum (NS) ni anticorps secondaire (No2nd), pour évaluer la fluorescence de base apportée par les cellules HEK 293T. Le second (NT-S1-2nd), correspond aux cellules non transfectées (NT) incubées avec le sérum 1 (S1) et l'anticorps secondaire (2nd), pour vérifier la spécificité de liaison des anticorps anti-gB. Le dernier (gB₇₈₁-NS-2nd), correspond aux cellules transfectées avec le mutant gB₇₈₁, incubées directement avec l'anticorps secondaire (2nd), pour étudier sa spécificité de liaison en l'absence de sérum (NS).

Avec la construction gB_{WT}, nous n'observons pas de différence d'intensité de fluorescence entre d'un côté, les cellules incubées avec les sérums EBV + 1, 2 et 3 (qui contiennent un fort taux d'anticorps anti-EBV) et de l'autre, l'ensemble des contrôles négatifs réalisés : cellules incubées avec le sérum EBV - (séronégatif pour l'EBV), NT-NS-No2nd, NT-S1-2nd et gB₇₈₁-NS-2nd (**Figure 15**).

À ce stade, nous pouvons soit penser que les sérums 1, 2 et 3 (séropositifs pour l'EBV) ne contiennent pas d'anticorps anti-gB, soit que la faible expression de gB_{WT} ne permet pas de mettre en évidence les anticorps anti-gB des patients.

En utilisant les cellules transfectées avec le mutant gB₇₈₁ et incubées avec les sérums 1, 2 et 3, nous observons une différence de fluorescence entre les cellules incubées avec les sérums 1, 2 et 3 et les contrôles négatifs. Ceci montre que la construction gB₇₈₁ est capable de mettre en évidence la présence d'anticorps anti-gB dans le sérum de patients, contrairement à la construction gB_{WT}. Cette capacité est probablement due à la supériorité du taux d'expression de gB₇₈₁ à la surface des cellules, comparé à gB_{WT} (**Figure 15**).

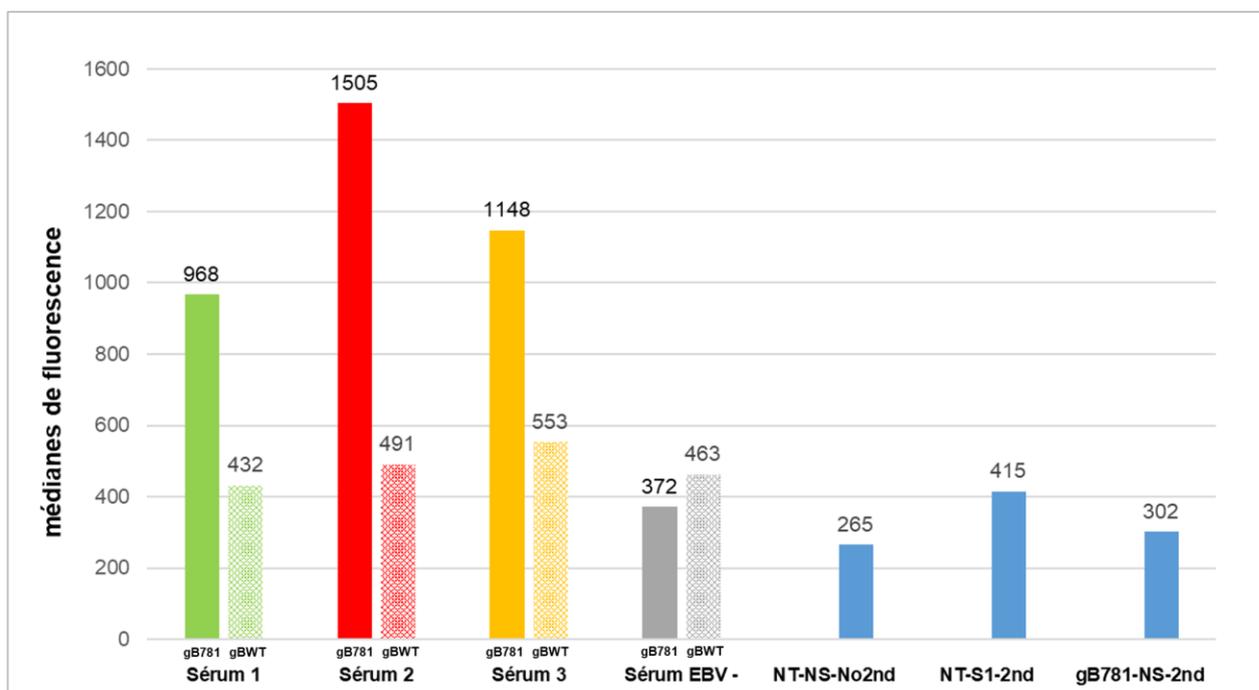


Figure 15 : Évaluation de la capacité des constructions gB_{WT} et gB₇₈₁ à mettre en évidence des anticorps anti-gB dans le sérum de patients.

Les cellules HEK 293T transfectées par les plasmides d'expression de la gB sauvage (gB_{WT}) ou du mutant gB₇₈₁, sont analysées en cytométrie de flux après avoir été incubées avec des sérums de patients contenant un taux élevé d'anticorps anti-EBV (sérums 1, 2 et 3) ou avec un sérum de patient séronégatif pour l'EBV (sérum EBV -) et révélées par un anticorps secondaire fluorescent. La hauteur des barres de l'histogramme correspond à la médiane de fluorescence obtenue pour chacune des conditions réalisées. NT-NS-No2nd = cellules non transfectées / sans sérum / sans anticorps secondaire ; NT-S1-2nd = cellules non transfectées / sérum 1 / avec anticorps secondaire ; gB₇₈₁-NS-2nd = cellules transfectées avec la gB₇₈₁ / sans sérum / avec anticorps secondaire.

Ces résultats confirment donc les résultats précédents obtenus avec l'anticorps commercial 5B2 ; à savoir que la gB sauvage est moins exprimée que le mutant gB₇₈₁. Ils montrent également que les trois sérums EBV + contiennent des anticorps anti-gB.

Les résultats obtenus avec gB₇₈₁ nous ont encouragé à poursuivre l'analyse des sérums EBV + avec les autres mutants de gB : gB₈₂₅, gB₈₃₇ et gB₈₄₃, en gardant le mutant gB₇₈₁ comme contrôle positif (**Figure 16**).

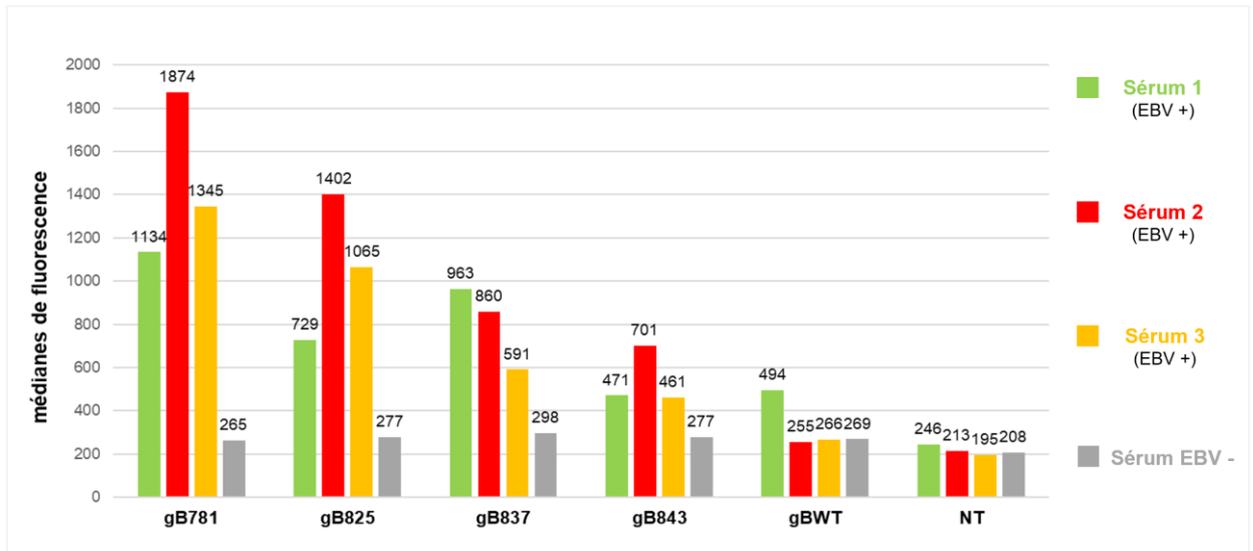


Figure 16 : Évaluation de la présence d'anticorps anti-gB dans les sérums de patients.

Les cellules HEK 293T transfectées par les plasmides d'expression de la gB sauvage (gB_{WT}) ou de ses mutants, sont analysées en cytométrie de flux après avoir été incubées avec des sérums de patients contenant un taux élevé (sérums 1 et 3) ou très élevé (sérum 2) d'anticorps anti-EBV ou avec un sérum de patient séronégatif pour l'EBV (sérum EBV -) et révélées par un anticorps secondaire fluorescent. La hauteur des barres de l'histogramme correspond à la médiane de fluorescence obtenue pour chacune des conditions réalisées. NT = cellules non transfectées.

Les intensités de fluorescence mesurées pour les différents mutants de gB avec les sérums 2 et 3, montrent que l'expression de gB est maximale pour les transfections gB_{781} et gB_{825} et plus modérée pour les mutants gB_{837} et gB_{843} (**Figure 16**) comme nous l'avons déjà constaté avec le marquage par l'anticorps 5B2 (**Figure 14**). Le sérum 1 donne des résultats différents des sérums 2 et 3 et de l'anticorps 5B2 avec une intensité de fluorescence obtenue avec le mutant gB_{837} , qui est plus élevée que pour le mutant gB_{825} et aussi élevée que pour le mutant gB_{781} . Ceci peut être dû à un artefact de manipulation mais également à l'existence, dans ce sérum 1, d'anticorps anti-gB de réactivité différente.

C'est avec les mutants les plus exprimés (gB₇₈₁ et gB₈₂₅) qu'il est plus facile d'observer une différence d'intensité de fluorescence (et donc de concentration en anticorps anti-gB) entre les sérums. Ainsi, en utilisant les constructions gB₇₈₁ et gB₈₂₅, les valeurs médianes de fluorescence sont plus élevées avec le sérum 2 qu'avec le sérum 3 et enfin qu'avec le sérum 1, ce qui est concordant avec les résultats de sérologie de routine. En effet, parmi ces trois sérums, le sérum 2 est celui qui possède le plus d'IgG anti-VCA, suivi du sérum 3 et enfin du sérum 1 (**Tableau II**). Nous faisons alors l'hypothèse que plus le titre d'IgG anti-VCA d'un sérum est élevé, plus le sérum possède des IgG anti-gB.

Afin de vérifier nos hypothèses, nous avons sélectionné un quatrième sérum de patient EBV + qui, contrairement aux trois autres, présentait un taux modéré d'IgG anti-VCA avec les tests sérologiques de routine (**Tableau II**). Nous avons donc reproduit l'expérience précédente (**Figure 16**) en utilisant le sérum 4 et en gardant le sérum 2 comme contrôle positif (**Figure 17**).

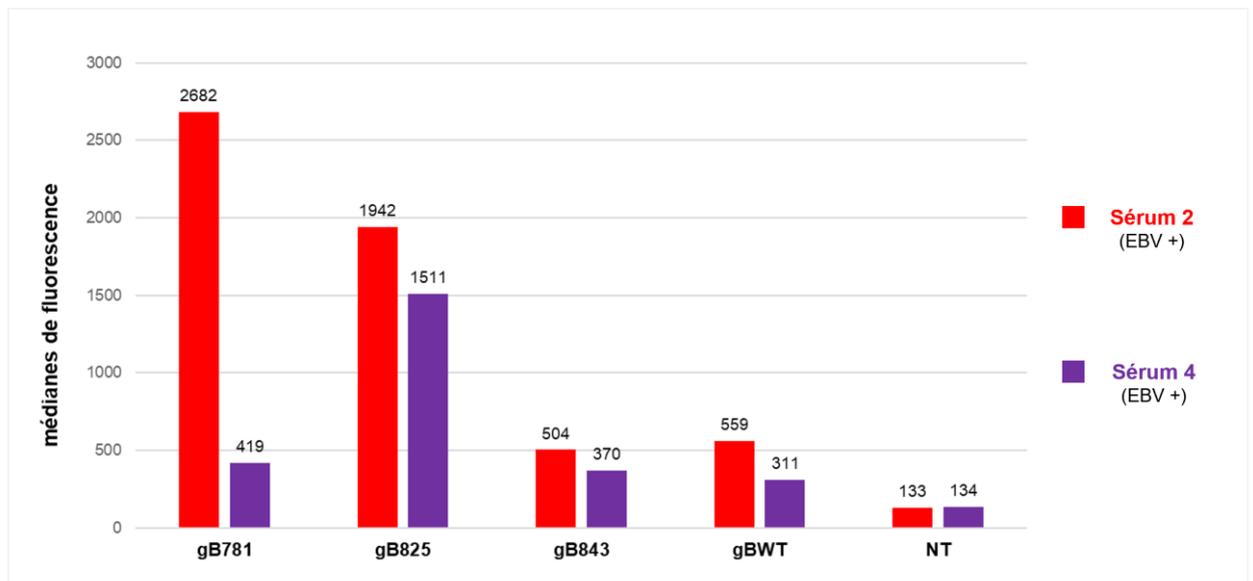


Figure 17 : Évaluation de la présence d'anticorps anti-gB dans les sérums de patients.

Les cellules HEK 293T transfectées par les plasmides d'expression de la gB sauvage (gB_{WT}) ou de ses mutants, sont analysées en cytométrie de flux après avoir été incubées avec des sérums de patients contenant un taux très élevé (sérum 2) ou modéré (sérum 4) d'anticorps anti-EBV et révélées par un anticorps secondaire fluorescent. La hauteur des barres de l'histogramme correspond à la médiane de fluorescence obtenue pour chacune des conditions réalisées. NT = cellules non transfectées.

Lors de cette nouvelle expérience, les résultats obtenus avec le sérum 2 sont superposables à ceux obtenus précédemment, suggérant que notre méthode de détection des anticorps anti-gB est reproductible.

Malheureusement, les résultats obtenus avec le sérum 4 n'ont pas permis de vérifier les hypothèses précédentes. Tout d'abord, parce que la transfection avec gB_{837} n'a pas fonctionné et d'autre part, parce que ce sérum semble avoir un résultat atypique avec le mutant gB_{825} . Cependant, les résultats obtenus avec la construction gB_{781} sont compatibles avec le résultat attendu ; c'est à dire une concentration d'anticorps anti-gB faible dans le sérum 4.

3.4. *Mise en évidence du pouvoir neutralisant du sérum de sujets séropositifs pour l'EBV*

Après avoir mis en évidence la présence d'anticorps anti-gB dans les sérums de patients présentant un taux élevé d'anticorps anti-EBV (avec les kits de sérologie utilisés au laboratoire), nous avons étudié le titre en anticorps anti-EBV neutralisants dans les sérums des quatre patients sélectionnés, séropositifs pour l'EBV. Pour cela, nous avons utilisé le test de neutralisation de l'infection des cellules B par l'EBV, déjà mis au point au laboratoire : la suspension virale EBV B95-8F est incubée avec des dilutions en cascade des sérums. Le mélange « virus-sérum dilué » est incubé avec les cellules Raji. Les cellules infectées expriment la GFP. Le pourcentage de cellules fluorescentes (GFP +) est mis en évidence par cytométrie en flux pour chaque dilution de sérum réalisée en triplicat.

Dans un premier temps nous avons voulu évaluer la variabilité de notre méthode. Le test de neutralisation du virus EBV a été réalisé cinq fois avec le sérum 4 et deux fois avec le sérum 2. La moyenne des DI50 obtenues avec le sérum 4 est égale à 165 +/- 58 (écart-type) avec pour distribution [113-258]. La moyenne des DI50 obtenues avec le sérum 2 est égale à 4521 +/- 133 (écart-type) avec pour distribution [4427-4615]. Le sérum EBV – (séronégatif pour l'EBV), utilisé comme contrôle négatif du test, ne neutralise pas l'infection des cellules Raji par le virus EBV B95-8F. Ces premiers résultats montrent qu'avec notre technique de neutralisation, les résultats de DI50 sont reproductibles.

Dans un second temps, nous avons voulu comparer les DI50 moyennes du sérum 4 (165) avec celles du sérum 2 (4521), en utilisant le test non paramétrique de Wilcoxon bivarié. Notons que le test paramétrique de Student n'était pas applicable

car la variable ne suivait pas une loi normale centrée réduite (LNCR) selon le test de Shapiro-Wilk au risque $\alpha = 5\%$ ($p\text{-value} = 0,0006$).

Dans ces conditions, au vu du faible nombre d'échantillons analysés, la différence de DI50 observée entre ces deux sérums n'était pas statistiquement significative au risque $\alpha = 5\%$ ($p\text{-value} = 0,095$). Nous pouvons cependant évoquer une nette tendance qui serait à confirmer par des expérimentations supplémentaires : le patient 2 présente le titre le plus élevé en anticorps neutralisants anti-EBV totaux et semble ainsi se démarquer des patients 1 (538), 3 (2265) et 4 (165) qui ont des DI50 plus faibles (**Figure 18**).

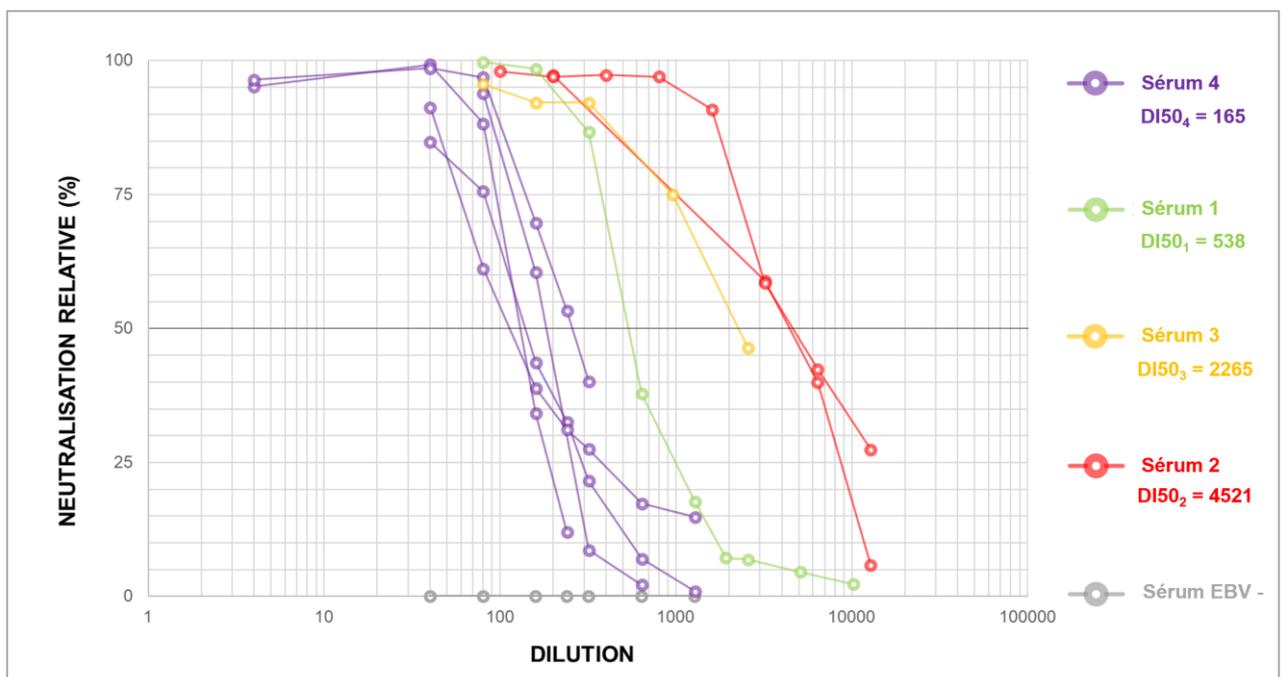


Figure 18 : Neutralisation de l'infection des cellules B Raji par le virus EBV B95-8F, par les sérums de patients.

Sérum EBV - = sérum séronégatif pour l'EBV ; DI50 = dilution inhibitrice 50%.

3.5. Mise en évidence du pouvoir neutralisant de deux spécialités d'immunoglobulines humaines polyvalentes

Après avoir montré le pouvoir neutralisant de différents sérums de patients EBV +, nous avons étudié le titre en anticorps anti-EBV neutralisants de deux médicaments de la famille des immunoglobulines humaines normales (IgIV), disponibles au CHU de Grenoble : CLAIRYG® et TEGELINE®. Ces médicaments, généralement indiqués comme traitement substitutif dans les déficits immunitaires primitifs et secondaires ou comme traitement immunomodulateur, contiennent des IgG qui présentent un large spectre d'anticorps dirigés contre les agents-infectieux (90). En général, ces médicaments sont fabriqués à partir de pools de plasma provenant d'un minimum de 1000 dons humains et se conservent deux ans à une température inférieure à 25°C. L'EBV infectant plus de 90% de la population adulte mondiale, il est très probable que ces médicaments possèdent des anticorps dirigés contre l'EBV.

La sérologie EBV de CLAIRYG® et TEGELINE®, réalisée avec le même kit que pour les sérums de patients, confirme la présence d'anticorps anti-EBV dans ces deux spécialités d'IgIV polyvalentes (**Tableau III**).

Tableau III : Résultats des sérologies EBV de CLAIRYG® et de TEGELINE®.

Médicament	Sérologie* (UI/mL)		
	IgM anti-VCA	IgG anti-VCA	IgG anti-EBNA
CLAIRYG	<10	1220	1780
TEGELINE	<10	954	1220

*kit sérologique : LIAISON® XL Analyzer, DiaSorin.

Le test de neutralisation du virus EBV a été réalisé quatre fois avec le même lot de CLAIRYG® et deux fois avec le même lot de TEGELINE®.

La moyenne des DI50 obtenues avec CLAIRYG® est égale à 852 +/- 320 (écart-type) avec pour distribution [608-1316]. La moyenne des DI50 obtenues avec TEGELINE® est égale à 605 +/- 92 avec pour distribution [540-670] (**Figure 19**).

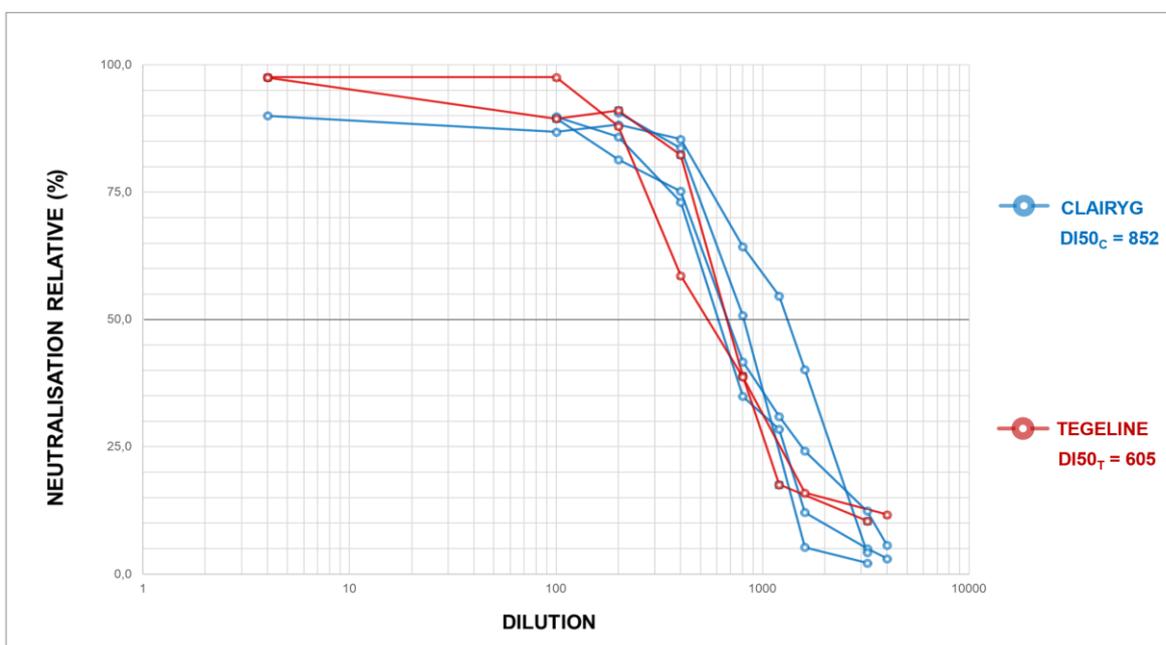


Figure 19 : Neutralisation de l'infection des cellules B Raji par le virus EBV B95-8F, par les spécialités d'immunoglobulines humaines polyvalentes CLAIRYG® et TEGELINE®.

Nous avons comparé les DI50 moyennes de CLAIRYG® et TEGELINE® en utilisant le test non paramétrique de Wilcoxon bivarié car la variable ne suivait pas une LNCR selon le test de Shapiro-Wilk au risque $\alpha = 5\%$ ($p\text{-value} = 0,036$). Nous n'avons pas observé de différence significative entre les DI50 moyennes de ces deux médicaments au risque $\alpha = 5\%$ ($p\text{-value} = 0,27$).

Si l'on compare les DI50 obtenues avec les quatre sérums de patients EBV + et les IgIV polyvalentes, le sérum 2 neutraliserait l'infection virale des cellules B, deux fois plus que le sérum 3, cinq fois plus que CLAIRYG®, sept fois plus que TEGELINE®, huit fois plus que le sérum 1 et même 27 fois plus que le sérum 4.

Par conséquent, certains sérums de patients EBV + possèdent des titres en anticorps anti-EBV neutralisants plus élevés que des médicaments, fabriqués à partir de pools d'environ 1000 plasmas humains.

3.6. *Corrélation entre le taux d'anticorps anti-VCA, le taux d'anticorps anti-gB et le pouvoir neutralisant*

Après avoir étudié séparément le taux d'anticorps anti-VCA de sérums de patients (ou de médicaments), le taux d'anticorps anti-gB et leur titre en anticorps anti-EBV neutralisants, nous avons voulu savoir s'il existait un lien entre les trois (**Tableau IV**).

Tableau IV : Données de sérologie (anticorps anti-VCA et anti-gB) et de neutralisation.

Sérum (ou médicament)	IgG anti-VCA (UI/mL)	DI50 moyennes	Médiane de fluorescence (gB781)	Médiane de fluorescence (gB825)
Sérum 4	248	165	X	X
TEGELINE	954	605	X	X
Sérum 1	1200	538	1134	729
CLAIRYG	1220	852	X	X
Sérum 3	1580	2265	1345	1065
Sérum 2	17800	4521	1874	1402

Les sérums (ou médicaments) ont été classés par ordre croissant des valeurs d'IgG anti-VCA. Le symbole « X » indique des données manquantes (expérimentations non réalisées).

En utilisant le test non paramétrique de Spearman, nous avons observé une corrélation non linéaire entre le taux d'IgG anti-VCA et la DI50, au risque $\alpha = 5\%$ ($p\text{-value} = 0,017$). Plus le taux d'IgG anti-VCA d'un sérum de patient (ou d'une IgIV) est élevé, plus sa DI50 et donc son titre en anticorps anti-EBV neutralisant est élevé (*coefficient de corrélation* $R = 0,943$).

De plus, en utilisant le test paramétrique de Pearson, nous avons observé une corrélation linéaire entre le taux d'IgG anti-gB (représenté par les intensités de fluorescence obtenues avec la construction gB₈₂₅ dans la **Figure 16**) et la DI50 des sérums 1, 2 et 3, au risque $\alpha = 5\%$ ($p\text{-value} = 0,048$; *coefficient de corrélation* $r = 0,997$) (**Figure 20 B**). Cependant, la corrélation observée avec la construction gB₈₂₅ ne se vérifie pas avec la construction gB₇₈₁ (**Figure 20 A**) au risque $\alpha = 5\%$ ($p\text{-value} = 0,106$). Le coefficient de corrélation obtenu avec la construction gB₇₈₁ est tout de même proche de 1 ($r = 0,986$) et suggère qu'une corrélation entre le taux d'IgG anti-gB (mesuré avec la construction gB₇₈₁) et la DI50, pourrait aussi s'observer si davantage de sérums étaient analysés. Ces corrélations pourraient suggérer un rôle des anticorps anti-gB dans la neutralisation.

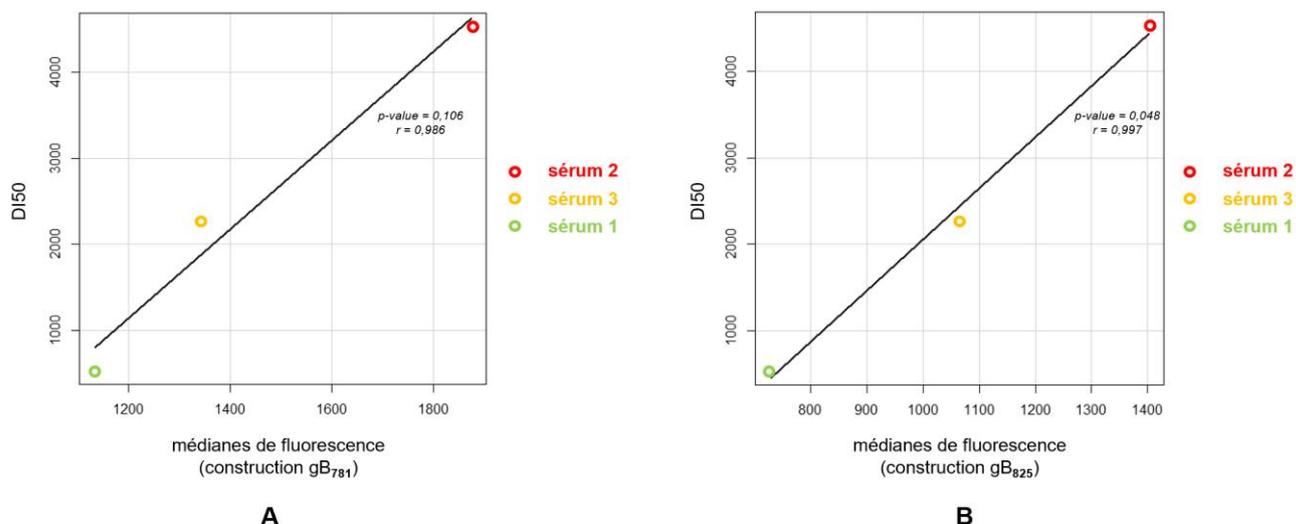


Figure 20 : Droites de corrélation linéaire entre le taux d'IgG anti-gB mesuré avec la construction gB₇₈₁ (A) ou la construction gB₈₂₅ (B) et les DI50 obtenues avec les sérums 1, 2 et 3.

Nous avons vu précédemment que le taux d'IgG anti-VCA semblait prédire le taux d'anticorps anti-gB et que le sérum 2 était celui qui se démarquait des autres sérums de patients EBV +, en possédant non seulement les taux d'IgG anti-VCA et d'IgG anti-gB les plus importants (**Figure 16**) mais aussi la DI50 la plus élevée (**Figure 18**). Ainsi, le titre en anticorps neutralisants anti-EBV totaux retrouvé chez le patient 2 pourrait peut-être s'expliquer, en partie, par la présence d'anticorps anti-gB en quantité importante.

Compte-tenu de la faible quantité d'échantillons analysés, les résultats de ces tests statistiques (analysés grâce au logiciel R) sont à interpréter avec précaution car ils correspondent davantage à des tendances. Pour confirmer ces tendances, il nous faudrait reproduire ces résultats plusieurs fois.

4. Discussion

Les données récentes de la littérature sur la glycoprotéine gB suggèrent son rôle comme cible de la neutralisation par les anticorps, chez l'animal. Cependant, la réponse humorale anti-gB reste encore mal explorée chez l'homme.

Jusqu'à présent, les rares études qui ont cherché à isoler des anticorps monoclonaux neutralisants anti-gB ont utilisé des formes solubles de gB, comme appâts de cellules B mémoires humaines spécifiques de gB (productrices d'anticorps anti-gB) (66). De cette manière, l'équipe de Snijder *et al.* a identifié des anticorps monoclonaux (AMMO2, 3, 4 et 5) d'origine humaine ciblant spécifiquement la gB. Parmi ces anticorps anti-gB, seul l'AMMO5 était neutralisant en inhibant l'entrée du virus mais uniquement dans les cellules épithéliales.

Ces formes solubles de gB, composées uniquement de l'ectodomaine recombinant de gB, sont plus faciles à utiliser pour ce type d'expérience. Cependant, le retrait du domaine transmembranaire de gB et de son CTD, provoque spontanément l'adoption par la gB soluble, d'une forme post-fusionnelle. À cette forme, risquent de se lier des anticorps anti-gB, qui pour la plupart seraient non neutralisants.

Notre étude a consisté à développer des outils pour permettre d'explorer la réponse anticorps neutralisante anti-gB, chez l'homme séropositif pour EBV. Pour cela, nous avons exprimé la gB à la surface de cellules HEK pour la maintenir dans une conformation pré-fusionnelle qui semble plus intéressante à utiliser pour isoler des anticorps neutralisants anti-gB (66). La gB native étant faiblement exprimée à la surface cellulaire, nous avons construit des mutants de gB en nous basant sur les travaux de Garcia *et al.* (89).

Cette équipe a élaboré une collection de mutants de gB, tronqués à différents niveaux de leur CTD, par l'insertion d'un codon-stop et les a ensuite transfectés dans des cellules CHO-K1, co-exprimant gH/gL plus ou moins gp42. Ils ont réussi à démontrer l'importance du CTD, à la fois dans la localisation et l'expression cellulaire de gB mais aussi dans sa capacité à fusionner avec les cellules cibles (89).

En marquant les cellules transfectées avec l'anticorps CL55 [anticorps monoclonal anti-gB non neutralisant et d'origine murine (28)], cette équipe a montré que les mutants de gB fortement tronqués dans leur CTD comme le gB₇₈₁, étaient considérablement plus exprimés à la surface cellulaire que la gB sauvage. Les autres mutants dont la taille du CTD se rapproche des 857 résidus de gB_{WT}, restaient tout de même mieux exprimés que la gB native (**Figure 21**).

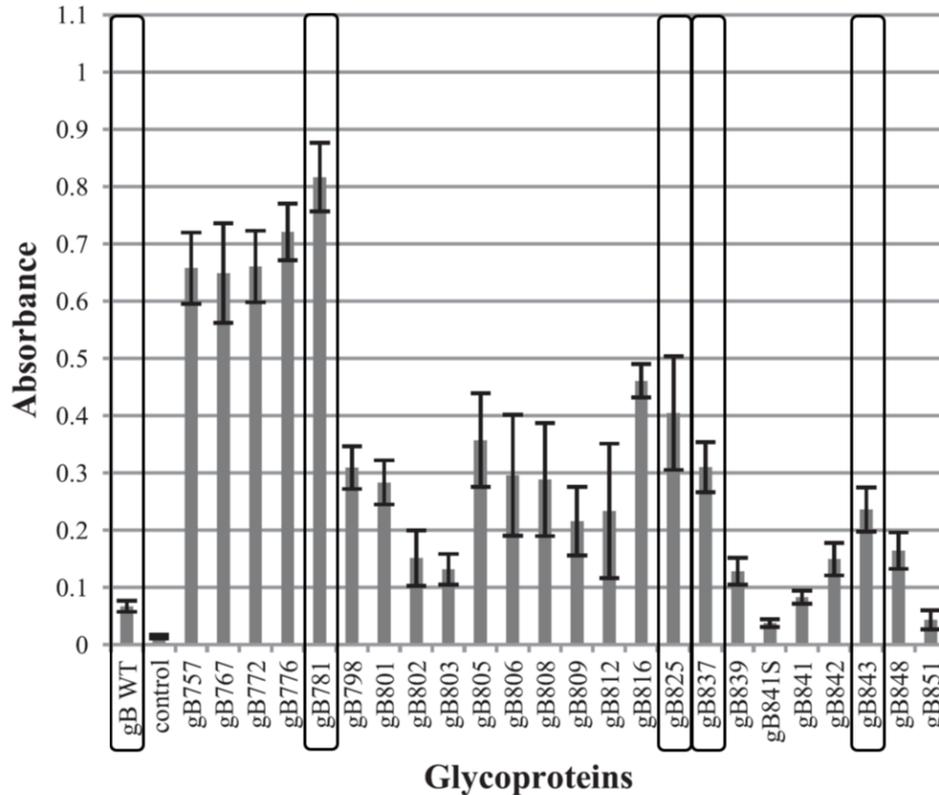


Figure 21 : Expression de gB_{WT} et des mutants de gB d'après Garcia *et al.* (89).

Les valeurs d'absorbance ont été obtenues par ELISA cellulaire (cell Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Les barres d'erreur indiquent l'écart-type standard. Seules les constructions réalisées dans notre étude ont été encadrées : gB_{WT}, gB₇₈₁, gB₈₂₅, gB₈₃₇ et gB₈₄₃.

Jusqu'à présent, les publications utilisaient l'anticorps CL55 pour quantifier l'expression des mutants de gB à la surface des cellules (29). Le profil d'expression des mutants gB₇₈₁, gB₈₂₅, gB₈₃₇ et gB₈₄₃, obtenu dans notre étude avec l'anticorps 5B2 (**Figure 14**) ou avec les sérums 2 et 3 (**Figure 16**), était similaire aux résultats de Garcia *et al.*, obtenus avec le CL55 (**Figure 21**). Avec d'autres outils que l'anticorps CL55, nous arrivons donc à confirmer les données de la littérature concernant la faible expression de la gB sauvage à la surface des cellules (83), ainsi que les résultats de Garcia *et al.*, sur la forte expression du mutant gB₇₈₁ par rapport à la gB_{WT} et aux autres mutants de gB (89). Ces résultats pourraient suggérer que l'anticorps 5B2 présente des caractéristiques de fixation communes

avec le CL55 et que ces caractéristiques sont plus ou moins similaires aux anticorps naturellement produits chez l'homme lors de l'infection par l'EBV.

D'autre part, nous avons observé que l'expression cellulaire élevée des mutants gB₇₈₁ et gB₈₂₅ permettait de différencier le taux (et/ou l'affinité) des anticorps anti-gB au sein des sérums de patients EBV +, contrairement aux mutants gB₈₃₇ et gB₈₄₃ (plus modérément exprimés). Nous avons ainsi montré que le sérum 2 avait plus d'anticorps anti-gB (et/ou de meilleure affinité) que les sérums des trois autres patients EBV +. Il est intéressant de noter que le sérum 2 avait également les taux d'IgG anti-VCA et d'anticorps anti-EBV neutralisants totaux les plus élevés.

Avec les sérums 1, 2 et 3, nous avons pu établir un lien entre le taux d'IgG anti-VCA et le taux des anticorps anti-gB et avons montré une corrélation entre la DI50 et les taux d'IgG anti-VCA et d'IgG anti-gB (construction gB₈₂₅). Nous pouvons ainsi supposer que le fort pouvoir neutralisant du sérum 2 soit dû, au moins en partie, à son taux élevé d'anticorps anti-gB neutralisants.

Cependant, l'impact des anticorps anti-gB sur le pouvoir de neutralisation d'un sérum est à modérer au vu des résultats de l'étude de Bu *et al.* en 2019. En effet, cette équipe a quantifié, par une technique de déplétion d'anticorps sur plasma humain, la contribution des différents anticorps anti-glycoprotéines d'EBV à neutraliser l'infection virale des cellules B et épithéliales. Ils ont montré que les anticorps anti-gp350 représentaient 50 à 60% de l'activité neutralisante de l'infection des cellules B alors que les anticorps anti-gH/gL et anti-gp42 ne représentaient que 20% et 15% de cette activité, respectivement. Les 10% restants pourraient donc correspondre à l'action des anticorps anti-gB. Malgré leur rôle modeste de neutralisation de l'infection des cellules B, les anticorps anti-gH/gL

représentent près de 75% de l'activité neutralisante des cellules épithéliales. Les anticorps anti-gp350 et anti-gp42 ont une activité neutralisante presque inexistante sur ce type cellulaire. Les 25% restants seraient donc dus à l'action neutralisante des anticorps dirigés contre la gB et la protéine BMRF2 (69). Ainsi, d'après cette étude, la glycoprotéine gB est à l'origine d'une réaction humorale qui semble peu contribuer à l'activité neutralisante totale des anticorps anti-EBV. Elle reste cependant une glycoprotéine essentielle à étudier comme cible additionnelle, alternative ou synergique aux sous-unités vaccinales décrites dans la partie bibliographique, pour le succès d'un vaccin prophylactique anti-EBV.

Parmi toutes les glycoprotéines d'enveloppe des herpesvirus, gB est la plus conservée (29). Si la structure pré-fusionnelle de la glycoprotéine gB d'EBV reste à ce jour inconnue, l'ensemble des connaissances déjà établies sur la gB des autres herpesvirus, pourraient nous aider à mieux comprendre sa structure et sa fonction encore trop peu étudiées pour l'EBV.

La gB du Cytomégalovirus (CMV) qui comprend 906 acides-aminés, partage 30,2% d'identité avec la gB d'EBV et possède 18 sites potentiels de N-glycosylation et cinq domaines antigéniques (AD-1 à 5). L'équipe de Chandramouli *et al.*, a montré que la plupart des anticorps anti-CMV dirigés contre l'ectodomaine soluble de gB, ciblent un domaine faiblement glycosylé nommé AD-1 (ou D-IV) et sont non-neutralisants. AD-4 et AD-5, qui correspondent respectivement aux domaines D-II et D-I, sont entourés par sept sites de N-glycosylation et représentent ainsi les domaines les plus fortement glycosylés de la gB du CMV. Si les anticorps dirigés contre AD-4 et AD-5 sont rares comparés aux anticorps anti-AD-1, ils sont en revanche tous neutralisants. En accentuant l'encombrement stérique, les

carbohydrates serviraient de camouflage permettant aux sites fonctionnels fortement N-glycosylés comme AD-4 et AD-5, d'échapper au système immunitaire. L'exposition limitée de ces épitopes expliquerait la rareté des anticorps neutralisants anti-AD-4 et 5. À l'inverse, en tant que domaine faiblement glycosylé, AD-1 (D-IV) est rendu accessible au système immunitaire qui produit une grande quantité d'anticorps anti-AD-1 qui, pour la plupart, sont non-neutralisants. Une autre hypothèse consiste à penser que les domaines AD-4 et AD-5, seraient des régions principalement exposées dans l'état pré-fusionnel de gB, permettant d'expliquer la capacité neutralisante des anticorps anti-AD-4 et 5. En revanche, en tant qu'épitope accessible uniquement à l'état post-fusionnel, AD-1 serait alors la cible d'anticorps non-neutralisants. Enfin, l'analyse structurale de la gB du CMV a démontré que la plupart de ses épitopes sont communs avec la gB du Virus Herpès Simplex 1 (HSV-1), ce qui suggère un rôle conservé des sites fonctionnels de gB au sein des herpesvirus (91). La gB d'HSV-1 qui comprend 904 acides-aminés possède cinq sites potentiels de N-glycosylation et présente 29% de séquences identiques et 43% de séquences similaires avec la gB de l'EBV. En partageant des structures post-fusionnelles similaires, la gB des herpesvirus, la glycoprotéine G du Virus de la Stomatite Vésiculaire (VSV) et la gp64 du Baculovirus, forment ensemble, la classe III des protéines virales de fusion (92).

5. Perspectives

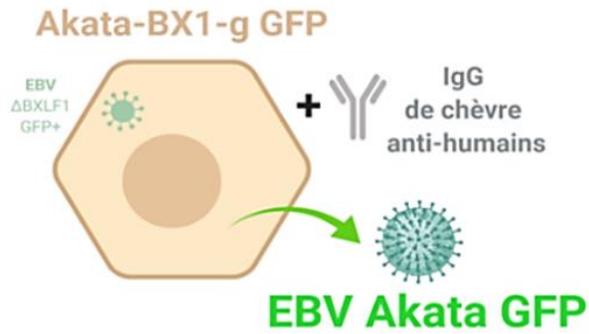
Les résultats de notre étude sont encourageants même s'ils sont à interpréter avec précaution compte tenu de la faible quantité d'échantillons analysés.

Pour confirmer nos observations et aller plus loin dans l'analyse des anticorps neutralisants anti-gB, plusieurs projets sont envisagés à plus ou moins long terme. Il est établi que l'EBV a un tropisme lymphocytaire et épithélial et que les deux types cellulaires sont infectés lors de la primo-infection (66). Il serait ainsi judicieux d'étudier le rôle neutralisant des anticorps anti-gB sur deux modèles cellulaires : les cellules B et les cellules épithéliales.

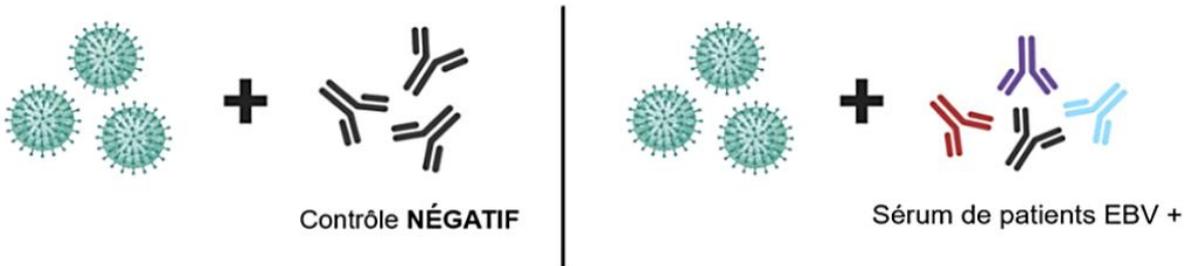
Le test de neutralisation décrit dans ce travail a été mis au point dans notre laboratoire avec le virus EBV B95-8F pour les cellules B Raji, comme décrit par Sashihara *et al.* en 2009 (88). Un objectif à court terme serait donc de développer un test de neutralisation avec les cellules épithéliales, pour comparer les titres d'anticorps neutralisants anti-EBV des sérums obtenus avec chacun des modèles cellulaires.

La lignée cellulaire Akata-BX1-g GFP sera utilisée pour produire des virus EBV d'affinité particulière pour les cellules épithéliales. Cette lignée contient un virus EBV (souche Akata) délété du gène BXL1 (codant pour la thymidine kinase) et remplacé par le gène de la GFP. Des IgG de chèvre anti-humains permettront d'activer la production virale du virus EBV Akata GFP (93). Le virus ainsi produit, sera utilisé pour l'infection des cellules SVKCR2 qui sont des cellules épithéliales de peau, adhérentes, transformées avec le Virus Simian 40 (SV40) et transfectées avec le CR2 (**Figure 22**). Ce modèle épithélial permettra d'évaluer la capacité des sérums de patients, à neutraliser l'infection des cellules épithéliales.

1/ Production de virus EBV B95-8F :



2/ Incubation des virus EBV B95-8F avec les sérums à tester :



3/ Infection des cellules SVKCR2 :

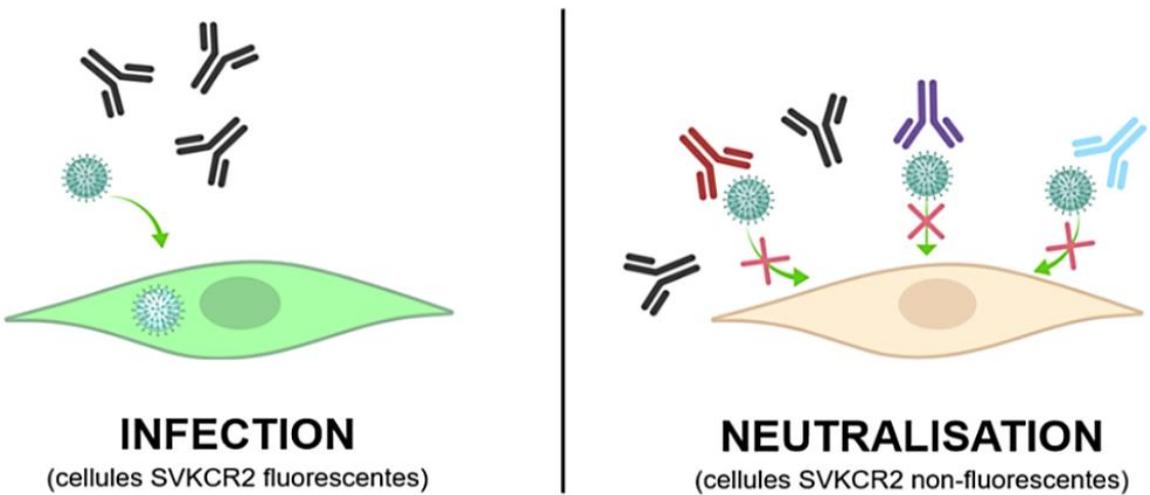


Figure 22 : Test de neutralisation de l'infection par EBV des cellules épithéliales, par le sérum de patients.

Contrôle négatif = sérum de patient séronégatif pour l'EBV ; EBV + = séropositif pour l'EBV ; SVKCR2 = cellules épithéliales de peau transformées avec le Virus Simian 40 (SV40) et transfectées avec le récepteur du complément de type 2 (CR2).

La contribution relative des anticorps anti-gB, dans la neutralisation d'EBV a été abordée au cours de ce travail mais n'a pas encore été clairement étudiée dans des sérums de patients séropositifs pour l'EBV. Bu *et al.* estiment que les anticorps anti-gB pourraient représenter environ 10% de la neutralisation totale observée pour les cellules B et moins de 20% pour les cellules épithéliales (69). Ainsi, il est probable que les titres élevés d'anticorps neutralisants, retrouvés dans les sérums (ou les médicaments) qui présentent un fort taux d'IgG anti-VCA, soient majoritairement liés à la présence des anticorps anti-EBV autres que les IgG anti-gB. Un objectif à moyen terme serait donc de démontrer l'implication réelle des anticorps anti-gB dans la neutralisation.

En se basant sur leurs travaux et grâce aux mutants que nous avons produits, nous aimerions dépleteder en anticorps anti-gB, les sérums de patients qui présentent des taux élevés d'anti-gB, pour évaluer leur contribution à neutraliser l'infection virale des cellules B et épithéliales.

Pour cela, les cellules HEK 293T exprimant soit gB₇₈₁, gB₈₂₅, gB₈₃₇ ou gB₈₄₃, seront incubées en excès avec les sérums sélectionnés pour les dépleteder en anti-gB (capture des anticorps par les cellules). Pour confirmer le succès de la déplétion en anti-gB, le sérum dépletede sera analysé en immunofluorescence cellulaire et comparé au sérum non dépletede. Les titres en anticorps neutralisants anti-EBV des sérums dépletedes et non dépletedes seront ensuite évalués (**Figure 23**). La réalisation et la comparaison des dépletedions avec les différents mutants de gB pourrait aider à mieux comprendre le rôle des anticorps neutralisants dirigés contre gB et à renforcer les connaissances concernant la gB de l'EBV.

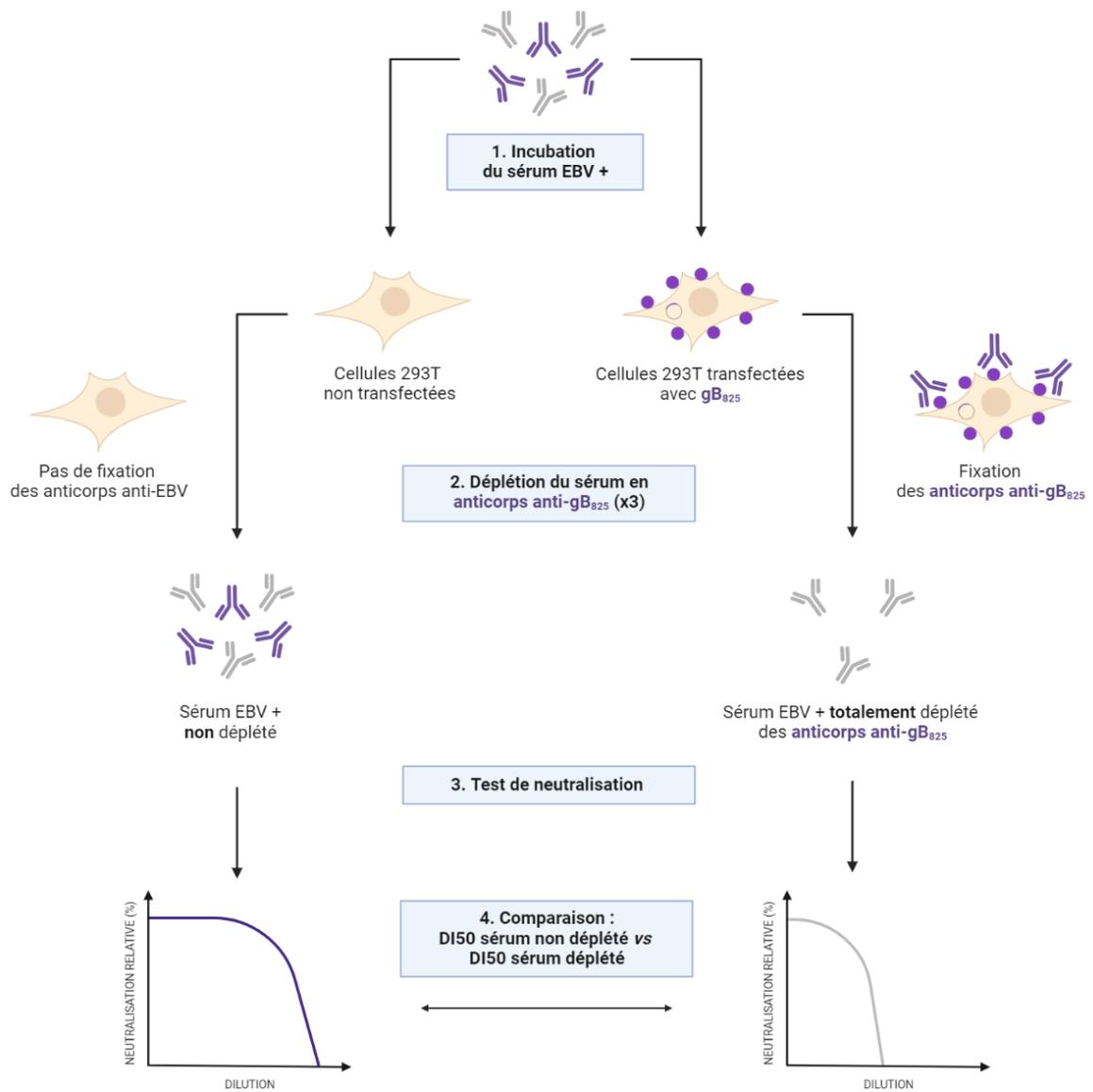


Figure 23 : Expérience de déplétion d'un sérum de patient séropositif pour l'EBV (EBV +), en anticorps anti-gB (exemple de gB₈₂₅).

Un objectif à plus long terme, serait de sélectionner des patients présentant des taux élevés d'anticorps neutralisants anti-gB afin de réaliser une séparation clonale de leur cellules B mémoires anti-gB par tri cellulaire en cytométrie de flux, en utilisant un antigène de choix comme un mutant gB exprimé en cellules HEK 293T par exemple.

Des PCR des chaînes lourdes et légères κ et λ seraient effectuées sur cellule unique pour permettre leur clonage dans un vecteur d'expression et leur séquençage. Afin de produire des anticorps monoclonaux anti-gB, les vecteurs d'expression des chaînes lourdes et légères seraient transfectés dans des cellules HEK 293T. Après des étapes de purification, les meilleurs anticorps monoclonaux neutralisants anti-gB, pourraient être sélectionnés sur la base de DI50 élevées, obtenues grâce aux tests de neutralisation en cellules B et épithéliales précédemment décrits. Ces tests permettraient également de les caractériser sur le plan fonctionnel. Ils pourraient aussi être caractérisés sur le plan structural en complexe avec gB, grâce à des analyses par cristallographie aux rayons X et par microscopie électronique afin d'identifier les épitopes clés impliqués dans la reconnaissance. Enfin, les épitopes viraux identifiés pourraient être produits et utilisés comme immunogènes pour entrer dans la composition d'un vaccin qui préviendrait les maladies associées à l'EBV (**Figure 24**).

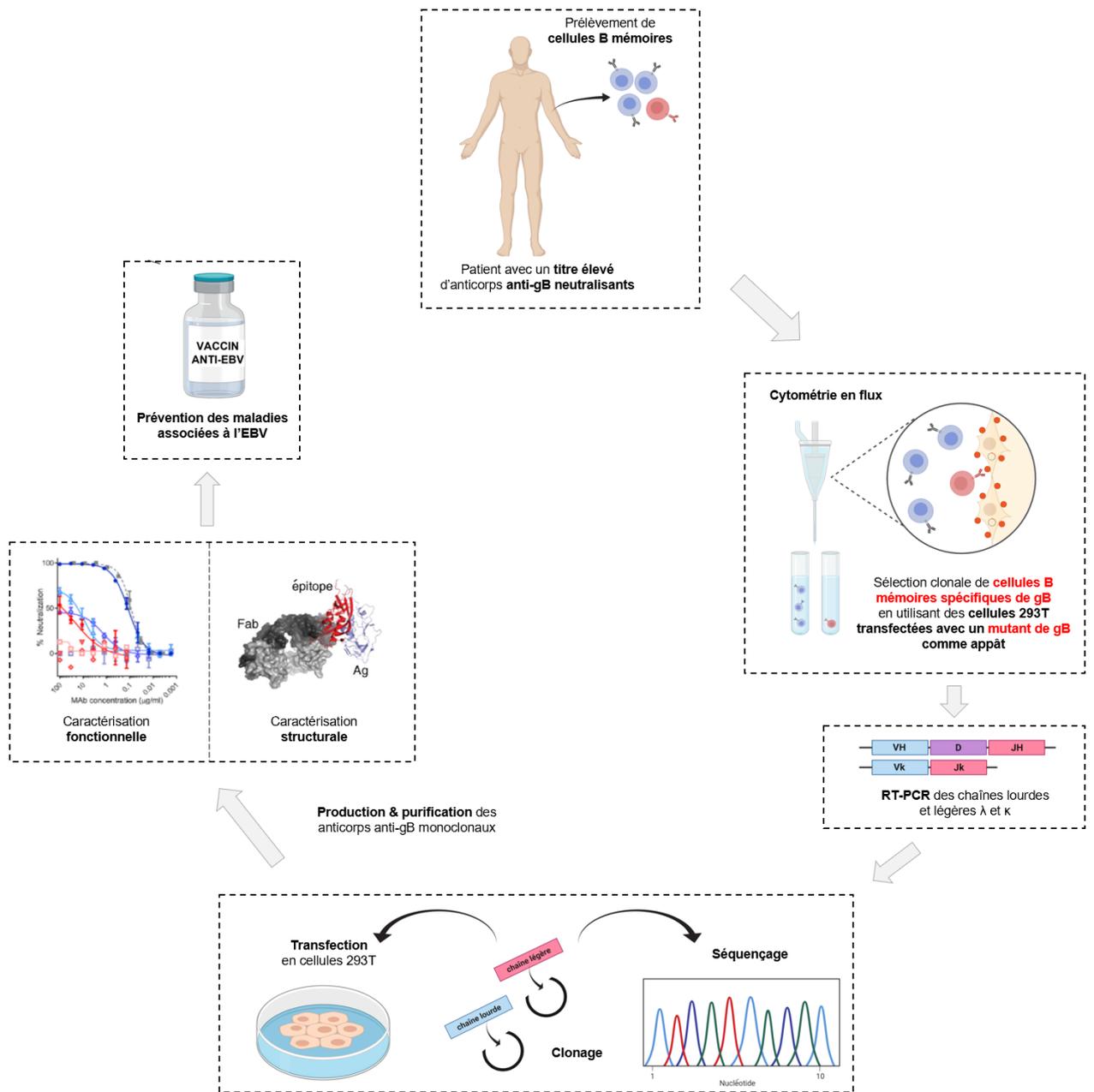


Figure 24 : Production d'anticorps monoclonaux anti-gB et caractérisation des épitopes cibles.



Main Targets of Interest for the Development of a Prophylactic or Therapeutic Epstein-Barr Virus Vaccine

Vincent Jean-Pierre¹, Julien Lupo¹, Marlyse Buisson^{1,2}, Patrice Morand¹ and Raphaële Germi^{1*}

¹ Laboratoire de Virologie, Institut de Biologie et de Pathologie, CHU de Grenoble Alpes, Grenoble, France, ² Institut de Biologie Structurale, UMR 5075, CEA, CNRS, Université Grenoble Alpes, Grenoble, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Jonatas Abrahao,
Federal University of Minas Gerais,
Brazil

Reviewed by:

Graciela Kunrath Lima,
Federal University of Minas Gerais,
Brazil
Marco Antonio Campos,
René Rachou Institute, Oswaldo Cruz
Foundation (Fiocruz), Brazil

*Correspondence:

Raphaële Germi
rgermi@chu-grenoble.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Virology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 28 April 2021

Accepted: 20 May 2021

Published: 22 June 2021

Citation:

Jean-Pierre V, Lupo J, Buisson M,
Morand P and Germi R (2021) Main
Targets of Interest
for the Development of a Prophylactic
or Therapeutic Epstein-Barr Virus
Vaccine. *Front. Microbiol.* 12:701611.
doi: 10.3389/fmicb.2021.701611

Epstein-Barr virus (EBV) is one of the most widespread viruses in the world; more than 90% of the planet's adult population is infected. Symptomatic primary infection by this *Herpesviridae* corresponds to infectious mononucleosis (IM), which is generally a benign disease. While virus persistence is often asymptomatic, it is responsible for 1.5% of cancers worldwide, mainly B cell lymphomas and carcinomas. EBV may also be associated with autoimmune and/or inflammatory diseases. However, no effective treatment or anti-EBV vaccine is currently available. Knowledge of the proteins and mechanisms involved in the different steps of the viral cycle is essential to the development of effective vaccines. The present review describes the main actors in the entry of the virus into B cells and epithelial cells, which are targets of interest in the development of prophylactic vaccines aimed at preventing viral infection. This review also summarizes the first vaccinal approaches tested in humans, all of which are based on the gp350/220 glycoprotein; while they have reduced the risk of IM, they have yet to prevent EBV infection. The main proteins involved in the EBV latency cycle and some of the proteins involved in the lytic cycle have essential roles in the oncogenesis of EBV. For that reason, these proteins are of interest for the development of therapeutic vaccines of which the objective is the stimulation of T cell immunity against EBV-associated cancers. New strategies aimed at broadening the antigenic spectrum, are currently being studied and will contribute to the targeting of the essential steps of the viral cycle, the objective being to prevent or treat the diseases associated with EBV.

Keywords: Epstein-Barr virus (human gammaherpesvirus 4), EBV-associated cancer, glycoproteins, infectious mononucleosis, latency, lytic cycle, prophylactic vaccine, therapeutic vaccine

Abbreviations: Ad5, type 5 adenovirus; CR2, complement receptor type 2; CTLD, C-type lectin domain; DC, dendritic cell; EBER, Epstein-Barr encoded small RNA; EBNA, Epstein-Barr nuclear antigen; EBV, Epstein-Barr virus; EphA2, ephrin receptor tyrosine kinase A2; FBN, fibronectin region; g. gp, glycoprotein; GLA/SE, glucopyranosyl lipid A-stable emulsion; HLA, human leukocyte antigen; IM, infectious mononucleosis; LBD, ligand binding domain; LMP, latent membrane protein; miRNA, microRNAs; MVA, modified vaccinia virus Ankara; NPC, nasopharyngeal carcinoma; NRP1, neuropilin 1; PTLD, post-transplant lymphoproliferative disease; VCA, viral capsid antigen; VLP, virus-like particle; VV, vaccinia virus.

THÈSE SOUTENUE PAR : Vincent JEAN-PIERRE

TITRE : PRINCIPALES CIBLES D'INTÉRÊT POUR LE DÉVELOPPEMENT D'UN VACCIN PROPHYLACTIQUE OU THÉRAPEUTIQUE CONTRE LE VIRUS D'EPSTEIN-BARR : FOCUS SUR LA GLYCOPROTÉINE GB

CONCLUSION :

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est l'un des virus les plus répandus dans le monde avec plus de 90% de la population adulte mondiale infectée. La primo-infection symptomatique par cet *Herpesviridae* correspond à la mononucléose infectieuse (MNI), qui est généralement une maladie bénigne. La persistance du virus est souvent asymptomatique mais elle est aussi responsable de 1,5% des cancers dans le monde qui sont principalement des lymphomes B et des carcinomes. L'EBV pourrait aussi être associé à des maladies auto-immunes et/ou inflammatoires. Pourtant, aucun traitement efficace ni vaccin anti-EBV ne sont disponibles. La connaissance des protéines et mécanismes impliqués dans les différentes étapes du cycle viral est essentielle pour le développement de vaccins efficaces.

Ce travail décrit les principales protéines impliquées dans l'entrée du virus dans les cellules B et les cellules épithéliales qui sont des cibles d'intérêt pour le développement de vaccins prophylactiques visant à prévenir l'infection virale. Il résume également les premières approches vaccinales testées chez l'homme, toutes basées sur la glycoprotéine gp350/220 et qui sont parvenues à réduire le risque de MNI sans prévenir l'infection à EBV.

Cette étude décrit aussi les protéines impliquées dans le cycle de latence de l'EBV et certaines des protéines du cycle lytique qui jouent un rôle essentiel dans l'oncogenèse de l'EBV. À ce titre, ces protéines présentent un intérêt pour le développement des vaccins thérapeutiques dont l'objectif est la stimulation de l'immunité cellulaire T contre les cancers associés à l'EBV.

Notre étude s'est focalisée sur la glycoprotéine gB de l'EBV, protéine de fusion encore peu étudiée qui est pourtant essentielle à l'entrée du virus dans les cellules. Les quatre mutants de gB produits dans notre étude présentent, comme dans la publication originale de Garcia *et al.*, des taux d'expression distincts à la surface des cellules, mais tous supérieurs (ou similaires pour gB₈₄₃) à ceux de la gB_{WT}.

Par ailleurs, le système d'expression de gB que nous avons mis au point a permis *i)* de confirmer la présence d'anticorps anti-gB dans les sérums de patients séropositifs pour l'EBV et *ii)* de différencier le taux (et/ou l'affinité) des anticorps anti-gB au sein de ces sérums, grâce aux constructions gB₇₈₁ et gB₈₂₅ dont l'expression cellulaire est élevée.

Nous avons montré, avec la construction gB₈₂₅, que plus un sérum présentait un taux élevé d'IgG anti-gB, plus sa DI50 était élevée ($p\text{-value} = 0,048$; coefficient de corrélation $r = 0,997$). Nous avons aussi montré que plus un sérum (ou un médicament de type IgIV) présentait un taux élevé d'IgG anti-VCA avec les tests sérologiques de routine, plus sa DI50 (et donc son titre en anticorps neutralisants) était élevée ($p\text{-value} = 0,017$; coefficient de corrélation $R = 0,943$).

Ainsi les résultats préliminaires de notre étude suggèrent que les anticorps anti-gB présents dans les sérums sélectionnés pourraient en partie être responsables de l'activité neutralisante. Pour confirmer cette hypothèse, il nous faudrait prouver que la DI50 d'un sérum entièrement déplété de ses anticorps anti-gB, est significativement plus faible que la DI50 d'un sérum non déplété.

Les outils présentés dans ce travail pourront être exploités dans le futur pour isoler des anticorps monoclonaux anti-gB neutralisants et identifier leurs épitopes afin de les utiliser comme cible additionnelle, alternative ou synergique à d'autres sous-unités vaccinales, pour aboutir au succès d'un vaccin prophylactique anti-EBV.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le : 17/09/2021

LE DOYEN



Michel SEVE

LE DIRECTEUR DE THESE :



LE TUTEUR UNIVERSITAIRE :



RÉFÉRENCES

1. Mui UN, Haley CT, Vangipuram R, Tyring SK. Human oncoviruses: Mucocutaneous manifestations, pathogenesis, therapeutics, and prevention. *J Am Acad Dermatol.* juill 2019;81(1):23-41.
2. Niederman JC, Evans AS. Epstein-Barr virus. In: *Viral Infections of Humans: Epidemiology and Control.* 4th Edn. New York: NY: Plenum Medical Book Co.; 1997. p. 253-83.
3. Cohen JI. Epstein–barr virus vaccines. *Clin Transl Immunol.* 23 janv 2015;4(1):e32.
4. Dasari V, Bhatt KH, Smith C, Khanna R. Designing an effective vaccine to prevent Epstein-Barr virus-associated diseases: challenges and opportunities. *Expert Rev Vaccines.* 3 avr 2017;16(4):377-90.
5. Niedobitek G. The Epstein-Barr virus: a group 1 carcinogen? *Virchows Arch.* 6 août 1999;435(2):79-86.
6. Shannon-Lowe C, Rickinson AB, Bell AI. Epstein–Barr virus-associated lymphomas. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 19 oct 2017;372(1732):20160271.
7. Dasari V, Sinha D, Neller MA, Smith C, Khanna R. Prophylactic and therapeutic strategies for Epstein–Barr virus-associated diseases: emerging strategies for clinical development. *Expert Rev Vaccines.* 4 mai 2019;18(5):457-74.
8. Brooks JM, Long HM, Tierney RJ, Shannon-Lowe C, Leese AM, Fitzpatrick M, et al. Early T Cell Recognition of B Cells following Epstein-Barr Virus Infection: Identifying Potential Targets for Prophylactic Vaccination. *Gottschalk S, éditeur. PLOS Pathog.* 20 avr 2016;12(4):e1005549.
9. Holmes D. The cancer-virus cures. *Nat Med.* juin 2014;20(6):571-4.
10. Khan G, Fitzmaurice C, Naghavi M, Ahmed LA. Global and regional incidence, mortality and disability-adjusted life-years for Epstein-Barr virus-attributable malignancies, 1990–2017. *BMJ Open.* août 2020;10(8):e037505.
11. Levin LI, Munger KL, O’Reilly EJ, Falk KI, Ascherio A. Primary infection with the Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2010;NA-NA.
12. Ascherio A, Munger KL. EBV and Autoimmunity. In: Münz C, éditeur. *Epstein Barr Virus Volume 1* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2015 [cité 2 déc 2020]. p. 365-85. (Current Topics in Microbiology and Immunology; vol. 390). Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-22822-8_15
13. Balandraud N, Roudier J. Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine.* mars 2018;85(2):165-70.
14. Sorgato CC, Lins-e-Silva M, Leão JC, Vasconcelos LR, Romão TP, Duarte AL, et al. EBV and CMV viral load in rheumatoid arthritis and their role in associated Sjögren’s syndrome. *J Oral Pathol Med.* août 2020;49(7):693-700.
15. Pei Y, Wong JHY, Robertson ES. Targeted Therapies for Epstein-Barr Virus-Associated Lymphomas. *Cancers.* 9 sept 2020;12(9):2565.
16. Tangye SG, Palendira U, Edwards ESJ. Human immunity against EBV—lessons from the clinic. *J Exp Med.* 1 févr 2017;214(2):269-83.
17. Connolly SA, Jackson JO, Jardetzky TS, Longnecker R. Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. *Nat Rev Microbiol.* mai 2011;9(5):369-81.
18. Miller N, Hutt-Fletcher LM. Epstein-Barr virus enters B cells and epithelial cells by different routes. *J Virol.* 1992;66(6):3409-14.

19. Heldwein EE. gH/gL supercomplexes at early stages of herpesvirus entry. *Curr Opin Virol.* juin 2016;18:1-8.
20. Matsuura H, Kirschner AN, Longnecker R, Jardetzky TS. Crystal structure of the Epstein-Barr virus (EBV) glycoprotein H/glycoprotein L (gH/gL) complex. *Proc Natl Acad Sci.* 28 déc 2010;107(52):22641-6.
21. Möhl BS, Chen J, Longnecker R. Gammaherpesvirus entry and fusion: A tale how two human pathogenic viruses enter their host cells. In: *Advances in Virus Research* [Internet]. Elsevier; 2019 [cité 27 avr 2020]. p. 313-43. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065352719300168>
22. Kirschner AN, Sorem J, Longnecker R, Jardetzky TS. Structure of Epstein-Barr Virus Glycoprotein 42 Suggests a Mechanism for Triggering Receptor-Activated Virus Entry. *Structure.* févr 2009;17(2):223-33.
23. Sathiyamoorthy K, Jiang J, Hu YX, Rowe CL, Möhl BS, Chen J, et al. Assembly and Architecture of the EBV B Cell Entry Triggering Complex. Hutt-Fletcher L, éditeur. *PLoS Pathog.* 21 août 2014;10(8):e1004309.
24. Mohl, Britta S., Chen, Jia, Sathiyamoorthy, Karthik, Jardetzky, Theodore S., Longnecker, Richard. Structural and Mechanistic Insights into the Tropism of Epstein-Barr Virus. *Mol Cells.* 30 avr 2016;39(4):286-91.
25. Möhl BS, Chen J, Park SJ, Jardetzky TS, Longnecker R. Epstein-Barr Virus Fusion with Epithelial Cells Triggered by gB Is Restricted by a gL Glycosylation Site. Sandri-Goldin RM, éditeur. *J Virol.* 1 déc 2017;91(23):e01255-17, e01255-17.
26. Chen J, Longnecker R. Epithelial cell infection by Epstein-Barr virus. *FEMS Microbiol Rev.* 4 oct 2019;fuz023.
27. Gore M, Hutt-Fletcher LM. The BDLF2 protein of Epstein-Barr virus is a type II glycosylated envelope protein whose processing is dependent on coexpression with the BMRF2 protein. *Virology.* janv 2009;383(1):162-7.
28. Chesnokova LS, Hutt-Fletcher LM. Fusion of Epstein-Barr virus with epithelial cells can be triggered by $\alpha v \beta 5$ in addition to $\alpha v \beta 6$ and $\alpha v \beta 8$, and integrin binding triggers a conformational change in glycoproteins gHgL. *J Virol.* déc 2011;85(24):13214-23.
29. Chen J, Zhang X, Jardetzky TS, Longnecker R. The Epstein-Barr virus (EBV) glycoprotein B cytoplasmic C-terminal tail domain regulates the energy requirement for EBV-induced membrane fusion. *J Virol.* oct 2014;88(20):11686-95.
30. Chen J, Sathiyamoorthy K, Zhang X, Schaller S, Perez White BE, Jardetzky TS, et al. Ephrin receptor A2 is a functional entry receptor for Epstein-Barr virus. *Nat Microbiol.* févr 2018;3(2):172-80.
31. Wang H-B, Zhang H, Zhang J-P, Li Y, Zhao B, Feng G-K, et al. Neuropilin 1 is an entry factor that promotes EBV infection of nasopharyngeal epithelial cells. *Nat Commun.* mai 2015;6(1):6240.
32. Sathiyamoorthy K, Hu YX, Möhl BS, Chen J, Longnecker R, Jardetzky TS. Structural basis for Epstein-Barr virus host cell tropism mediated by gp42 and gHgL entry glycoproteins. *Nat Commun.* déc 2016;7(1):13557.
33. Johannsen E, Luftig M, Chase MR, Weicksel S, Cahir-McFarland E, Illanes D, et al. Proteins of purified Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci.* 16 nov 2004;101(46):16286-91.
34. Lake CM, Hutt-Fletcher LM. Epstein-Barr Virus That Lacks Glycoprotein gN Is Impaired in Assembly and Infection. *J Virol.* 1 déc 2000;74(23):11162-72.

35. Chesnokova LS, Valencia SM, Hutt-Fletcher LM. The BDLF3 gene product of Epstein-Barr virus , gp150, mediates non-productive binding to heparan sulfate on epithelial cells and only the binding domain of CD21 is required for infection. *Virology*. juill 2016;494:23-8.
36. Mackett M, Conway MJ, Arrand JR, Haddad RS, Hutt-Fletcher LM. Characterization and expression of a glycoprotein encoded by the Epstein-Barr virus BamHI I fragment. *J Virol*. 1990;64(6):2545-52.
37. Cohen JI, Fauci AS, Varmus H, Nabel GJ. Epstein-Barr virus: an important vaccine target for cancer prevention. *Sci Transl Med*. 2 nov 2011;3(107):107fs7.
38. Gu SY, Huang TM, Ruan L, Miao YH, Lu H, Chu CM, et al. First EBV vaccine trial in humans using recombinant vaccinia virus expressing the major membrane antigen. *Dev Biol Stand*. 1995;84:171-7.
39. Moutschen M, Léonard P, Sokal EM, Smets F, Haumont M, Mazzu P, et al. Phase I/II studies to evaluate safety and immunogenicity of a recombinant gp350 Epstein–Barr virus vaccine in healthy adults. *Vaccine*. juin 2007;25(24):4697-705.
40. Sokal EM, Hoppenbrouwers K, Vandermeulen C, Moutschen M, Léonard P, Moreels A, et al. Recombinant gp350 vaccine for infectious mononucleosis: a phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled trial to evaluate the safety, immunogenicity, and efficacy of an Epstein-Barr virus vaccine in healthy young adults. *J Infect Dis*. 15 déc 2007;196(12):1749-53.
41. Rees L, Tizard EJ, Morgan AJ, Cubitt WD, Finerty S, Oyewole-Eletu TA, et al. A Phase I Trial of Epstein-Barr Virus Gp350 Vaccine for Children With Chronic Kidney Disease Awaiting Transplantation: Transplantation. oct 2009;88(8):1025-9.
42. Iizasa H, Kim H, Kartika AV, Kanehiro Y, Yoshiyama H. Role of Viral and Host microRNAs in Immune Regulation of Epstein-Barr Virus-Associated Diseases. *Front Immunol*. 3 mars 2020;11:367.
43. Andrei G, Trompet E, Snoeck R. Novel Therapeutics for Epstein–Barr Virus. *Molecules*. 12 mars 2019;24(5):997.
44. Münz C. Latency and lytic replication in Epstein–Barr virus-associated oncogenesis. *Nat Rev Microbiol*. nov 2019;17(11):691-700.
45. Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr Virus. In: *Fields Virology*. 6th Edn. New York: NY: Lippincott, Williams and Wilkins; 2013. p. 655-700.
46. Lupo J, Epaulard O, Morand P, Germi R. Le virus d'Epstein-Barr. In: *Traité de Virologie Médicale*. 2nd Edn. Paris: Société Française de Microbiologie; 2019. p. 225-37.
47. Kenney SC, Mertz JE. Regulation of the latent-lytic switch in Epstein–Barr virus. *Semin Cancer Biol*. juin 2014;26:60-8.
48. Cohen JI. Vaccine Development for Epstein-Barr Virus. In: Kawaguchi Y, Mori Y, Kimura H, éditeurs. *Human Herpesviruses [Internet]*. Singapore: Springer Singapore; 2018 [cité 16 janv 2021]. p. 477-93. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 1045). Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-7230-7_22
49. Münz C. Redirecting T Cells against Epstein–Barr Virus Infection and Associated Oncogenesis. *Cells*. 4 juin 2020;9(6):1400.
50. Ma S-D, Hegde S, Young KH, Sullivan R, Rajesh D, Zhou Y, et al. A New Model of Epstein-Barr Virus Infection Reveals an Important Role for Early Lytic Viral Protein Expression in the Development of Lymphomas. *J Virol*. 1 janv 2011;85(1):165-77.
51. Straathof KCM, Bollard CM, Popat U, Huls MH, Lopez T, Morriss MC, et al. Treatment of nasopharyngeal carcinoma with Epstein-Barr virus–specific T lymphocytes. *Blood*. 1 mars 2005;105(5):1898-904.

52. Lin C-L, Lo W-F, Lee T-H, Ren Y, Hwang S-L, Cheng Y-F, et al. Immunization with Epstein-Barr Virus (EBV) Peptide-pulsed Dendritic Cells Induces Functional CD8⁺ T-Cell Immunity and May Lead to Tumor Regression in Patients with EBV-positive Nasopharyngeal Carcinoma. :8.
53. Borovjagin AV, Gomez-Gutierrez JG, Shirwan H, Matthews QL. Adenovirus-Based Vectors for the Development of Prophylactic and Therapeutic Vaccines. In: Lukashevich IS, Shirwan H, éditeurs. *Novel Technologies for Vaccine Development* [Internet]. Vienna: Springer Vienna; 2014 [cité 16 janv 2021]. p. 203-71. Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-3-7091-1818-4_8
54. Si Y, Deng Z, Lan G, Du H, Wang Y, Si J, et al. The Safety and Immunological Effects of rAd5-EBV-LMP2 Vaccine in Nasopharyngeal Carcinoma Patients: A Phase I Clinical Trial and Two-Year Follow-Up. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2016;64(8):1118-23.
55. Taylor GS, Haigh TA, Gudgeon NH, Phelps RJ, Lee SP, Steven NM, et al. Dual Stimulation of Epstein-Barr Virus (EBV)-Specific CD4⁺ and CD8⁺-T-Cell Responses by a Chimeric Antigen Construct: Potential Therapeutic Vaccine for EBV-Positive Nasopharyngeal Carcinoma. *J Virol*. 15 janv 2004;78(2):768-78.
56. Hui EP, Taylor GS, Jia H, Ma BBY, Chan SL, Ho R, et al. Phase I Trial of Recombinant Modified Vaccinia Ankara Encoding Epstein-Barr Viral Tumor Antigens in Nasopharyngeal Carcinoma Patients. *Cancer Res*. 15 mars 2013;73(6):1676-88.
57. Taylor GS, Jia H, Harrington K, Lee LW, Turner J, Ladell K, et al. A Recombinant Modified Vaccinia Ankara Vaccine Encoding Epstein-Barr Virus (EBV) Target Antigens: A Phase I Trial in UK Patients with EBV-Positive Cancer. *Clin Cancer Res*. 1 oct 2014;20(19):5009-22.
58. Chia WK, Wang W-W, Teo M, Tai WM, Lim WT, Tan EH, et al. A phase II study evaluating the safety and efficacy of an adenovirus-ΔLMP1-LMP2 transduced dendritic cell vaccine in patients with advanced metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Ann Oncol*. avr 2012;23(4):997-1005.
59. Sathiyamoorthy K, Jiang J, Möhl BS, Chen J, Zhou ZH, Longnecker R, et al. Inhibition of EBV-mediated membrane fusion by anti-gHgL antibodies. *Proc Natl Acad Sci*. 10 oct 2017;114(41):E8703-10.
60. Cui X, Cao Z, Sen G, Chattopadhyay G, Fuller DH, Fuller JT, et al. A novel tetrameric gp3501–470 as a potential Epstein–Barr virus vaccine. *Vaccine*. juin 2013;31(30):3039-45.
61. Kanekiyo M, Bu W, Joyce MG, Meng G, Whittle JRR, Baxa U, et al. Rational Design of an Epstein-Barr Virus Vaccine Targeting the Receptor-Binding Site. *Cell*. août 2015;162(5):1090-100.
62. Zhao B, Zhang X, Krummenacher C, Song S, Gao L, Zhang H, et al. Immunization With Fc-Based Recombinant Epstein–Barr Virus gp350 Elicits Potent Neutralizing Humoral Immune Response in a BALB/c Mice Model. *Front Immunol*. 1 mai 2018;9:932.
63. Zhang X, Zhao B, Ding M, Song S, Kang Y, Yu Y, et al. A novel vaccine candidate based on chimeric virus-like particle displaying multiple conserved epitope peptides induced neutralizing antibodies against EBV infection. *Theranostics*. 2020;10(13):5704-18.
64. Kang Y-F, Zhang X, Yu X-H, Zheng Q, Liu Z, Li J-P, et al. Immunization with a Self-Assembled Nanoparticle Vaccine Elicits Potent Neutralizing Antibody Responses against EBV Infection. *Nano Lett*. 2021;11.
65. Heeke DS, Lin R, Rao E, Woo JC, McCarthy MP, Marshall JD. Identification of GLA/SE as an effective adjuvant for the induction of robust humoral and cell-mediated immune responses to EBV-gp350 in mice and rabbits. *Vaccine*. 17 mai 2016;34(23):2562-9.
66. Snijder J, Ortego MS, Weidle C, Stuart AB, Gray MD, McElrath MJ, et al. An Antibody Targeting the Fusion Machinery Neutralizes Dual-Tropic Infection and Defines a Site of Vulnerability on Epstein-Barr Virus. *Immunity*. 17 2018;48(4):799-811.e9.

67. Cui X, Cao Z, Chen Q, Arjunaraja S, Snow AL, Snapper CM. Rabbits immunized with Epstein-Barr virus gH/gL or gB recombinant proteins elicit higher serum virus neutralizing activity than gp350. *Vaccine*. juill 2016;34(34):4050-5.
68. Cui X, Cao Z, Ishikawa Y, Cui S, Imadome K-I, Snapper CM. Immunization with Epstein–Barr Virus Core Fusion Machinery Envelope Proteins Elicit High Titers of Neutralizing Activities and Protect Humanized Mice from Lethal Dose EBV Challenge. *Vaccines*. 19 mars 2021;9(3):285.
69. Bu W, Joyce MG, Nguyen H, Banh DV, Aguilar F, Tariq Z, et al. Immunization with Components of the Viral Fusion Apparatus Elicits Antibodies That Neutralize Epstein-Barr Virus in B Cells and Epithelial Cells. *Immunity*. mai 2019;50(5):1305-1316.e6.
70. Escalante GM, Foley J, Mutsunguma LZ, Rodriguez E, Mulama DH, Muniraju M, et al. A Pentavalent Epstein-Barr Virus-Like Particle Vaccine Elicits High Titers of Neutralizing Antibodies against Epstein-Barr Virus Infection in Immunized Rabbits. *Vaccines*. 6 avr 2020;8(2):169.
71. Elliott SL, Suhrbier A, Miles JJ, Lawrence G, Pye SJ, Le TT, et al. Phase I Trial of a CD8+ T-Cell Peptide Epitope-Based Vaccine for Infectious Mononucleosis. *J Virol*. 1 févr 2008;82(3):1448-57.
72. Perez EM, Foley J, Tison T, Silva R, Ogembo JG. Novel Epstein-Barr virus-like particles incorporating gH/gL-EBNA1 or gB-LMP2 induce high neutralizing antibody titers and EBV-specific T-cell responses in immunized mice. *Oncotarget*. 21 mars 2017;8(12):19255-73.
73. Pavlova S, Feederle R, Gartner K, Fuchs W, Granzow H, Delecluse H-J. An Epstein-Barr Virus Mutant Produces Immunogenic Defective Particles Devoid of Viral DNA. *J Virol*. 15 févr 2013;87(4):2011-22.
74. van Zyl DG, Tsai M-H, Shumilov A, Schneidt V, Poirey R, Schlehe B, et al. Immunogenic particles with a broad antigenic spectrum stimulate cytolytic T cells and offer increased protection against EBV infection ex vivo and in mice. *Khanna R, éditeur. PLOS Pathog*. 6 déc 2018;14(12):e1007464.
75. van Zyl DG, Mautner J, Delecluse H-J. Progress in EBV Vaccines. *Front Oncol*. 25 févr 2019;9:104.
76. Rühl J, Citterio C, Engelmann C, Haigh T, Dzionek A, Dreyer J, et al. Heterologous prime-boost vaccination protects against EBV antigen-expressing lymphomas. *J Clin Invest*. 15 avr 2019;129(5):2071-87.
77. Tang Y, Lu S, Gan X, Liu F, Zhang Y, Luo C, et al. Expression of LMP and EBNA genes in Epstein-Barr virus-associated lymphomas in Hu-PBL/SCID mice. *Oncol Rep*. févr 2016;35(2):905-11.
78. Hartlage AS, Liu T, Patton JT, Garman SL, Zhang X, Kurt H, et al. The Epstein–Barr Virus Lytic Protein BZLF1 as a Candidate Target Antigen for Vaccine Development. *Cancer Immunol Res*. juill 2015;3(7):787-94.
79. Balfour HH. Progress, prospects, and problems in Epstein-Barr virus vaccine development. *Curr Opin Virol*. juin 2014;6:1-5.
80. Walling DM, Brown AL, Etienne W, Keitel WA, Ling PD. Multiple Epstein-Barr Virus Infections in Healthy Individuals. *J Virol*. 1 juin 2003;77(11):6546-50.
81. Dunmire SK, Verghese PS, Balfour HH. Primary Epstein-Barr virus infection. *J Clin Virol*. mai 2018;102:84-92.
82. Rühl J, Leung CS, Münz C. Vaccination against the Epstein–Barr virus. *Cell Mol Life Sci [Internet]*. 4 mai 2020 [cité 24 oct 2020]; Disponible sur: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-020-03538-3>
83. Backovic M, Longnecker R, Jardetzky TS. Structure of a trimeric variant of the Epstein–Barr virus glycoprotein B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 24 févr 2009;106(8):2880-5.

84. Sorem J, Longnecker R. Cleavage of Epstein-Barr virus glycoprotein B is required for full function in cell-cell fusion with both epithelial and B cells. *J Gen Virol.* mars 2009;90(Pt 3):591-5.
85. Neuhierl B, Feederle R, Hammerschmidt W, Delecluse HJ. Glycoprotein gp110 of Epstein-Barr virus determines viral tropism and efficiency of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 12 nov 2002;99(23):15036-41.
86. Moxon et al. - 2019 - Editorial Reverse Vaccinology.pdf.
87. Delecluse HJ, Hilsendegen T, Pich D, Zeidler R, Hammerschmidt W. Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 7 juill 1998;95(14):8245-50.
88. Sashihara J, Burbelo PD, Savoldo B, Pierson TC, Cohen JI. Human antibody titers to Epstein-Barr Virus (EBV) gp350 correlate with neutralization of infectivity better than antibody titers to EBV gp42 using a rapid flow cytometry-based EBV neutralization assay. *Virology.* 1 sept 2009;391(2):249-56.
89. Garcia NJ, Chen J, Longnecker R. Modulation of Epstein-Barr virus glycoprotein B (gB) fusion activity by the gB cytoplasmic tail domain. *mBio.* 22 janv 2013;4(1):e00571-00512.
90. EVIDAL. In: Vidal. ISSY Les Moulineaux; 2005.
91. Chandramouli S, Ciferri C, Nikitin PA, Caló S, Gerrein R, Balabanis K, et al. Structure of HCMV glycoprotein B in the postfusion conformation bound to a neutralizing human antibody. *Nat Commun.* 14 sept 2015;6:8176.
92. Burke HG, Heldwein EE. Crystal Structure of the Human Cytomegalovirus Glycoprotein B. *PLoS Pathog.* oct 2015;11(10):e1005227.
93. Molesworth SJ, Lake CM, Borza CM, Turk SM, Hutt-Fletcher LM. Epstein-Barr Virus gH Is Essential for Penetration of B Cells but Also Plays a Role in Attachment of Virus to Epithelial Cells. *J Virol.* 15 juill 2000;74(14):6324-32.



Serment de Galien



« En présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples, je jure :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».

Vincent JEAN-PIERRE

PRINCIPALES CIBLES D'INTÉRÊT POUR LE DÉVELOPPEMENT D'UN VACCIN PROPHYLACTIQUE OU THÉRAPEUTIQUE CONTRE LE VIRUS D'EPSTEIN-BARR : FOCUS SUR LA GLYCOPROTÉINE GB

RÉSUMÉ :

La primo-infection symptomatique par le virus d'Epstein-Barr (EBV) correspond à la mononucléose infectieuse et 1,5% des cancers dans le monde seraient imputables à la persistance de ce virus. Cependant, aucun traitement efficace ou vaccin anti-EBV n'est actuellement disponible. La connaissance des protéines et des mécanismes impliqués dans les différentes étapes du cycle viral est essentielle pour le développement de vaccins efficaces.

Ce travail décrit les principales protéines impliquées dans l'entrée du virus dans les cellules B et les cellules épithéliales qui sont des cibles d'intérêt pour le développement de vaccins prophylactiques visant à prévenir l'infection virale. Il résume également le rôle des différentes protéines impliquées dans le cycle de latence et dans le cycle lytique de l'EBV, ces dernières présentant un intérêt pour le développement de vaccins thérapeutiques dont l'objectif est de stimuler l'immunité cellulaire T contre les cancers associés à l'EBV.

Notre étude expérimentale s'est focalisée sur la glycoprotéine gB, protéine de fusion encore peu étudiée qui est pourtant essentielle à l'entrée du virus dans les cellules. Afin d'explorer les réponses anticorps contre la gB dans sa forme pré-fusionnelle (cible de la neutralisation), nous avons construit des mutants de gB, décrits par Garcia *et al.* comme étant mieux exprimés à la surface des cellules que la gB sauvage (gB_{WT}). L'utilisation de l'anticorps anti-gB murin 5B2 (et de sérums humains séropositifs pour l'EBV) dans des expériences d'immunofluorescence cellulaire, a montré que le mutant gB₇₈₁ était plus fortement exprimé que la gB_{WT} et que les autres mutants de gB, comme montré par Garcia *et al.* avec un autre anticorps anti-gB commercial murin (CL55). Par ailleurs, nos résultats confirment la présence d'anticorps anti-gB dans les sérums de patients EBV + et dans des spécialités d'immunoglobulines humaines polyvalentes. Aussi, nous avons montré que plus un sérum présentait un taux élevé d'IgG anti-VCA (mesuré avec les tests sérologiques de routine) ou un taux élevé d'IgG anti-gB (mesuré expérimentalement avec la construction gB₈₂₅), plus son titre en anticorps neutralisants (évalué par la dilution inhibitrice 50% : DI50) était élevé. Ces résultats préliminaires suggèrent que les anticorps anti-gB présents dans les sérums sélectionnés pourraient en partie être responsables de l'activité neutralisante. Le système d'expression de gB que nous avons mis au point ainsi que les tests de séroneutralisation de l'infection à EBV, pourront nous aider à analyser les réponses anticorps de patients atteints de maladies associées à l'EBV et à isoler des anticorps monoclonaux dirigés contre cette protéine.

MOTS CLÉS : virus d'Epstein-Barr (EBV), glycoprotéine de fusion gB, anticorps neutralisants, vaccin prophylactique, vaccin thérapeutique

SPÉCIALITÉ : Biologie Médicale