

Université de Montréal

Élaboration d'un anticorps chimère anti-gp350 comme traitement prophylactique  
éventuel des syndromes lymphoprolifératifs B chez les greffés

Par

Valérie Leblond

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de M.Sc. en microbiologie et immunologie

Août 2008

©, Valérie Leblond, 2008

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Élaboration d'un anticorps chimère anti-gp350 comme traitement prophylactique  
éventuel des syndromes lymphoprolifératifs B chez les greffés

présenté par :

Valérie Leblond

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Docteure Françoise Le Deist

Président - rapporteur

Docteure Caroline Alfieri

Directeur de recherche

Docteure Louise Labrecque

Membre du jury

## RÉSUMÉ

Le virus Epstein-Barr (VEB) est fortement associé au développement de syndromes lymphoprolifératifs (SLP) en greffe pédiatrique. Ce virus a la capacité d'immortaliser les lymphocytes B et de provoquer leur prolifération incontrôlée chez l'hôte immunodéprimé. Plusieurs études démontrent que le cycle lytique du virus jouerait un rôle primordial dans la genèse des SLP en produisant des particules virales pouvant infecter les cellules B adjacentes. Chez un individu immunodéprimé, ces cellules B nouvellement infectées peuvent donner naissance à une expansion lymphocytaire. Le projet présenté dans ce mémoire fait partie d'un programme de recherche visant à élucider le rôle de l'infection productive par le VEB dans le développement des SLP. L'objectif précis de ce projet est de développer un anticorps monoclonal chimère contre la glycoprotéine gp350 du VEB dans le but de neutraliser le virus et d'ainsi prévenir son entrée dans les cellules B.

Notre laboratoire a construit une version chimère de l'anticorps monoclonal murin 72A1, lequel se lie à la gp350 et bloque l'infection. Les premiers essais ont révélé la présence de chaînes non fonctionnelles (aberrantes) dans l'hybridome produisant l'anticorps 72A1. La construction de la chaîne légère authentique est maintenant complète alors que celle de la chaîne lourde est toujours en cours. Le processus de caractérisation de l'anticorps chimère inclura des essais de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). Dans cette optique, une lignée cellulaire exprimant de façon stable la gp350 a été établie.

Notre anticorps chimère anti-gp350 pourrait éventuellement être utilisé comme thérapie préventive chez les greffés présentant un risque élevé de SLP en empêchant l'infection des cellules B adjacentes.

## MOTS CLÉS

Virus herpès, syndrome lymphoprolifératif post-transplantation, thérapie préventive, neutralisation du virus, gp350, anticorps monoclonal chimère, chaîne aberrante

## **SUMMARY**

The Epstein-Barr virus (EBV) is associated with B-cell post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD). EBV has the unique property of immortalizing B lymphocytes, thereby causing their uncontrolled proliferation in an immunocompromised host. Certain evidence suggests that EBV productive infection may play a primary role in the genesis of PTLD by generating virus particles which can infect bystander B cells. In an immunocompromised individual, these infected B cells may then give rise to expanding B-cell clones. The project presented in this thesis is part of a research program seeking to elucidate the role of EBV productive infection in the genesis of PTLD. The specific aim of this work was to design a chimeric monoclonal antibody against the EBV envelope glycoprotein gp350 in order to neutralize the virus, thereby preventing entry into B cells.

Our laboratory constructed a chimeric version of the murine monoclonal antibody, 72A1, which binds to gp350 and blocks infection. The initial cloning attempts revealed the presence of nonfunctional (aberrant) transcripts in the hybridoma line producing the 72A1 antibody. The chimeric version of the authentic light chain is now completed while the chimeric heavy chain construction is ongoing. As part of the characterisation process for the chimeric antibody, a cell line stably expressing surface gp350 was generated. This gp350-expressing cell line will be used for antibody dependent cellular cytotoxicity assays (ADCC).

This anti-gp350 chimeric antibody could be useful as a preventive therapy in transplant patients at high risk for PTLD by blocking the infection of bystander B cells.

## **KEYWORDS**

Herpesvirus, post-transplant lymphoproliferative disease, preventive therapy, virus neutralization, gp350, chimeric monoclonal antibody, aberrant chain

## TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY .....	ii
RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS .....	iii
SUMMARY AND KEYWORDS .....	iv
LISTE DES TABLEAUX .....	viii
LISTE DES FIGURES .....	ix
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS .....	xi
REMERCIEMENTS .....	xiii
CHAPITRE PREMIER : INTRODUCTION .....	1
1.1 Aperçu: le virus Epstein-Barr .....	2
1.2 Syndrome lymphoprolifératif B en greffe pédiatrique : implication du VEB et pathogenèse .....	3
1.3 Rôle du cycle lytique dans le développement de la maladie .....	9
1.4 Traitements actuels et en développement contre les SLP causés par le VEB .....	11
1.4.1 Réduction du traitement immunosuppresseur .....	11
1.4.2 Traitements dirigés contre les cellules cancéreuses .....	13
1.4.2.1 Traitements chimiothérapeutiques généraux .....	13
1.4.2.2 Anticorps contre les cellules B : le Rituximab .....	14
1.4.3 Traitements visant à moduler le système immunitaire .....	16
1.4.3.1 Interférons .....	16
1.4.3.2 Anticorps monoclonaux contre l'IL-6 .....	17
1.4.3.3 Immunothérapie par les cellules T : transfert adoptif de LTC .....	17
1.4.4 Traitements prophylactiques visant le VEB .....	20
1.4.4.1 Antiviraux .....	20
1.4.4.2 Induction du cycle lytique .....	21
1.4.4.3 Vaccins en développement .....	22
1.4.5 Sommaire des traitements .....	24
1.5 Glycoprotéines de surface du VEB et entrée virale .....	27
1.6 Anticorps monoclonal murin 72A1 .....	31
1.7 Humanisation des anticorps .....	33
1.8 Le projet .....	40

CHAPITRE DEUXIÈME : MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	43
2.1 Lignées cellulaires utilisées.....	44
2.2 Plasmides utilisés et cellules compétentes pour les transformations .....	45
2.3 Méthodes communes de manipulation des acides nucléiques.....	46
2.3.1 Extraction d'ARN et production d'ADNc.....	46
2.3.2 Extraction d'ADN plasmidique.....	47
2.3.3 Amplification d'ADN par PCR.....	48
2.3.4 Analyse d'ADN par gel d'électrophorèse en agarose et extraction de l'ADN .....	49
2.3.5 Ligation et clonage des fragments d'ADN.....	49
2.3.6 Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction .....	51
2.4 Séquençage.....	51
2.4.1 Séquençage peptidique.....	51
2.4.2 Séquençage d'acides nucléiques .....	52
2.4.3 Analyse des séquences .....	53
2.5 Sélection et amplification de la chaîne légère fonctionnelle de l'anticorps murin 72A1.....	53
2.6 Construction des chaînes chimériques de l'anticorps.....	55
2.6.1 Spécifications pour la chaîne légère.....	55
2.6.2 Spécifications pour la chaîne lourde .....	57
2.7 Expression des chaînes et de l'anticorps chimère en culture cellulaire .....	58
2.7.1 Ligation de chacune des chaînes dans un vecteur d'expression.....	59
2.7.2 Expression transitoire individuelle des chaînes chimères .....	59
2.7.3 Expression transitoire des deux chaînes pour former l'anticorps chimère .....	60
2.8 Concentration et purification de l'anticorps.....	60
2.9 Détection de l'anticorps.....	60
2.9.1 Immunofluorescence .....	61
2.9.2 Immunobuvardage Western .....	62
2.10 Retour sur la chaîne lourde.....	63
2.11 Établissement d'une lignée cellulaire stable exprimant la gp350 .....	64
2.11.1 Transfection des lignées cellulaires avec le plasmide contenant la gp350 et sélection de clones positifs .....	64
2.11.2 Analyse par immunofluorescence et FACS du meilleur clone .....	65
CHAPITRE TROISIÈME : RÉSULTATS .....	67
3.1 Développement de la chaîne légère chimère.....	68
3.1.1 Construction de la chaîne légère .....	68
3.1.2 Expression de la chaîne légère .....	72
3.1.3 Séquençage et analyse des séquences de la chaîne légère.....	74
3.2 Développement de la chaîne lourde chimère .....	76
3.2.1 Construction de la chaîne lourde.....	76
3.2.2 Expression de la chaîne lourde.....	79
3.2.3 Séquençage et analyse des séquences de la chaîne lourde .....	81

3.3 Expression de l'anticorps chimère .....	84
3.4 Établissement d'une lignée cellulaire stable exprimant la gp350 .....	86
CHAPITRE QUATRIÈME : DISCUSSION .....	90
4.1 Présence de chaînes aberrantes dans l'hybridome 72A1.....	91
4.1.1 Chaîne légère.....	91
4.1.2 Chaîne lourde .....	92
4.2 Déroulement de la construction des chaînes chimères.....	94
4.3 Lignée cellulaire exprimant la gp350 pour les essais d'ADCC .....	97
4.4 L'utilité d'un anticorps chimère neutralisant le VEB dans la prévention des SLP chez les patients à risque .....	98
4.5 Conclusions et perspectives.....	100
BIBLIOGRAPHIE .....	102
ANNEXES .....	117
Annexe I : Cartes génétiques des plasmides utilisés .....	118
Annexe II : Identification des CDR et alignements BLAST des différentes régions des chaînes chimériques .....	121
Annexe III : Autorisation de reproduction .....	126

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I</b>	Protéines de latence du programme de croissance (latence III) et résumé de leur rôle .....	6
<b>Tableau II</b>	Sommaire des traitements actuels et en développement pour les SLP .....	26
<b>Tableau III</b>	Glycoprotéines de l'enveloppe du virus EB et fonction identifiée pour l'entrée dans la cellule B.....	28
<b>Tableau IV</b>	Méthodes d'humanisation ou de production des anticorps humains et exemples d'anticorps approuvés par la FDA.....	40
<b>Tableau V</b>	Lignées cellulaires utilisées, description et milieu de culture pour l'entretien des cellules.....	45
<b>Tableau VI</b>	Plasmides de clonage et d'expression utilisés .....	46
<b>Tableau VII</b>	Polymérase utilisées pour les PCR .....	49
<b>Tableau VIII</b>	Amorces utilisées pour l'amplification sélective de la LC.....	54
<b>Tableau IX</b>	Amorces utilisées pour l'amplification des régions des anticorps murin et humain pour la construction de la LC chimérique.....	56
<b>Tableau X</b>	Paramètres des réactions PCR ayant permis d'amplifier les régions d'intérêt de la LC et les ligations.....	57
<b>Tableau XI</b>	Amorces utilisées pour l'amplification des régions des anticorps murin et humain pour la construction de la HC chimérique .....	58
<b>Tableau XII</b>	Paramètres des réactions PCR ayant permis d'amplifier les régions d'intérêt de la HC et la chaîne complète suite à la ligation.....	58
<b>Tableau XIII</b>	Amorces utilisées pour l'amplification de l'ADN codant pour la V <sub>H</sub> fonctionnelle.....	63

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b>	Modèle hypothétique du développement des SLP et du rôle du cycle lytique .....	8
<b>Figure 2</b>	Structure d'un IgG et méthodes d'humanisation des anticorps.....	34
<b>Figure 3</b>	Graphique représentant l'immunogénicité des anticorps murins, chimères et humanisés par la greffe des CDR.....	37
<b>Figure 4</b>	Sélection de la LC fonctionnelle .....	69
<b>Figure 5</b>	Amplification des trois fragments formant la LC chimère.....	70
<b>Figure 6</b>	Ligation des fragments pour former la LC chimère.....	71
<b>Figure 7</b>	Immunobuvardage Western montrant l'expression de la LC.....	72
<b>Figure 8</b>	Immunofluorescence intracellulaire de la LC chimère .....	73
<b>Figure 9</b>	Séquences de la LC chimère exprimée.....	75
<b>Figure 10</b>	Extrémité N terminale de la LC de l'anticorps 72A1 et alignement avec la LC chimère .....	76
<b>Figure 11</b>	Amplification des fragments pour former la HC chimère.....	77
<b>Figure 12</b>	Sélection de la HC chimère par amplification suite à la ligation des fragments V <sub>H</sub> et C <sub>H</sub> .....	78
<b>Figure 13</b>	Immunobuvardage de Western montrant l'expression de la HC .....	79
<b>Figure 14</b>	Expression intracellulaire de la HC chimère observée par immunofluorescence .....	80
<b>Figure 15</b>	Séquences de la HC chimère exprimée .....	82
<b>Figure 16</b>	Analyse du séquençage peptidique de l'extrémité N terminale de la HC de l'anticorps 72A1 .....	83
<b>Figure 17</b>	Immunobuvardage Western montrant l'expression de l'anticorps chimère .....	85
<b>Figure 18</b>	Établissement de lignées cellulaires exprimant la gp350.....	87
<b>Figure 19</b>	Expression de la gp350 dans les cellules CEM.....	88

<b>Figure 20</b>	Analyse FACS du clone CEM-gp350 2C3 montrant l'expression de la gp350 .....	89
<b>Figure 21</b>	Plasmide de clonage pCR-Blunt II-TOPO .....	118
<b>Figure 22</b>	Plasmide de clonage pCR4-TOPO .....	119
<b>Figure 23</b>	Plasmide de clonage pcDNA3.1/V5-His-TOPO .....	120
<b>Figure 24</b>	Plasmide pZIP-MA contenant le gène de la gp350 .....	120
<b>Figure 25</b>	Séquence de la région V <sub>L</sub> identifiant les CDR .....	121
<b>Figure 26</b>	Séquence de la région V <sub>H</sub> identifiant les CDR .....	121
<b>Figure 27</b>	Dix premiers alignements BLAST de nucléotides de la région V <sub>L</sub> .....	122
<b>Figure 28</b>	Dix premiers alignements BLAST de nucléotides de la région C <sub>L</sub> .....	123
<b>Figure 29</b>	Dix premiers alignements BLAST de nucléotides de la région V <sub>H</sub> .....	124
<b>Figure 30</b>	Dix premiers alignements BLAST de nucléotides de la région C <sub>H</sub> réalisés .....	125

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

<b>ADCC :</b>	cytotoxicité à médiation cellulaire dépendant des anticorps (de l'anglais « antibody dependent cellular cytotoxicity »)
<b>CDC :</b>	cytotoxicité dépendante du complément
<b>CDR :</b>	de l'anglais « complementarity-determining regions »
<b>CH :</b>	région constante de la chaîne lourde
<b>CHOP :</b>	cyclophosphamide, adriamycine, vincristine et prednisone
<b>CL :</b>	région constante de la chaîne légère
<b>CMH II :</b>	complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
<b>DTT :</b>	dithiothréitol
<b>EBER :</b>	de l'anglais « EBV encoded RNA »
<b>EBNA :</b>	de l'anglais « Epstein-Barr nuclear antigen »
<b>FDA :</b>	Food and Drug Administration
<b>FITC :</b>	isothiocyanate de fluorescéine
<b>FR :</b>	de l'anglais « framework regions »
<b>GFP :</b>	protéine à fluorescence verte
<b>gp350 :</b>	glycoprotéine 350/220
<b>HAMA :</b>	de l'anglais « human anti mouse antibody »
<b>HC :</b>	chaîne lourde (de l'anglais « heavy chain »)
<b>HHV-4 :</b>	virus herpès humain 4
<b>IgG :</b>	immunoglobuline G
<b>IL-10 :</b>	interleukine 10
<b>IL-6 :</b>	interleukine 6
<b>kb :</b>	kilobase
<b>kDa :</b>	kilodalton
<b>LC :</b>	chaîne légère (de l'anglais « light chain »)
<b>LCL :</b>	lignées cellulaires lymphoblastiques
<b>LCL-VEB :</b>	LCL contenant le VEB
<b>LMP :</b>	de l'anglais « latent membrane protein »
<b>LP :</b>	de l'anglais « leader protein »

<b>LTC :</b>	lymphocytes T cytotoxiques
<b>mTOR :</b>	de l'anglais « mammalian target of rapamycin »
<b>MuLV LTR :</b>	de l'anglais « murine leukemia virus long terminal repeats »
<b>NCBI :</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>NK :</b>	de l'anglais « natural killer »
<b>pb :</b>	paire de base
<b>PBS :</b>	solution tampon saline de phosphate
<b>PCR :</b>	réaction de polymérisation en chaîne
<b>PVDF :</b>	polyfluorure de vinylidène
<b>SCID :</b>	de l'anglais « severe combined immunodeficiency »
<b>SFV :</b>	sérum foetal de veau
<b>SLP :</b>	syndrome lymphoprolifératif post transplantation
<b>TAE :</b>	tris, acetate, EDTA
<b>TNFR :</b>	récepteur du facteur de nécrose tumorale
<b>TO :</b>	transplantation d'organe
<b>TPA :</b>	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
<b>TRAF2 :</b>	facteur associé au récepteur du TNF
<b>TSCH :</b>	transplantation de cellules souches hématopoïétiques
<b>VEB :</b>	virus Epstein-Barr
<b>VH :</b>	région variable de la chaîne lourde
<b>VL :</b>	région variable de la chaîne légère

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier ma directrice de recherche, le Dr. Caroline Alfieri, pour son accueil, son soutien et son encouragement tout au long du projet.

Je souhaiterais également remercier le Dr. Jerome Tanner pour ses conseils, son aide et le don de réactifs, madame Jing Hu pour son aide avec le clonage ainsi que les autres membres du laboratoire, notamment Janie Trépanier, Ramatoulaye Bah et Elodie Rance pour leur soutien et les discussions scientifiques.

J'aimerais remercier les membres du Groupe de recherche sur la transplantation et l'immunologie du sang de cordon, et plus spécifiquement le Dr. Hugo Soudeyns et le Dr. Elie Haddad pour leurs opinions et leurs conseils. Je voudrais aussi remercier le Dr. Claude Lazure, de l'Institut de recherches cliniques de Montréal, pour le service de séquençage peptidique.

La réalisation de ce projet a été accomplie grâce à l'appui financier des Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) qui a fourni une subvention de recherche dans le cadre du programme de recherche en médecine transfusionnelle, en greffe et en hémo-histovigilance ainsi qu'une bourse de formation à la maîtrise. Je souhaiterais également manifester mon appréciation à l'Université de Montréal pour l'attribution d'une bourse d'excellence de la Faculté des études supérieures.

En dernier lieu, je souhaiterais remercier le Département de microbiologie et immunologie de l'Université de Montréal ainsi que le Centre de recherche de l'Hôpital Sainte-Justine pour m'avoir permis de compléter ma maîtrise dans leur institution respective.

# **CHAPITRE PREMIER**

## **INTRODUCTION**

### **1.1 Aperçu: le virus Epstein-Barr**

Le virus Epstein-Barr (VEB) fait partie de la sous-famille des *gammaherpesvirinae* et porte également le nom de virus herpès humain 4 (HHV-4) (46). C'est un virus à ADN double-brin dont la capsidie icosaédrique est enveloppée. Le VEB est l'un des virus les plus communs dans la population mondiale, avec une incidence moyenne de plus de 90%. Le cycle d'infection primaire est le suivant. Transmis généralement par la salive, le virus se trouve d'abord dans la cavité oro-pharyngée dans laquelle il infecte ou non les cellules épithéliales et s'y réplique, cette question n'ayant toujours pas fait l'objet d'un consensus. Le virus se rend ensuite dans les tissus lymphoïdes dans lesquels il infecte sa principale cible: les lymphocytes B. D'autres types de cellules telles que les lymphocytes T, les neutrophiles et les monocytes peuvent être infectées par le VEB (95). Lors de l'infection, la glycoprotéine 350/220 (gp350) du virus interagit avec le récepteur CD21 de la cellule, ce qui permet l'entrée du virus dans la cellule B naïve par internalisation à l'intérieur de vésicules cytoplasmiques (71). Une fois à l'intérieur de la cellule, le virus exprime un ensemble de protéines dites de latence, dénommé « programme de croissance », qui engendre l'activation et la prolifération des cellules B infectées (95). Ce programme de croissance imite le processus de présentation d'antigène dans le centre germinale et conduit la cellule infectée à travers les mêmes étapes d'expansion clonale, de différenciation et de survie sans nécessiter la stimulation des lymphocytes T ou des signaux de survie (163). Le résultat final est la différenciation de la cellule B infectée en une cellule mémoire contenant le virus en phase latente, sous forme d'épisome dans le noyau ou parfois intégré dans le génome. Chez un individu en santé, les cellules infectées exprimant les protéines du programme de croissance initient la production de

lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques, ce qui contribue à éliminer une partie des cellules B infectées et permet éventuellement de contrôler l'infection (14). Cependant, les cellules B mémoires contenant le virus en phase latente n'expriment aucune protéine virale et ne sont pas reconnues par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Ceci permet donc au virus de persister dans les cellules B mémoires pendant toute la durée de vie de l'individu. Il se réactive à l'occasion, probablement lors de la différenciation des cellules B mémoires en plasmocytes, pour entrer dans le cycle lytique et produire de nouvelles particules virales, ce qui permet sa transmission à un autre hôte (134, 163).

L'ubiquité du VEB a entraîné son association, faible ou forte, avec une panoplie de maladies (137). L'infection primaire, généralement asymptomatique chez l'enfant, peut donner lieu à la mononucléose infectieuse chez l'adolescent et l'adulte. Le virus a été suggéré comme facteur de risque pour certaines maladies auto-immunes telles que la sclérose en plaques (167), le syndrome de fatigue chronique (101), ou encore le lupus érythémateux systémique (65). Mais le rôle de premier plan du VEB dans certaines maladies lymphoprolifératives est pratiquement indiscutable.

## **1.2 Syndrome lymphoprolifératif B en greffe pédiatrique : implication du VEB et pathogenèse**

Les maladies lymphoprolifératives suite à une transplantation sont des complications sérieuses de plus en plus observées, en lien probable avec une augmentation des transplantations effectuées et des médicaments immunosuppresseurs encore plus puissants. La majorité des syndromes lymphoprolifératifs post transplantation (SLP) diagnostiqués, soit environ 85%, affectent les cellules B (97). De ceux-ci, environ

90% sont associés à la présence du VEB (106). Différents facteurs de risque ont été identifiés tels que le type d'organe transplanté, l'intensité du régime d'immunosuppression, l'âge ainsi que la séronégativité pour le VEB au moment de la greffe. Ce dernier facteur est particulièrement important en greffe pédiatrique, puisqu'une plus grande proportion d'individus n'a jamais été en contact avec le virus avant la transplantation. En effet, l'incidence des SLP chez les individus séronégatifs serait de 10 à 75 fois supérieure à celle observée chez les individus séropositifs pour le VEB, selon l'organe transplanté (22, 134, 174). Une infection primaire par le VEB chez le receveur d'une greffe alors qu'il est soumis à un régime d'immunosuppression constitue donc un scénario à risque retrouvé fréquemment en greffe pédiatrique.

Le processus d'oncogenèse menant à l'immortalisation et à la transformation des cellules B implique un ensemble de protéines de latence formant le programme de latence III (programme de croissance). Les protéines principales de ce programme ainsi que certaines de leurs fonctions connues sont présentées dans le tableau I. Les EBERs (pour « EBV encoded RNA ») 1 et 2 sont de petites molécules d'ARN non traduit et non polyadénylé qui sont retrouvées en grande quantité dans les cellules en phase latente. Jusqu'à récemment, ces EBERs ne semblaient pas jouer un rôle dans le processus de transformation, mais une étude a démontré qu'EBER2, mais non EBER 1, était nécessaire à la transformation (182). Six protéines EBNA (pour « Epstein-Barr nuclear antigen ») sont exprimées dans le programme de croissance : 1, 2, 3A, 3B, 3C et LP (pour « leader protein »). EBNA1 sert principalement au maintien de la latence et pourrait promouvoir la survie de la cellule infectée entre autres en

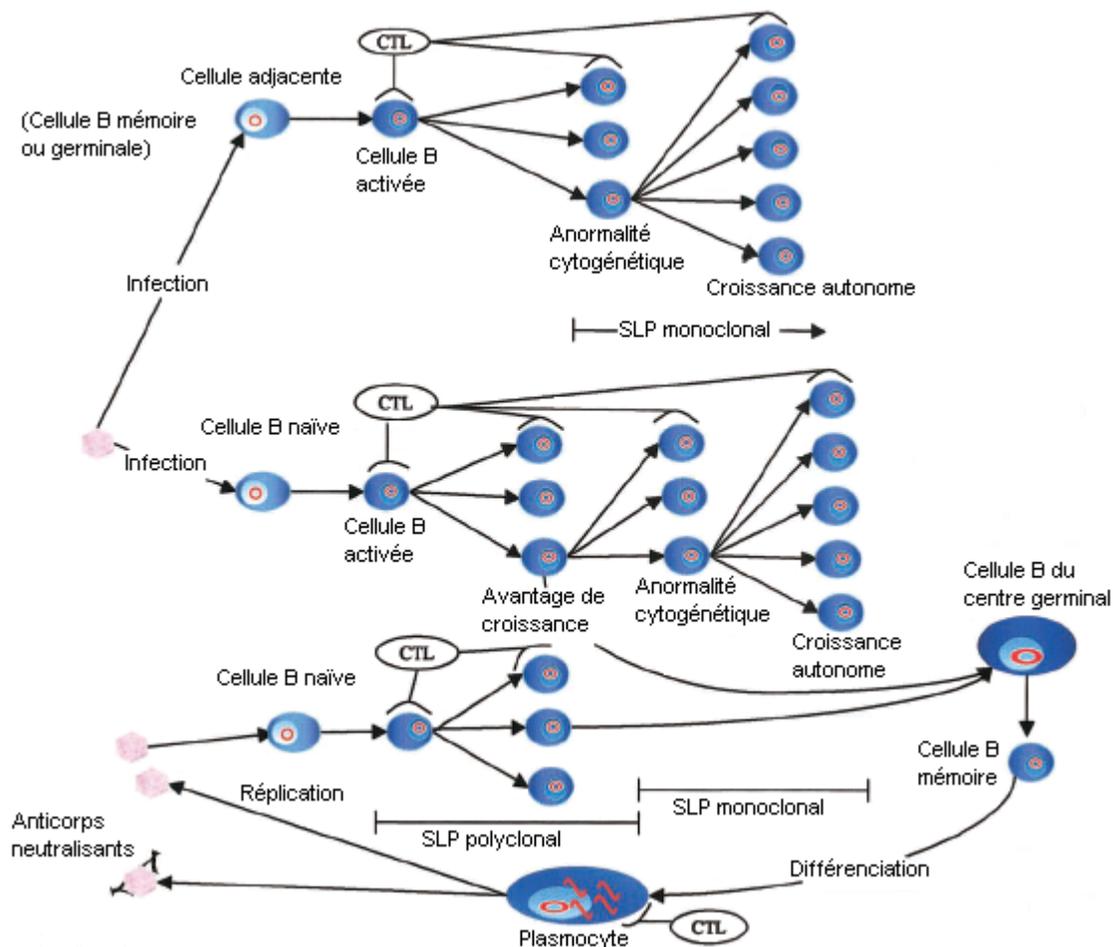
diminuant les niveaux du facteur apoptotique p53 (144). EBNA2, quant à elle, est une protéine cruciale pour la transformation cellulaire et qui agit en augmentant l'expression de LMP1 et LMP2 (pour « latent membrane protein »), en plus de certains récepteurs de croissance de la cellule B tels que CD23 (175, 176). La famille des EBNA3 présente des structures semblables mais seules les protéines 3A et 3C sont essentielles pour le processus de transformation en agissant probablement à titre de régulateurs de transcription (19, 166). La dernière de ce groupe, EBNA-LP, augmenterait l'activité d'EBNA2 sur le promoteur de LMP1 (64). Il semblerait toutefois que ceci s'accomplit sans interactions directes ou indirectes entre les deux protéines (130). LMP1 est la protéine apportant la plus grande contribution à la transformation cellulaire et possède probablement la plus importante diversité d'activités parmi les protéines de latence. Elle est généralement considérée comme l'oncogène principal. LMP1 agit comme un récepteur du facteur de nécrose tumorale (TNFR) activé de façon constitutive et stimule plusieurs voies signalétiques telles que NF- $\kappa$ B et c-Jun (38, 51, 75). Les effets de l'activation de ces voies sont variés et incluent la prolifération cellulaire, l'expression de molécules anti-apoptotiques ainsi que la métastase (103). Finalement LMP2A et LMP2B sont deux protéines ayant une structure similaire, mais la première contient une section additionnelle de 119 acides aminés à son extrémité N-terminale (111) et semble avoir une fonction indirecte dans la transformation des cellules B. En effet, LMP2A bloquerait la voie de signalisation du récepteur de la cellule B et activerait la prolifération et la survie de la cellule en simulant cette voie (13). Une des conséquences probables de cette activité serait de maintenir la cellule dans la phase latente et donc d'empêcher le déclenchement du cycle lytique du virus. De plus, LMP2A contrôlerait l'expression d'une protéine, le

facteur associé au récepteur du TNF (TRAF2), qui serait nécessaire à la voie de signalisation NF- $\kappa$ B activée par LMP1 (58). Donc selon les connaissances actuelles, LMP1 et EBNA2 sont absolument nécessaires à la transformation cellulaire et les protéines/ARN EBER2, EBNA3A, EBNA3C, EBNA-LP joueraient un rôle très important. Il n'a pas été démontré que l'absence des autres protéines énumérées ici bloque le processus de transformation.

**Tableau I.** Protéines/ARN de latence du programme de croissance (latence III) et résumé de leur rôle.

<b>Gène</b>	<b>Caractéristiques et fonctions probables</b>
EBER (1 et 2)	Petits ARN non polyadénylés; EBER 2 jouerait un rôle dans la transformation des cellules B
EBNA1	Protéine se liant à l'ADN nécessaire à la réplication et à la conservation de l'épisome dans le noyau.
EBNA2	Activation de plusieurs gènes tels que LMP1 et LMP2; joue un rôle crucial dans la transformation de la cellule B
EBNA3 (A, B et C)	Contrôle probable de la transcription de certains gènes comme LMP1; A et C nécessaire à la transformation
EBNA-LP	Augmentation des propriétés d'EBNA2 à activer LMP1
LMP1	Protéine majeure de la transformation cellulaire; stimule la survie de la cellule
LMP2 (A, B)	LMP2A empêche ou retarde l'entrée de la cellule B dans le cycle lytique; stimule la survie de la cellule

Chez un individu sain, les cellules B infectées qui sont en prolifération sont éliminées soit par différenciation en cellules B mémoires (conservant le virus dans une phase latente plus « transcriptionnellement silencieuse »), soit par destruction par les lymphocytes T cytotoxiques (LTC). Dans un système immunitaire compromis, l'équilibre entre la prolifération des cellules B infectées et leur élimination par différenciation ou destruction se trouve ainsi brisé et cette situation peut engendrer un SLP des cellules B (106, 163). De plus, la différenciation de cellules mémoires infectées en plasmocytes engendrerait la réplication lytique du virus (134). Celle-ci n'étant pas contrôlée par les LTC, une concentration élevée de particules virales pourrait donner lieu à l'infection de cellules adjacentes, telles que les cellules B germinales et les cellules B mémoires, qui ne sont pas susceptibles au VEB en temps normal (134). Ces cellules ne peuvent pas bloquer le programme de croissance en se différenciant et dépendent des LTC pour leur destruction; elles contribueraient donc également au développement des SLP de cellules B (figure 1). Cette dernière hypothèse nous amène à considérer le point suivant : le rôle du cycle lytique dans le processus de lymphomagenèse.



**Figure 1.** Modèle hypothétique du développement des syndromes lymphoprolifératifs (SLP) et du rôle du cycle lytique. Les cellules B infectées par le VEB sont normalement contrôlées par différenciation en cellules mémoires ou par l'action des LTC (CTL dans la figure). Un système immunitaire compromis possède une réponse LTC déficiente, ce qui peut mener à un SLP monoclonal ou polyclonal, selon l'origine. De plus, il semble que la différenciation des cellules B mémoires en plasmocytes entraîne la production de particules virales infectieuses et que celles-ci pourraient infecter des cellules B adjacentes. Il est possible que cet événement constitue un facteur important dans le développement des SLP. (Figure traduite et modifiée de Preiksaitis (134))

### **1.3 Rôle du cycle lytique dans le développement de la maladie**

Nous avons aujourd'hui une bonne idée de la fonction et du rôle de la plupart des protéines de latence du VEB ainsi que de leur implication possible dans le développement des SLP de cellules B. Les protéines de latence ont été vigoureusement étudiées, mais très peu d'attention a été accordée à la phase répllicative du virus jusqu'à maintenant. Pourtant, la révision des résultats de certaines études ainsi que les résultats de plus récentes recherches sur le sujet semblent suggérer un rôle important, sinon primordial, du cycle lytique du virus dans la genèse des SLP.

L'injection de lymphocytes du sang périphérique provenant d'individus séropositifs pour le VEB dans une souris SCID (pour « severe combined immunodeficiency ») fournit un modèle pour représenter les étapes du développement des SLP (141). Des études chez ces souris ont apporté différentes preuves de la contribution du cycle lytique. Par exemple, l'injection de lignées cellulaires lymphoblastiques (LCL) contenant le VEB en phase latente dans des souris SCID a résulté en des tumeurs présentant le virus majoritairement sous sa forme lytique (139). Également, les tumeurs précoces montraient la présence d'une réplication du virus et étaient de nature polyclonale, suggérant la prolifération de cellules B adjacentes infectées par le VEB nouvellement répliqué (116, 117). Une autre étude a démontré que des LCL infectées avec des virus mutants incapables d'entrer dans le cycle lytique et de se répliquer ne produisaient pas de lymphoprolifération chez les souris SCID (70). De plus, le phénomène était réversible, c'est-à-dire que le rétablissement de la phase lytique donnait lieu à des tumeurs chez ces mêmes souris. Ce dernier groupe a

avancé l'hypothèse que l'importance du cycle lytique du virus pourrait être en lien avec la sécrétion d'interleukine-6 (IL-6). En effet, l'IL-6 semble être nécessaire pour la formation de tumeurs chez les souris SCID et certaines protéines du cycle lytique, notamment BRLF1 et BZLF1, induisent justement la production d'IL-6 (80). Le modèle courant du rôle du cycle lytique chez les individus séropositifs semble donc commencer par la différenciation de cellules infectées se trouvant en phase latente en plasmocytes répliquant le VEB; ou encore par l'infection primaire de cellules B et la réplication lytique du virus chez ces cellules nouvellement infectées. La concentration élevée de virus pourrait entraîner l'infection de cellules B adjacentes et engendrer la prolifération et la transformation de certaines d'entre elles à travers la sécrétion de facteurs de croissance paracrines tels qu'IL-6.

D'autres indices, révélés par l'étude de patients ayant reçu une ou plusieurs greffes, nous poussent à croire que la phase lytique du virus est importante. La présence de virus circulant librement dans le sang de patients présentant des SLP en est un premier (100, 107). Également, l'analyse de biopsies de patients malades a démontré la présence de virus en phase répliquative ou d'antigènes du cycle lytique dans 30 à 80% des cas (59, 82). Dans une autre étude, un patient greffé atteint d'un SLP a été traité avec des LTC autologues spécifiques au VEB. L'analyse subséquente de ces LTC a révélé que la réponse initiale était dirigée contre des antigènes du cycle lytique alors que la réponse au cours de la phase de rémission visait plus spécifiquement des antigènes latents (149).

Le risque plus élevé de lymphomagenèse associé à une infection primaire proviendrait en partie d'une réponse des LTC plus lente à se former et de l'absence d'anticorps neutralisants, qui contribuent également à contrôler l'infection chez les individus en santé. Il a aussi été stipulé que le délai de réponse des LTC favoriserait l'établissement d'une concentration élevée de virus, ce qui augmenterait la probabilité d'infection des cellules B adjacentes (134). L'hypothèse du rôle considérable du cycle lytique dans le processus de lymphomagenèse, qui pourrait être une étape initiale importante du développement de la maladie, nous permet d'avancer qu'une option thérapeutique prophylactique pourrait s'avérer d'une grande utilité dans la prévention des maladies lymphoprolifératives chez les patients à risque. Aucune alternative efficace de ce type n'existe présentement sur le marché, la plupart des traitements s'attaquant aux cellules infectées déjà en voie de prolifération ou aux tumeurs.

#### **1.4 Traitements actuels et en développement contre les SLP causés par le VEB**

##### **1.4.1 Réduction du traitement immunosuppresseur**

La première option thérapeutique lors du diagnostic d'un SLP suite à une transplantation d'organe consiste généralement en une diminution du régime d'immunosuppression administré. Évidemment, le principal désavantage de ce traitement est une augmentation du risque de rejet de la greffe. Ceci permettrait, en théorie, de rétablir partiellement la réponse des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et de combattre l'infection par le VEB. Une étude récente a démontré par cytométrie de flux que la quantité de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> produisant de l'interféron-gamma augmentait lors

de la diminution du régime immunosuppresseur chez des greffés malades dont les tumeurs ont progressivement diminué (60). Certains médicaments immunosuppresseurs semblent augmenter les risques de SLP et donc un changement d'agents immunosuppresseurs peut s'avérer utile dans certaines situations (131, 147, 180). On peut espérer observer une réponse au changement de régime immunosuppresseur en deux à quatre semaines (54, 56). La régression de la maladie suite à la diminution du traitement immunosuppresseur est observée dans 40% à 89% des cas (7, 54, 170).

Un agent immunosuppresseur relativement nouveau sur le marché, le sirolimus, suscite de plus en plus d'intérêts en raison de ses propriétés anticancéreuses. Le sirolimus, aussi appelé rapamycine, agit comme immunosuppresseur en se liant à une protéine, mTOR (pour « mammalian target of rapamycin »). L'inactivation de cette protéine, et donc de la voie de signalisation qui lui est associée, a comme effet d'arrêter la division de certains types de cellules, dont les lymphocytes B et T, dans la phase G1 du cycle de division (148). Son mécanisme d'action unique lui confère intrinsèquement une activité antiproliférative, du moins en théorie. Chez des souris SCID injectées avec des LCL contenant le VEB (LCL-VEB), l'administration de rapamycine inhibe ou ralentit significativement le développement de tumeurs (122). Dans le cas des SLP, l'analyse de tissus de patients a démontré que la voie de signalisation mTOR est constamment activée, soulignant ainsi le potentiel du sirolimus comme option thérapeutique ou encore comme agent préventif de ces maladies (37). D'ailleurs, plusieurs groupes ont étudié et démontré cette utilisation en clinique (8, 9, 26, 32, 128). La combinaison des données de neuf centres de

transplantation européens a démontré qu'un changement de traitement immunosuppresseur pour la rapamycine avait entraîné une rémission chez 15 patients présentant un SLP sur un total de 19 (128).

#### **1.4.2 Traitements dirigés contre les cellules cancéreuses**

Lorsque la diminution du régime d'immunosuppression ne donne pas de résultats positifs, des traitements contre le cancer sont très souvent administrés. Dans les rares cas où les tumeurs sont localisées, il est habituellement possible d'effectuer une chirurgie locale accompagnée ou non de radiothérapie (34, 92). L'ablation des tumeurs par radiofréquence peut constituer une alternative moins toxique pour les tissus adjacents que la radiation (154).

##### **1.4.2.1 Traitements chimiothérapeutiques généraux**

Lorsque la maladie est systémique, les médecins ont souvent recours à la chimiothérapie pour traiter le SLP se développant. Une combinaison de médicaments anticancéreux telle que CHOP (cyclophosphamide, adriamycine, vincristine et prednisone) semble donner de meilleurs résultats qu'un seul médicament (11). Une étude rétrospective chez 26 adultes atteints de SLP a évalué à 65% le taux de réponse au traitement CHOP (21). La toxicité associée à ces traitements est cependant élevée, tout comme le taux de mortalité en découlant. Les enfants sont particulièrement sensibles à ces traitements et une option pour contourner ce problème, dans certains cas, pourrait impliquer de leur administrer des doses significativement plus faibles de médicaments chimiothérapeutiques (57). Un agent thérapeutique spécifique aux cellules B matures est de plus en plus considéré comme alternative aussi efficace et beaucoup

moins toxique que la chimiothérapie pour les patients atteints de SLP. Il s'agit du Rituximab.

#### **1.4.2.2 Anticorps contre les cellules B : le Rituximab**

Le Rituximab (Rituxan) est un anticorps monoclonal chimère formé de l'assemblage des régions variables d'un anticorps de souris, le 2B8, et des régions constantes d'un IgG humain (136). L'anticorps se lie spécifiquement, à travers les régions variables provenant de l'anticorps de souris, à une molécule de surface des cellules B : le CD20. Le CD20 est une phosphoprotéine d'environ 35 kDa exprimée à la surface des cellules pré-B et des cellules B matures, mais non sur les cellules pro-B ou les plasmocytes (120) et est impliquée dans le cycle de division et de différenciation des cellules B (52). La liaison du Rituximab au CD20 induit la mort des cellules B. Le mécanisme d'action n'est cependant pas élucidé et pourrait impliquer trois différentes possibilités ou une combinaison de celles-ci : la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendant des anticorps (ADCC), la cytotoxicité dépendante du complément (CDC) et la stimulation de la voie apoptotique (133).

Le Rituximab a été approuvé par la FDA en 1997 pour le traitement des lymphomes B et a été utilisé depuis avec un succès considérable (5). De nombreuses autres utilisations de ce médicament sont présentement à l'étude, allant du traitement des rejets de greffe au traitement de maladies auto-immunes (10). Une utilisation présentant un potentiel particulièrement intéressant se retrouve dans le traitement des SLP de cellules B. Une étude prospective menée en Europe a évalué la sécurité et l'efficacité du Rituximab chez 43 patients présentant un SLP de cellules B et n'ayant

pas répondu à une diminution du régime d'immunosuppression (20). Le taux de réponse au traitement était de 44.2% après 80 jours, 30% de ceux-ci étant en rémission complète. Après un an, le taux de survie était de 67%. Une autre étude prospective semblable a été complétée en Espagne dans laquelle 38 patients ont été traités avec une diminution de l'immunosuppression et le Rituximab (53). Après un ou deux traitements de quatre infusions de Rituximab, 60,5% des patients étaient en rémission complète. Parmi les patients n'ayant pas répondu au traitement initial, 75% sont entrés en rémission complète suite à une combinaison de Rituximab et de chimiothérapie. Donc lequel des traitements, entre la chimiothérapie et le Rituximab, est le plus efficace? La question n'est pas encore résolue, mais une étude rétrospective incluant 35 patients ayant reçu de la chimiothérapie et/ou du Rituximab semble donner un élément de réponse (40). Les taux de réponses globales étaient semblables, avec 68% pour Rituximab et 74% pour la chimiothérapie. La différence se trouve au niveau de la tolérance au traitement. En effet, 26% des patients ayant reçu de la chimiothérapie sont décédés en raison de la toxicité du traitement, alors qu'aucun patient n'est décédé des suites du traitement avec le Rituximab. Les recommandations indiquent de plus en plus que le Rituximab devrait être administré comme premier traitement après une réduction d'immunosuppression en raison de son efficacité comparable à la chimiothérapie et de son absence de toxicité (40, 53, 66, 91). Ceci étant dit, le Rituximab n'est pas exempt d'effets secondaires, mais la plupart des effets observés consistent en des symptômes s'apparentant à ceux d'une grippe. Certains effets plus graves comme une neutropénie, thrombocytopenie ou une asthénie ont été observés mais ces événements ne se produisent que très rarement (133). Le Rituximab a cependant certaines limitations. Par exemple, une réponse

contre la partie murine de l'anticorps a entraîné le développement de versions plus humanisées de l'anticorps (33, 173). L'absence d'effet sur les plasmocytes est aussi une restriction qui peut avoir un impact sur le traitement des SLP. Malgré ces limitations, le Rituximab semble être une alternative thérapeutique efficace et plus sécuritaire que la chimiothérapie pour le traitement des SLP de cellules B.

### **1.4.3 Traitements visant à moduler le système immunitaire**

#### **1.4.3.1 Interférons**

Les interférons de type I ont été utilisés dans quelques études, souvent en combinaison avec un autre traitement, pour les SLP. Les interférons ont une action antivirale naturelle, entre autres, par la stimulation des cellules NK (pour « natural killer ») et la réponse des lymphocytes T. L'interféron ralentirait également la croissance des cellules B transformées par le VEB (124). L'idée de l'utilité de l'interféron pour traiter les SLP provient du fait que les cellules B infectées par le VEB produiraient un analogue de l'interleukine-10 (IL-10) qui agirait en inhibant la synthèse d'interféron (155). Il a été observé qu'une proportion considérable de patients présentant des SLP avaient une sous-production d'interféron-alpha, probablement causée par la délétion d'un gène (181). Quelques études ont démontré une certaine efficacité de l'interféron pour le traitement des SLP, mais la plupart combinaient l'interféron avec des injections intraveineuses d'immunoglobulines ou de la chimiothérapie (30, 41). Il est donc difficile d'établir le rôle de l'interféron dans le traitement de ces patients. L'interféron semble être une option thérapeutique de

moins en moins utilisée et étudiée, probablement en raison du risque important de rejet de la greffe causé par la stimulation de l'activité des cellules T CD8 (56).

#### **1.4.3.2 Anticorps monoclonaux contre l'IL-6**

Tel que discuté brièvement dans une section précédente, l'IL-6 contribuerait significativement à la formation de tumeurs et au développement des SLP. En effet, l'IL-6 semble promouvoir la croissance et la maturation des cellules B infectées et immortalisées par le VEB (146, 169). D'ailleurs, l'IL-6 est retrouvée à des concentrations anormalement élevées dans le sérum de la majorité des patients ayant un SLP et cette production proviendrait principalement des tissus affectés (168). L'injection d'un anticorps monoclonal contre l'IL-6 chez des souris SCID ayant reçu des LCL - VEB a entraîné une diminution de la fréquence des tumeurs observées de 62% à 27% (112). Un anticorps monoclonal murin anti-IL-6 a également été testé dans une étude clinique de phase I-II chez 12 patients avec un SLP n'ayant pas répondu à une diminution du régime d'immunosuppression (61). Cinq patients ont eu une rémission complète, trois autres patients ont eu une rémission partielle mais parmi ces derniers, un patient a fait une rechute et est décédé. Les résultats semblent donc prometteurs, mais d'autres études seront nécessaires pour évaluer l'efficacité réelle d'un anti-IL-6 dans le traitement des SLP.

#### **1.4.3.3 Immunothérapie par les cellules T : transfert adoptif de LTC**

Les cellules se trouvant dans la phase latente III expriment neuf protéines du programme de croissance. L'avantage de cette expression est qu'elle entraîne une réponse des LTC qui contribue à l'élimination des cellules infectées et transformées.

On peut alors penser que, chez les individus immunosupprimés, il serait possible de leur transférer des LTC pour combler leur réponse LTC déficiente et les aider à contrôler la maladie. La thérapie par les cellules T offre une alternative thérapeutique intéressante mais elle ne s'applique pas aussi bien dans toutes les situations.

Le type de transplantation est une première situation limitant l'utilisation de la thérapie par les cellules T. Les SLP se produisant suite à une transplantation de cellules souches hématopoïétiques (TSCH) sont originaires du donneur, alors que ceux dérivant d'une transplantation d'organe (TO) proviennent habituellement du receveur. La différence est considérable car, chez un individu ayant reçu une TSCH, on peut utiliser les LTC du donneur, ceux-ci étant spécifiques pour les cellules B transformées. Bien que les LTC de donneurs sans aucune manipulation aient été utilisés pour traiter des SLP (127), la thérapie cellulaire consiste maintenant en des LTC stimulés et sélectionnés ex vivo pour leur spécificité au VEB afin d'éviter les conséquences d'une alloréactivité (156). Les LTC des donneurs ont également été étudiés pour la prévention des SLP chez des patients à risque (109, 140). Dans la première étude (109), aucun des 60 patients ayant reçu les LTC spécifiques au VEB n'a développé un SLP, alors que l'incidence de la maladie chez le groupe contrôle était de 11%.

Chez les patients recevant une TO, les SLP proviennent habituellement de cellules du receveur; les LTC du donneur ne peuvent pas être utilisés comme thérapie puisqu'ils ne seront pas spécifiques des cellules tumorales. Cependant, il est possible d'utiliser les LTC autologues pour traiter le patient, mais cette approche est coûteuse et requiert

du temps parce qu'elle doit être faite pour chaque patient greffé, ou du moins, pour ceux considérés à haut risque. De plus, elle ne s'applique qu'aux patients séropositifs pour le VEB, alors que ce sont les patients séronégatifs qui représentent le groupe le plus à risque (31). Pour contourner ce problème chez les patients séronégatifs, des protocoles d'activation et d'expansion des LTC autologues spécifiques au VEB ont été mis au point et testés chez quelques patients, seuls (84) ou combinés avec de la chimiothérapie (24, 145). Les résultats semblent prometteurs, mais la réponse à ce traitement demeure moins élevée que chez les patients recevant une TCSH. C'est pourquoi certains groupes ont concentré leurs efforts pour développer des protocoles d'activation et d'expansion de LTC autologues spécifiques au VEB plus efficaces, mais ces derniers n'ont pas encore été testés chez des patients (2, 23, 104, 153).

Il n'est cependant pas pratique de générer des LTC autologues spécifiques pour tous les patients recevant une greffe, dans l'éventualité où un SLP se développerait. De plus, le processus prend de 10 à 14 semaines (42). Une alternative intéressante, qui consiste en un transfert de LTC spécifiques allogéniques, a été investiguée. Haque *et al.* ont généré une banque de 70 lignées cellulaires de LTC provenant d'individus séropositifs pour le VEB (179). Cette banque a été récemment utilisée dans une étude clinique de phase II chez 33 patients avec un SLP suite à une greffe qui n'ont pas répondu à une réduction d'immunosuppression et à un autre traitement dans certains cas (63). Ces patients ont reçu des infusions de LTC, provenant de cette banque, sélectionnés selon l'identité HLA la plus élevée possible. Après une période de six mois, 42% des patients avaient atteint une rémission complète et 9% étaient en rémission partielle. Fait intéressant, un seul patient a développé des anticorps

déTECTABLES contre la portion HLA non identique des LTC allogéniques et ce patient a tout de même atteint une rémission complète. Cette stratégie constituerait donc une alternative thérapeutique sécuritaire, moins coûteuse et disponible rapidement pour le traitement des SLP.

#### **1.4.4 Traitements prophylactiques visant le VEB**

##### **1.4.4.1 Antiviraux**

Des antiviraux tels que ganciclovir et acyclovir ont une activité inhibitrice *in vitro* contre la réplication du VEB, mais n'ont aucun effet sur les cellules infectées en phase latente (108). En supposant que la phase lytique joue un rôle dans le développement des SLP, les antiviraux pourraient théoriquement être utilisés comme thérapie préventive pour les patients à risque. Bien que les antiviraux soient régulièrement administrés en combinaison avec d'autres agents thérapeutiques comme traitement pour les SLP, peu d'études ont investigué le potentiel prophylactique de ces agents et les résultats de ces études sont plutôt contradictoires. Deux études rétrospectives, l'une incluant 127 patients (28) et l'autre, 206 patients (29) recevant soit le ganciclovir ou l'acyclovir, ont évalué que l'administration d'antiviraux diminuait le risque de développement de SLP. La première étude (28) donnait un taux d'incidence de SLP de 0,8% contre 7,6% pour le groupe contrôle et la deuxième (29) avait un taux de SLP de 1,4% mais ne fournissait pas de comparaison avec un groupe contrôle, ce qui limite la portée des conclusions que l'on peut en tirer. Également, une étude rétrospective dans un centre français dont le traitement prophylactique incluait l'administration à long terme d'acyclovir a dévoilé

un taux de SLP significativement plus bas que ceux généralement observés (1,8% contre 6,4% à 20%) (102). Green *et al.* ont évalué l'administration prolongée d'acyclovir suite à l'injection de ganciclovir comme traitement préventif des SLP et ont conclu que le traitement d'acyclovir ne réduisait pas le taux d'incidence de la maladie, mais qu'elle semblait plutôt l'augmenter par rapport au groupe contrôle ayant reçu seulement le ganciclovir (55). Finalement, un essai multicentrique incluant 100 patients présentant un SLP a observé une diminution du risque de SLP allant jusqu'à 83% pour les patients ayant reçu le ganciclovir, l'acyclovir ayant une efficacité moins grande (48). Les antiviraux semblent donc avoir un potentiel prophylactique mais plus d'études cliniques randomisées sont requises pour confirmer l'efficacité de ces agents thérapeutiques. De plus, le rôle que joueraient les antiviraux dans la prévention des SLP demeure ambiguë et certains stipulent que les antiviraux agiraient en prévenant des infections virales diverses telles qu'une infection par le cytomégalovirus, considéré comme un facteur de risque pour les SLP, et non en inhibant spécifiquement le VEB (134).

#### **1.4.4.2 Induction du cycle lytique**

De nouvelles stratégies fondées sur l'idée que l'induction du cycle lytique pourrait favoriser la destruction des cellules tumorales sont présentement à l'étude. En théorie, les cellules infectées en phase latente pourraient être stimulées à entrer dans le cycle lytique, ce qui résulterait en la mort cellulaire de la cellule infectée (83). De plus, ces cellules deviendraient plus sensibles aux antiviraux. Quelques approches ont été expérimentées pour induire le cycle lytique chez des cellules en phase latente. L'utilisation d'un vecteur adénoviral exprimant deux protéines très précoces du cycle

lytique, BZLF1 ou BRLF1, en est une première (45). Des drogues ont aussi été identifiées comme inducteur du cycle lytique, par exemple la gemcitabine et la doxorubicine (43), le butyrate (50, 114) ou encore une combinaison de Rituximab et de dexaméthasone (27). Ces agents rendent les cellules infectées particulièrement plus sensibles au ganciclovir. Cette situation a également été observée avec plusieurs agents chimiothérapeutiques (44). Cette catégorie d'approches thérapeutiques n'a cependant pas encore atteint le stade clinique, sauf pour un agent : le butyrate (132). En effet celui-ci a été administré en combinaison avec le ganciclovir chez 15 patients présentant des tumeurs lymphoïdes positive pour le VEB. Quatre patients ont obtenu une rémission complète et six autres, une rémission partielle, après un cycle de traitement. Les résultats de cette étude confirment donc le potentiel de cette approche innovatrice pour le traitement des patients présentant un SLP et ouvre la voie aux autres agents de cette catégorie.

#### **1.4.4.3 Vaccins en développement**

Un vaccin contre le VEB pourrait s'avérer utile pour prévenir l'infection chez les receveurs séronégatifs, les patients les plus à risque de développer un SLP. Un vaccin développé avec une gp350 recombinante est présentement à l'étude et les résultats de deux essais cliniques (phase I/II et phase II) ont été publiés dans la dernière année (118, 151). Les résultats sont prometteurs mais l'efficacité du vaccin reste à être démontrée. Dans la première étude menée chez 148 individus sains, séropositifs ou séronégatifs, un seul événement indésirable grave possiblement en lien avec le vaccin s'est manifesté (118). Le vaccin a entraîné une réponse humorale contre la gp350 chez tous les sujets et même la production d'anticorps neutralisants

en moyenne dans 68% des cas. La deuxième étude clinique visait à évaluer l'efficacité du vaccin à induire une protection contre le développement de la mononucléose infectieuse et incluait 181 individus séronégatifs qui ont été divisés en deux groupes égaux : l'un ayant reçu le vaccin gp350 et l'autre, un placebo (151). Dans le premier groupe, deux individus ont développé une mononucléose infectieuse au cours d'une période de suivi de 18 mois, alors que le nombre de cas de mononucléose infectieuse dans le groupe placebo était de huit. Cette différence n'étant pas statistiquement significative, l'efficacité du vaccin devra être démontrée dans une étude clinique plus large, d'autant plus que le vaccin ne bloque pas l'infection asymptomatique par le VEB. L'utilité du vaccin gp350 pour la prévention des SLP est purement spéculative présentement, mais il est logique de penser que l'immunisation des receveurs de greffe séronégatifs pourrait leur fournir une protection, du moins humorale, contre les conséquences d'une infection primaire par le VEB. La réponse des LTC, qui est importante pour le contrôle de la prolifération des cellules infectées, ne semble pas faire partie du mécanisme de protection de ce vaccin. D'où la pertinence d'un autre vaccin en développement visant à induire une réponse des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> par la présentation d'un épitope de la protéine de latence EBNA-3 (39). Les résultats d'une étude clinique de phase I ont récemment été publiés. Huit individus ayant reçu le vaccin ont développé une réponse spécifique à l'épitope et quatre individus ayant acquis le VEB par la suite n'ont pas développé de mononucléose infectieuse. Dans le groupe placebo, deux individus sur quatre ont acquis le virus et un de ces deux individus a développé une mononucléose infectieuse. Ce vaccin ouvre donc la voie à une nouvelle option prophylactique qui

pourrait s'avérer particulièrement bénéfique dans la prévention des SLP en offrant une protection spécifique et à long terme.

Des vaccins peptidiques ont également été suggérés pour provoquer une réponse protectrice des cellules T (126). En effet, cette étude préliminaire effectuée *in vitro* a démontré qu'un peptide provenant d'un épitope de l'antigène EBNA-2 pouvait entraîner une réponse des cellules T CD4+ inhibant la prolifération de lymphocytes B causée par le VEB. De plus, ce peptide peut se lier à sept allèles différents du complexe d'histocompatibilité majeur II (CMH II) et serait ainsi reconnu par plus de 50% de la population. Cette dernière caractéristique est importante puisqu'un des défis majeurs des vaccins peptidiques est justement la faible proportion habituelle de patients possédant le CMH spécifique pouvant se lier au peptide utilisé dans le vaccin (12). Finalement, une toute nouvelle approche pour un vaccin a été développée, qui consiste à utiliser un mélange d'antigènes lytiques et d'antigènes latents. Ce mélange a permis l'induction d'une réponse humorale par la production d'anticorps neutralisants ainsi qu'une réponse des lymphocytes T spécifiques au VEB lors de l'inoculation chez des souris (110). Cette stratégie offrirait théoriquement une protection plus vaste contre le VEB et semble très prometteuse.

#### **1.4.5 Sommaire des traitements**

Une variété de traitements ont été développés ou sont actuellement en développement pour offrir des alternatives thérapeutiques aux patients souffrant d'un SLP pour qui la réduction du régime immunosuppresseur ne permet pas de combattre la maladie (Tableau II). Les résultats des études discutées ici sont encourageants pour ces

patients dont le pronostic est généralement mauvais. L'idéal pour ces patients serait de pouvoir prévenir la maladie. La majorité des SLP sont causés par le VEB et un agent thérapeutique efficace pouvant bloquer l'infection primaire des lymphocytes B chez un hôte immunodéprimé pourrait, en théorie, empêcher le développement d'un SLP. Les antiviraux et le vaccin gp350 en étude clinique n'ont pas obtenu l'efficacité souhaitée jusqu'à ce jour et les vaccins peptidiques ne sont toujours pas au stade des essais cliniques. Il semble donc nécessaire de mettre au point un traitement prophylactique sécuritaire et efficace pour les patients les plus à risque de développer un SLP.

**Tableau II.** Sommaire des traitements actuels et en développement pour les SLP

<b>Catégories et traitements</b>	<b>Objectif du traitement</b>
<i>Régime immunosuppresseur</i>	
Diminution	Rétablir partiellement la réponse immunitaire (LTC)
Changement des médicaments	Rétablir partiellement la réponse immunitaire (LTC)
Rapamycine	Tirer profit de ses propriétés antiprolifératives
<i>Thérapies anticancéreuses</i>	
Chirurgie locale avec ou sans radiothérapie	Enlever les tumeurs localisées
Ablation par radiofréquence	Enlever les tumeurs localisées avec une toxicité plus faible
Chimiothérapie (ex. CHOP)	Détruire les cellules en prolifération
Rituximab	Détruire spécifiquement les cellules B en prolifération
<i>Modulation de la réponse immunitaire</i>	
Interférons	Augmenter l'activité antivirale des cellules NK et T
Anticorps anti-IL6	Inhiber la croissance des cellules immortalisées par le VEB
Transfert adoptif de LTC	Rétablir partiellement la réponse des LTC pour combattre le SLP
<i>Traitements prophylactiques spécifiques au VEB</i>	
Antiviraux (acyclovir, ganciclovir)	Empêcher la réplication lytique du virus
Induction du cycle lytique	Rendre les cellules plus sensibles aux antiviraux
Vaccins	Immuniser les receveurs de greffe séronégatifs

### 1.5 Glycoprotéines de surface du VEB et entrée virale

L'enveloppe du VEB contient une dizaine de glycoprotéines identifiées à ce jour (tableau III) (78). Le rôle de ces protéines de surface semble principalement relié à l'entrée du virus, bien que la fonction de certaines ne soit pas encore déterminée. Le mécanisme d'entrée virale dans la cellule B implique au moins cinq glycoprotéines et se produirait comme suit. La gp350 du virus interagit avec le récepteur du complément CR2 (CD21) du lymphocyte B et cet événement est responsable de l'étape d'attachement du virus à la cellule (121). Le processus de fusion des membranes requiert l'interaction de gp42 avec le CMH II (119, 177) mais également trois autres protéines : gH, gL et gB. Il semble que gp42, gH et gL s'associent pour former un complexe stable (90). La protéine gL jouerait un rôle de chaperon en contribuant à la maturation et à l'exportation de gH (105). La protéine gH, quant à elle, est responsable de l'interaction avec gp42 (89) et des expériences de mutagenèse dirigée ont révélé que la partie N-terminale de la protéine gH serait un élément important pour la fusion des membranes (125). Finalement, la contribution de la protéine gB n'a pas été complètement déterminée, mais il semble que celle-ci soit également essentielle à la fusion des membranes (113) et que les résidus hydrophobiques des boucles de fusion de la protéine soient importants pour cet événement (3).

**Tableau III.** Glycoprotéines de l'enveloppe du virus EB et fonction identifiée pour l'entrée dans la cellule B

<b>Glycoprotéine</b>	<b>Gène associé</b>	<b>Implication dans l'entrée de la cellule B</b>
gp350	BLLF1	Attachement au récepteur CR2/CD21
gp42	BZLF2	Liaison au CMH II et fusion des membranes
gp78	BILF2	
gp150	BDLF3	
gB	BALF4	Fusion des membranes
gH	BXLF2	Liaison à gp42 et fusion des membranes
gL	BKRF2	Maturation et exportation de gH
gM	BBRF3	
gN	BLRF1	
BMRF2	BMRF2	

Toutes ces protéines jouent donc un rôle de premier plan dans l'entrée virale, mais l'interaction de la gp350 avec le récepteur CR2 demeure l'étape initiale critique du processus. Bien qu'il ait été suggéré que des molécules autres que la gp350 peuvent être responsables de l'attachement viral aux lymphocytes, l'efficacité d'infection est considérablement réduite (77). Ceci indique que la gp350 n'est peut-être pas la seule protéine d'attachement mais elle est nettement celle qui prévaut. C'est d'ailleurs la glycoprotéine de surface du virus ayant été la plus étudiée. La gp350 est la glycoprotéine de l'enveloppe la plus volumineuse et l'une des plus abondantes (78), première observation supportant le modèle d'attachement par cette glycoprotéine. La région codant pour la gp350 semble être hautement conservée entre les types 1 et 2 du VEB (99) et un virus présentant une délétion touchant cette région du génome rend le virus incapable de se répliquer (98). Tout indique donc que cette

glycoprotéine est très conservée parmi les différentes souches de VEB qui, de plus, est un virus à ADN (les virus à ADN ont un taux de mutations beaucoup moins élevé que les virus à ARN car la polymérase à ADN possède une activité correctrice). La gp350 réfère en fait à deux glycoprotéines, gp350 et gp220, dérivées de l'épissage alternatif du même transcrit primaire d'ARN (4). La gp350 forme une protéine de 907 acides aminés alors que la gp220 en contient 658, soit une délétion interne de 249 acides aminés. Les deux formes sont exprimées sur l'enveloppe du virus et se lient similairement au récepteur CR2 (159), indiquant que les deux glycoprotéines sont impliquées dans l'entrée virale. La séquence supplémentaire à l'intérieur de la gp350 pourrait jouer un rôle dans la fusion des membranes (159). La dénomination gp350 dans le présent texte réfère aux deux formes de la glycoprotéine, à moins d'indication contraire.

Quelques études ont trouvé des similarités entre la structure du ligand naturel du CR2, la protéine du complément C3 ou plus précisément le fragment C3d, et la structure de la gp350 (121, 159). Mais ce n'est que plus récemment que des études portant spécifiquement sur la structure de la gp350 et sur les sites d'interaction avec le récepteur CR2 ont été menées (157, 171, 183). Le poids moléculaire élevé de la gp350 provient d'une glycosylation importante de la protéine. En effet, la région N-terminale contenant les acides aminés 1 à 470 contient à elle seule 14 chaînes de polyglycanes distribuées un peu partout à la surface de la protéine (157). Cette glycosylation serait importante pour stabiliser la protéine et peut-être même la protéger contre la protéolyse mais ne serait pas impliquée dans la liaison au récepteur CR2. En effet, les trois domaines de liaison identifiés par mutagenèse dans cette

étude se situeraient dans la seule région non glycosylée de cette partie de la protéine (157). Deux de ces domaines ont également été identifiés dans une autre étude comme des régions de liaison au récepteur CR2 (171). La structure du récepteur CR2 a aussi été étudiée et il a été démontré que deux domaines extracellulaires, dénommés SCR1 et SCR2, interagissent directement par contact avec la gp350 (183). De plus, ces deux régions contiennent plusieurs acides aminés positivement chargés alors que la région de liaison de la gp350 précédemment identifiée aurait une charge plutôt négative (157).

La gp350 joue donc un rôle clé dans le déroulement initial de l'infection des lymphocytes B par le VEB et, par conséquent, dans le développement des SLP de cellules B. L'importance de cette glycoprotéine se manifeste à plusieurs niveaux. Par exemple, la gp350 stimule la production et la sécrétion d'IL-6 par les lymphocytes B *in vitro* (161) ce qui favoriserait la croissance des tumeurs VEB-positives (169). La gp350 pourrait aussi exercer son effet protumoral en entraînant l'apoptose des lymphocytes T par l'induction de Fas (160).

L'immunisation par la gp350 confère une certaine protection contre le VEB et est la composante principale d'un vaccin présentement en études cliniques, tel que discuté précédemment. De plus, lors du cycle d'infection lytique, la gp350 est acheminée vers la membrane des cellules B infectées. Cette molécule est acquise par le virus lorsqu'il bourgeonne de la cellule, car ce dernier utilise la membrane de la cellule infectée comme enveloppe. Il a été démontré que la gp350 exprimée à la surface de ces cellules pouvait être une cible pour le mécanisme d'ADCC (86). Finalement, la

réponse humorale contre le VEB produit des anticorps majoritairement contre la gp350, du moins lors de l'inoculation chez les animaux, dont certains sont neutralisants (68, 135, 162, 164), ce qui fait de cette protéine une cible de choix pour neutraliser le virus et ainsi bloquer l'infection des cellules B.

### **1.6 Anticorps monoclonal murin 72A1**

En 1980, Hoffman *et al.* ont produit un anticorps monoclonal murin neutralisant le VEB par l'immunisation de souris avec le virus et la fusion subséquente de cellules de la rate avec la lignée cellulaire de myélome P3X63Ag8 pour produire des hybridomes (68). Un de ces hybridomes, le 72A1, sécrétait une immunoglobuline G (IgG) spécifique à la gp350 et avait une activité neutralisante contre le VEB. L'anticorps prit le même nom que la lignée cellulaire le sécrétant. L'anticorps monoclonal 72A1 reconnaît la gp350 d'au moins une dizaine de lignées cellulaires humaines et de ouistiti produisant le VEB et peut neutraliser différentes souches de virus provenant de ces lignées (68, 115). Il reconnaît les deux formes de la glycoprotéine, gp350 et gp220, et neutralise le virus en empêchant son attachement au récepteur CR2 (159). L'anticorps bloque l'infection des lymphocytes B par le VEB, mais également l'infection de leucocytes tels que les neutrophiles (138) et les monocytes (142), ainsi que des lymphocytes T (67). Il avait été suggéré que l'épitope reconnu par l'anticorps se situait près du domaine de liaison au récepteur CR2, alors déterminé dans la partie N-terminale de la gp350 et plus précisément entre les acides aminés 1 et 162 de la protéine (159). Néanmoins, les études plus récentes menées sur la gp350 et le récepteur CR2 ont identifié d'autres régions pouvant être impliquées dans la liaison des deux molécules, une de ces régions se trouvant même dans le

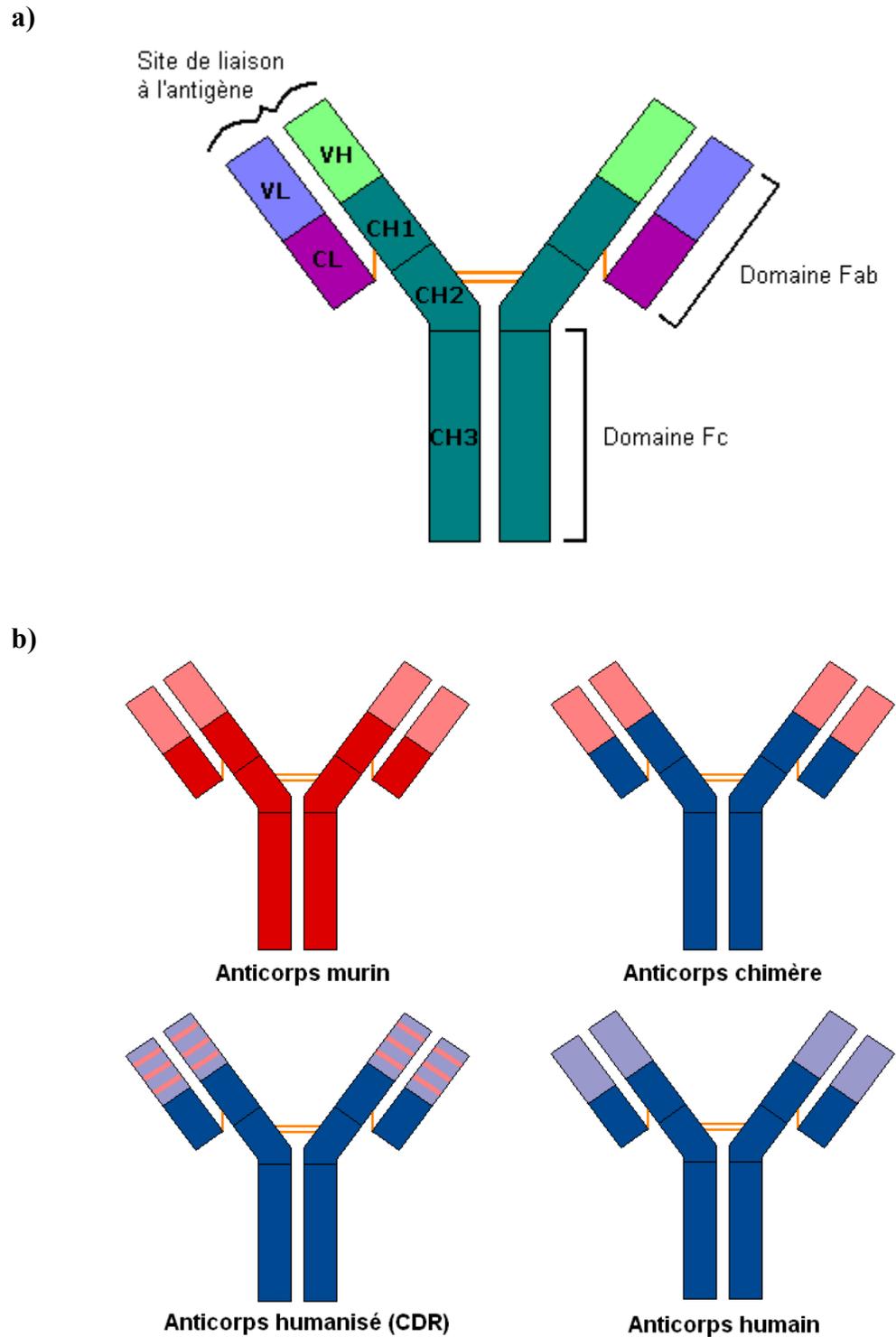
domaine C-terminal de la protéine (157, 171, 183). Il n'est donc pas clair où se trouve l'épitope reconnu par le 72A1 et il serait intéressant d'élucider la structure primaire de l'anticorps pour effectuer des analyses structurales tridimensionnelles de l'interaction entre le 72A1 et la gp350.

Il a été démontré récemment que l'anticorps 72A1 avait la capacité d'inhiber le développement de tumeurs causées par le VEB *in vivo* (62). Haque *et al.* ont en effet testé l'anticorps chez 12 souris SCID auxquelles ils ont injecté d'abord des LCL de donneurs séronégatifs, puis le VEB. Aucune des 12 souris n'a développé de tumeurs par rapport au groupe contrôle dans lequel huit souris sur 12 ont présenté des tumeurs causées par le virus. Ces expériences ont donné suite à un essai pilote dans lequel l'anticorps 72A1 a d'abord été testé chez un adulte en santé, puis chez quatre enfants séronégatifs recevant une greffe du foie provenant de donneurs séropositifs pour le VEB. L'étude contenait également un groupe contrôle constitué de trois autres patients pédiatriques ne recevant pas l'anticorps. Après une période de suivi de quatre ans, aucun des enfants n'a développé de SLP, ni dans le groupe test ni dans le groupe contrôle. L'ADN du virus a été détecté chez trois des quatre enfants ayant reçu l'anticorps et chez deux enfants du groupe contrôle à des temps variant entre 18 et 48 mois suite à la transplantation. Étant donné la faible étendue de l'étude, le but n'était pas d'évaluer l'efficacité mais bien la sécurité de l'anticorps. Tous les enfants ayant reçu l'anticorps ont développé une réponse humorale de type HAMA (« human anti mouse antibody ») contre l'anticorps murin et ce, malgré le régime d'immunosuppression administré. Cette réponse présente un risque pour le patient, mais diminue également l'efficacité de l'anticorps puisqu'il est éliminé plus

rapidement par le système réticulo-endothélial (158). Dans le cadre de l'étude, un des quatre enfants a présenté une réaction d'hypersensibilité sévère qui pourrait être en lien avec l'anticorps. Donc, en raison de la présence d'HAMA et de la réaction d'hypersensibilité observée, l'anticorps murin 72A1 ne semble pas être sécuritaire pour une utilisation clinique. L'humanisation de cet anticorps, qui permettrait de le rendre plus sécuritaire et possiblement plus efficace, rendrait possible la poursuite de cette voie comme agent prophylactique pour les patients à risque de SLP.

### **1.7 Humanisation des anticorps**

La structure d'un IgG est constituée de deux chaînes lourdes (HC pour « heavy chain ») d'environ 50 kDa et de deux chaînes légères (LC pour « light chain ») d'environ 25 kDa. La HC est composée d'un domaine variable ( $V_H$ ) et de trois domaines constants ( $C_H$ ), alors que la LC contient un domaine variable ( $V_L$ ) et un seul domaine constant ( $C_L$ ) (figure 2). Les chaînes sont liées ensemble principalement par des liaisons disulfures et les régions codant pour les acides aminés de ces liaisons sont très conservées (49). Les domaines variables contiennent la spécificité à l'antigène à l'intérieur de trois régions hypervariables (ou CDR pour « complementarity-determining regions ») par lesquelles l'anticorps se lie à l'antigène. Ces régions sont entourées de quatre régions de charpente (ou FR pour « framework regions »).

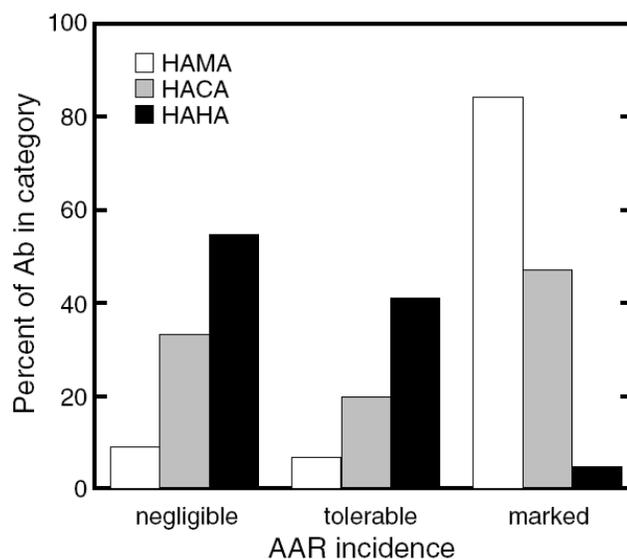


**Figure 2.** a) Structure d'un IgG montrant les différentes régions et les domaines importants. b) Méthodes d'humanisation des anticorps.

Plus d'une vingtaine d'anticorps monoclonaux ont été approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) aux États-Unis pour utilisation thérapeutique. Le premier fut approuvé en 1986; il s'agit d'OKT3 (Muromonab-CD3), un anticorps pan-T murin utilisé comme agent immunosuppresseur en transplantation (165). Mais l'anticorps engendre une réponse HAMA chez la plupart des patients (88) ce qui limite son utilisation. Depuis, plusieurs techniques ont été mises au point pour réduire l'immunogénicité des anticorps murins et ont permis le développement d'anticorps humanisés approuvés par la FDA pour une utilisation clinique. Les techniques principales peuvent être regroupées en trois catégories : les anticorps humanisés par construction, les anticorps humains générés de novo et les fragments d'anticorps.

La première catégorie contient des méthodes de construction d'anticorps assemblant des régions d'anticorps murins et d'anticorps humains. La chimérisation est la technique la plus simple qui consiste à lier les régions variables de l'anticorps de souris aux régions constantes d'un anticorps humain (49). Le Rituximab (Rituxan) est un exemple d'anticorps chimère approuvé par la FDA, tel que discuté précédemment. L'anticorps chimère généré par cette méthode est constitué d'environ 70% de régions de source humaine et diminue grandement l'immunogénicité de l'anticorps, mais la région variable de souris constitue encore une source de réponse HAMA. Une technique permettant de réduire davantage l'immunogénicité consiste à insérer les CDR de l'anticorps de souris dans une charpente d'anticorps humain (49). Cette méthode est plus difficile à réaliser parce que le changement des CDR a souvent comme résultat de diminuer considérablement l'affinité de l'anticorps pour

son antigène. La solution consiste généralement à identifier à l'aide de logiciels les acides aminés pouvant interférer avec les CDR ou avec l'antigène et à les modifier par mutation inverse. Plusieurs variantes de cette technique ont été mises au point, soit pour diminuer le risque d'une réduction d'affinité (par exemple en identifiant le squelette IgG humain étant le plus similaire au niveau des CDR à l'anticorps murin afin que la structure des CDR greffés soit la moins altérée possible (72)), ou encore pour diminuer davantage l'immunogénicité de l'anticorps (en ne changeant que les acides aminés les plus importants à l'interaction anticorps-antigène, lorsque celle-ci est relativement bien caractérisée (81)). L'effet escompté de la méthode des CDR sur l'immunogénicité est généralement observé, mais le défi demeure de conserver l'efficacité de l'anticorps. Hwang *et al.* ont réalisé une étude intéressante comparant l'immunogénicité des anticorps murins, des anticorps chimères et des anticorps humanisés par l'insertion des CDR en révisant les données publiées sur le sujet entre 1984 et 2003 (73). Ils ont classé la fréquence des réponses de type HAMA observées en trois catégories : négligeable (réponse HAMA chez moins de 2% des patients), acceptable (entre 2% et 15%) et marquée (plus de 15%). Les résultats sont résumés dans la figure 3. Bien que les conclusions d'une telle étude soient limitées par les différences de conditions d'utilisation et de types d'anticorps, une tendance générale ressort illustrant bien la contribution des deux méthodes d'humanisation sur l'immunogénicité d'un anticorps.



**Figure 3.** Graphique représentant l’immunogénicité des anticorps murins, chimères et humanisés par insertion de CDR. AAR: « anti-antibody response »; HAMA : « human anti-mouse antibody »; HACA : « human anti-chimeric antibody » ; HAHA : « human anti-humanized antibody ». (Figure reproduite avec autorisation de Hwang *et al.* (73))

La deuxième catégorie regroupe les méthodes de production d’anticorps totalement humains par la mise au point *in vitro* d’une librairie d’anticorps ou par l’utilisation de souris transgéniques. Cette catégorie repose davantage sur la sélection des anticorps ayant la meilleure affinité avec l’antigène que sur la construction d’un anticorps à partir d’un anticorps murin connu. Les bibliothèques d’anticorps contiennent un vaste répertoire de gènes codant pour des segments réarrangés d’anticorps humains et sont générées de diverses façons. Les fragments produits peuvent contenir soit  $V_H$  et  $V_L$  (fragment scFv) ou  $V_L-C_L$  et  $V_H-C_H1$  (fragment Fab) (15). Ces fragments sont exposés à la surface d’un vecteur tel qu’un phage, une bactérie, une levure ou encore un ribosome. Le ou les meilleurs fragments sont sélectionnés par la liaison à

l'antigène désiré et ensuite combinés à un squelette d'IgG pour former un anticorps complet. Le développement de la librairie requiert une grande expertise mais, une fois générée, la production d'anticorps peut se faire en quelques semaines. Un seul anticorps produit par cette technique a été approuvé par la FDA jusqu'à maintenant; il s'agit d'Adalimumab (Humira), un anticorps utilisé pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde et de certaines autres maladies auto-immunes (129).

Les souris transgéniques sont des souris dont le système humoral a été inactivé et dans lesquelles la majorité des gènes humains codant pour les HC et LC ont été introduits. L'immunisation de ces souris avec un antigène d'intérêt permet la production d'un répertoire d'anticorps humains spécifiques à l'antigène et ayant traversé les différentes étapes de maturation et de sélection. La technologie des hybridomes permet ensuite d'établir des lignées immortalisées produisant les différents anticorps et sert à la sélection des meilleurs IgG présentant la plus haute affinité à l'antigène. Le premier anticorps produit par ces souris, le Panitumumab (Vectibix), a été approuvé par la FDA en 2006 pour le traitement du cancer colorectal (76). D'une façon générale, les anticorps humains générés par ces deux méthodes semblent avoir une immunogénicité faible ou même négligeable, mais il est étonnant de constater que dans certaines situations, une réponse humorale, parfois même neutralisante, contre l'anticorps thérapeutique est tout de même observée (6, 76).

La troisième et dernière catégorie regroupe divers fragments d'anticorps dont la région constante a été partiellement ou totalement retirée. La demi-vie de ces fragments n'est que de quelques heures, car la région Fc (manquante pour les

fragments d'anticorps) protège l'anticorps de la dégradation par sa liaison à des récepteurs à la surface des cellules réticulo-endothéliales (87). Les fragments d'anticorps, qui ne peuvent se lier à ces récepteurs, sont donc éliminés rapidement par le système réticulo-endothélial. De plus, la perte de la région Fc empêche l'activation des mécanismes de cytotoxicité tels que l'ADCC et la CDC. Par contre, ces fragments pénètrent plus facilement les tissus. Leur utilité se retrouve donc plutôt dans des tests diagnostiques par imagerie mais, de plus en plus, leur potentiel comme agent thérapeutique semble augmenter (69).

Le tableau IV présente un sommaire des méthodes principales utilisées pour humaniser ou produire un anticorps humain et chacune a ses avantages et ses inconvénients. Le choix de la méthode utilisée pour générer un anticorps thérapeutique dépendra du degré d'humanisation recherché, de l'application thérapeutique désirée, des techniques disponibles dans un laboratoire et de son expertise, etc. Peu importe la technique sélectionnée, la réduction d'immunogénicité obtenue permettra la production d'un agent thérapeutique beaucoup plus sécuritaire qu'un anticorps murin.

**Tableau IV.** Méthodes d’humanisation ou de production des anticorps humains et exemples d’anticorps approuvés par la FDA pour une utilisation thérapeutique.

Catégorie et méthode	Anticorps	Marque de commerce	Année d’approbation
Anticorps humanisés par construction			
Chimérisation	Abciximab	ReoPro	1994
	Rituximab	Rituxan	1997
	Cetuximab	Erbitux	2004
Insertion des CDR	Daclizumab	Zenapax	1997
	Alemtuzumab	Campath	2001
	Eculizumab	Soliris	2007
Anticorps complètement humains générés de novo			
Libraire de phage	Adalimumab	Humira	2002
Souris transgénique	Panitumumab	Vectibix	2006
Fragments d’anticorps			
Région Fc ou Fab	-----	-----	-----

### 1.8 Le projet

Les SLP de cellules B causées par le VEB sont des maladies lymphoprolifératives fréquemment diagnostiquées en greffe pédiatrique. Ces patients représentent le groupe le plus à risque en raison de leur bas âge et de leur statut séronégatif pour le virus dans une grande proportion des cas. L’implication du cycle lytique du VEB, jusqu’ici probablement sous-estimée, ouvre la voie à une nouvelle approche thérapeutique. Bien que plusieurs traitements aient été développés pour combattre la maladie, très peu d’entre eux visent à bloquer l’infection par le virus et ceux ayant cet

objectif n'atteignent malheureusement pas une grande efficacité à ce jour. Un traitement prophylactique spécifique pour le VEB visant à empêcher l'infection des cellules B pourrait donc s'avérer d'une grande utilité chez les patients à risque de développer un SLP.

Le projet présenté ici se fonde sur l'hypothèse nouvelle de l'importance du rôle du cycle lytique dans la pathogenèse des SLP afin de développer un agent thérapeutique qui pourrait bloquer l'infection des cellules B par le VEB. L'objectif précis est ainsi de construire un anticorps monoclonal chimère contre la gp350 du VEB ayant la capacité de neutraliser le virus. La chimérisation de l'anticorps murin 72A1 est la méthode sélectionnée en raison de la simplicité théorique de la technique. De plus, l'anticorps chimère serait utilisé dans un contexte où le patient reçoit des médicaments immunosuppresseurs. Une réponse forte contre la partie murine résiduelle de l'anticorps est donc peu probable et ne représente pas un risque considérable.

La construction de l'anticorps monoclonal chimère contre la gp350 s'est avérée difficile. Chaque chaîne de l'anticorps devait être construite séparément, en assemblant les régions variables de l'anticorps 72A1 aux régions constantes d'un anticorps humain. Quelques versions de l'anticorps ont été développées. La LC présentée ici constitue la version complète et achevée de cette chaîne, les résultats de séquençage confirmant l'authenticité et l'assemblage adéquat des différentes régions. En ce qui concerne la HC, la construction de la dernière version est décrite et montrée dans le présent manuscrit, mais cette chaîne présente encore certains problèmes au

niveau de la région V<sub>H</sub>. L'anticorps formé par les deux chaînes présentées ici était exprimé en culture cellulaire et sécrété dans le milieu de culture, mais ne semblait pas reconnaître ou pouvoir se lier à la gp350. Une nouvelle région V<sub>H</sub> a récemment été identifiée et isolée et le laboratoire de Dr. Alfieri explorera cette voie pour le développement d'une autre version de la HC.

Une lignée cellulaire stable exprimant la gp350 a été développée pour effectuer des essais d'ADCC avec l'anticorps chimère lorsqu'il serait obtenu. Les cellules Daudi et Raji semblaient exprimer la protéine à leur surface, mais celle-ci n'était pas reconnue spécifiquement par l'anticorps murin 72A1. La gp350 exprimée à la surface des cellules CEM, par contre, l'était très bien. Un clone en particulier, dont l'expression semblait spécialement forte, a été sélectionné pour cette utilisation future.

## **CHAPITRE DEUXIÈME**

### **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## 2.1 Lignées cellulaires utilisées

Plusieurs lignées cellulaires ont été utilisées à différentes étapes du projet. Le tableau V fournit certaines informations sur ces lignées. Les cellules étaient entretenues dans le milieu mentionné dans le tableau et divisées (1:10) à tous les 3 ou 4 jours. Les lignées cellulaires ont été acquises de la compagnie ATCC (Manassa, Virginie, États-Unis). Tous les milieux de culture provenaient de la compagnie Invitrogen (Burlington, Ontario, Canada) et contenaient un supplément de L-glutamine ainsi que du sérum fœtal de veau (SFV) (Wisent, St-Bruno, Québec, Canada) à une concentration de 10%. De plus, un mélange d'antibiotiques constitué de pénicilline et de streptomycine (Invitrogen) a été ajouté aux milieux de culture à une concentration finale de 100 µg/mL pour éviter la contamination des lignées cellulaires. Les cellules étaient conservées dans un incubateur maintenu à 37°C et à une concentration de 5% en CO<sub>2</sub>.

**Tableau V.** Lignées cellulaires utilisées, description et milieu de culture pour l'entretien des cellules.

<b>Lignée</b>	<b>Description</b>	<b>Milieu de culture</b>
72A1	Hybridome murin dérivé de la fusion de P3X63Ag8 et de cellules de la rate de souris BALB/C immunisées avec le VEB. Cette lignée produit un IgG1 neutralisant le VEB.	RPMI 1640
CHO-K1	Lignée ovarienne de hamster chinois.	F-12 Kaighn
B95-8	Lignée B de singes ouistiti dont les lymphocytes du sang périphérique ont été infectés <i>in vitro</i> par le VEB provenant de la salive d'un cas de mononucléose infectieuse. Cette lignée produit une souche de VEB transformants.	RPMI 1640
CEM	Lignée de lymphocytes T provenant d'une patiente humaine caucasienne souffrant d'une leucémie lymphoblastique aiguë.	RPMI 1640
Daudi	Lignée de lymphocytes B d'un patient africain ayant un lymphome de Burkitt VEB-positif (1967)*.	RPMI 1640
Raji	Lignée de lymphocytes B d'un patient africain ayant un lymphome de Burkitt VEB-positif (1963)*.	RPMI 1640
PA317	Lignée fibroblastique murine dérivée de la lignée NIH/3T3.	DMEM

\* Année d'établissement de la lignée cellulaire utilisée pour différencier ces deux lignées.

## 2.2 Plasmides utilisés et cellules compétentes pour les transformations

La construction de l'anticorps chimère a nécessité l'utilisation de plasmides pour le clonage des fragments d'ADN et d'un plasmide d'expression pouvant contenir les chaînes chimères (tableau VI). Les trousse de clonage utilisées étaient les suivants : Zero Blunt Topo PCR Cloning Kit (Invitrogen), Topo TA Cloning Kit for

Sequencing (Invitrogen) et le pcDNA3.1/V5-His TOPO TA Expression Kit (Invitrogen) et les cellules chimiquement compétentes étaient les One Shot Mach1-T1 (Invitrogen) fournies avec les trousse de clonage. Les cartes génétiques de ces plasmides se trouvent à l'annexe I (figures 21 à 23).

**Tableau VI.** Plasmides de clonage et d'expression utilisés, longueur et antibiotique de sélection. La concentration utilisée est indiquée entre parenthèses.

Plasmide	Longueur (pb)	Antibiotique de sélection ( $\mu\text{g/mL}$ )
pCR-Blunt II-TOPO	3519	Kanamycine (50)
pCR4-TOPO	3956	Kanamycine (50) et/ou ampicilline (100)
pcDNA3.1/V5-His TOPO	5523	Néomycine/G418 (500) et/ou ampicilline (100)

pb : paires de bases

### 2.3 Méthodes communes de manipulation des acides nucléiques

Cette section décrit les protocoles généraux de diverses manipulations de l'ADN et de l'ARN qui ont été utilisées tout au long de la construction de l'anticorps chimère.

#### 2.3.1 Extraction d'ARN et production d'ADNc

L'ARN total a été isolé de  $8 \times 10^6$  cellules 72A1 à l'aide du Tri-Reagent (Molecular Research Center, Montréal, Québec, Canada) selon le protocole fourni avec le produit en incluant les modifications suivantes : la quantité de chloroforme a été augmentée à 0,4 mL et les centrifugations ont été faites à 14 000 g pendant 30 minutes à 4°C. Également la période de précipitation à l'isopropanol était de 2 heures à -20°C. L'ADNc a été synthétisé à l'aide du Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit

(Invitrogen). Une amorce spécifique a été utilisée pour la synthèse de l'ADNc de la HC et des oligo (dT)<sub>20</sub>, pour la LC.

L'ARN a également été isolé de façon similaire à partir des cellules mononuclées de sang périphérique (PBMC) d'un volontaire humain pour obtenir les régions constantes d'un IgG humain. L'ADNc a été synthétisé par la même méthode à l'aide d'oligo (dT)<sub>20</sub>.

### **2.3.2 Extraction d'ADN plasmidique**

L'isolement de l'ADN plasmidique a été accompli de deux façons, selon la quantité d'ADN désirée. Pour les quantités faibles, par exemple pour les sélections de clones après une transformation, la méthode suivie est « Small-Scale Preparations of Plasmid DNA » (143) à partir de 1 mL de culture bactérienne, en incluant l'étape optionnelle de purification au phénol et chloroforme et en augmentant le temps de précipitation à l'éthanol à 1 heure à -20°C ainsi que le temps de centrifugation suite à la précipitation à 30 minutes. Pour les quantités plus importantes d'ADN plasmidique (séquençage ou transfection), l'ADN était isolé de 100 à 200 mL de culture bactérienne à l'aide du QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Mississauga, Ontario, Canada). Encore ici, l'étape de précipitation à l'isopropanol était d'une durée minimale de 3 heures à -20°C. Lorsque l'ADN était préparé pour une transfection, une étape additionnelle de purification au phénol et chloroforme (143) avec précipitation à l'éthanol était accomplie.

### **2.3.3 Amplification d'ADN par PCR**

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une des techniques à la base de la construction de l'anticorps chimère. La PCR a été utilisée entre autres pour l'amplification de l'ADNc des chaînes fonctionnelles et des fragments d'intérêt de l'anticorps murin et de l'anticorps humain, pour vérifier l'orientation d'un insert dans un plasmide ainsi que pour la confirmation de certaines séquences isolées. Selon le niveau de fidélité et l'extrémité 3' souhaités, différentes enzymes ont été utilisées pour les réactions de PCR (tableau VII). Par exemple, lorsque l'on recherche un niveau de fidélité élevé, on choisit une enzyme ayant une activité correctrice exonucléase en 3'-5'. Également, certaines étapes nécessitaient des fragments d'ADN ayant une extrémité 3' franche (et non terminée par un A) pour conserver le cadre de lecture lors de la ligation des morceaux d'ADN. L'enzyme sélectionnée dans ce cas était donc l'AccuPrime Pfx DNA Polymerase (Invitrogen). Les PCR ont été complétées dans un TGradient Thermocycler (Biometra, Kirkland, Québec, Canada). Les produits étaient analysés par électrophorèse en gel d'agarose.

**Tableau VII.** Polymérase utilisées pour les PCR.

<b>Polymérase</b>	<b>Caractéristiques principales</b>	<b>Compagnie</b>
AccuPrime Pfx DNA Polymerase	Activité correctrice exonucléase en 3'-5'; extrémité 3' franche	Invitrogen
Platinum Taq DNA Polymerase	Enzyme activée seulement lors de la première étape à 94°C; extrémité 3' A	Invitrogen
Taq DNA Polymerase, Recombinante	Polymérase régulière; extrémité 3' A	Invitrogen
JumpStart AccuTaq LA DNA Polymerase Mix	Mélange de Taq et d'une polymérase ayant une activité correctrice exonucléase en 3'-5'; extrémité 3' A	Sigma

### 2.3.4 Analyse d'ADN par gel d'électrophorèse en agarose et extraction de l'ADN

Les gels d'électrophorèse en agarose ont servi à visualiser les bandes d'ADN d'intérêt suite aux PCR et aux digestions par enzyme de restriction ainsi qu'à purifier certains produits suite à une manipulation quelconque. Les gels d'agarose ont été fabriqués à partir d'UltraPure Agarose (Invitrogen) dans un tampon de Tris-Acetate-EDTA (TAE). La concentration des gels variait entre 0,8% et 2% selon la longueur de la bande à observer. Lorsque la bande d'intérêt devait être isolée et purifiée du gel, la trousse QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN) a été utilisée.

### 2.3.5 Ligation et clonage des fragments d'ADN

Les ligations des fragments d'ADN pour former les chaînes chimères ont été effectuées à l'aide de la T4 DNA Ligase (Invitrogen), selon le protocole pour les extrémités franches. Les fragments d'ADN étaient d'abord traités à la T4

Polynucleotide Kinase (Invitrogen) pour ajouter un groupement phosphate aux extrémités 5' des produits de PCR. Les amorces utilisées pour les PCR ne contiennent pas ce groupement phosphate et celui-ci est nécessaire pour la formation de la liaison phosphodiester entre deux nucléotides. Les ligations d'extrémités franches étaient complétées à 4°C pendant 20 à 24 heures. Une telle ligation peut générer plusieurs combinaisons de produits (différentes orientations et différents fragments). Le produit recherché était sélectionné et amplifié par PCR à l'aide d'amorces spécifiques aux extrémités 5' et 3' de la molécule complète.

Le clonage des produits d'intérêt dans les plasmides a été accompli grâce aux trousse mentionnées dans la section 2.2, selon le protocole fourni avec les modifications suivantes. La période de ligation était de 4 à 6 heures pour les plasmides pCR4-TOPO et pcDNA3.1/V5-His TOPO, et de 20h à 24h à 4°C pour le plasmide pCR-Blunt II-TOPO en raison des extrémités franches. Pour la transformation dans les cellules compétentes, l'étape à 42°C était prolongée à 1 minute 30 secondes. Les bactéries étaient mises 5 minutes sur la glace, puis 250 µL de milieu de culture SOC fourni avec la trousse était ajouté aux cellules pour une incubation de 1 heure à 37°C sur un agitateur à 150 rpm. Les bactéries étaient ensuite étalées sur des géloses sélectives et incubées à 37°C pendant une nuit. Des colonies étaient sélectionnées le lendemain et des cultures étaient préparées pour isoler une petite quantité d'ADN plasmidique. Les clones étaient finalement analysés par digestion à l'aide d'enzymes de restriction.

### **2.3.6 Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction**

Cette technique a été utilisée surtout pour identifier les clones renfermant l'insert d'intérêt suite à une étape de clonage. Les plasmides pCR-Blunt II-TOPO et pCR4-TOPO contiennent les séquences de restriction de l'enzyme EcoRI de chaque côté du site de clonage (voir annexe I), ce qui permet d'utiliser cette enzyme pour vérifier la présence de l'insert dans un clone. Le plasmide pcDNA3.1/V5-His TOPO, quant à lui, ne contient pas un tel arrangement. Les enzymes sélectionnées dans ce cas étaient HindIII et XbaI car elles nécessitent le même tampon. Toutes les enzymes de restriction provenaient de la compagnie Invitrogen. Les digestions étaient effectuées sur 10 µL d'ADN purifié dans un volume final de 20 µL, à 37°C pendant environ 2 heures et les produits étaient analysés par électrophorèse en gel d'agarose.

## **2.4 Séquençage**

Le séquençage a servi à déterminer des séquences inconnues de l'anticorps 72A1 et à confirmer l'assemblage des chaînes chimériques.

### **2.4.1 Séquençage peptidique**

L'extrémité N-terminale de chacune des chaînes de l'anticorps murin 72A1 a été séquencée. L'anticorps 72A1 a été préparé à partir de 200 mL de culture cellulaire ayant été transférés dans un milieu sans sérum 24 heures avant la purification de la protéine. L'anticorps a été purifié par deux passages successifs sur une résine de Protein A - Sepharose (Sigma, Oakville, Ontario, Canada) à un pH de 9 et à une concentration élevée en sel, soit 2 M de NaCl. L'élution de l'anticorps a été effectuée à un pH de 3. Le produit récolté a ensuite subi une autre étape de purification à l'aide

de colonnes Microcon Ultracel YM-10 (Millipore, Bedford, Massachusetts, États-Unis). L'anticorps purifié a été séparé en ses deux chaînes distinctes sur un gel d'acrylamide et SDS. L'échantillon a été chargé sur le gel de façon à obtenir une concentration finale de 100 pmol pour chaque bande/chaîne. L'anticorps a ensuite été transféré sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) par immunobuvardage Western. Les détails de cette technique sont expliqués dans une section ultérieure. La membrane contenant les deux bandes colorées au rouge de Ponceau a finalement été envoyée au laboratoire du Dr. Claude Lazure à l'Institut de recherche clinique de Montréal aux fins de séquençage de l'extrémité N-terminale. La moitié des bandes de la LC et de la HC ont été découpées en petits morceaux et analysées selon la méthode de dégradation d'Edman et avec les instruments décrits ici (96).

#### **2.4.2 Séquençage d'acides nucléiques**

Le séquençage d'ADN a été accompli à la Plate-forme génomique de l'Institut de recherche en immunologie et en oncologie de l'Université de Montréal. Les échantillons d'ADN plasmidique étaient préparés selon la méthode décrite à la section 2.3.2. La plupart des fragments séquencés étaient insérés dans les plasmides pCR-Blunt II-TOPO ou pCR4-TOPO qui contiennent la région M13 servant habituellement au séquençage. Des amorces contre ces deux régions ont donc été utilisées pour les réactions de séquençage dans ces plasmides. Le séquençage a été effectué en utilisant le BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Streetsville, Ontario, Canada). La réaction PCR incluait 25 cycles comme suit : 96°C – 15 secondes, 50°C – 5 secondes et 60°C – 4 minutes. Les

échantillons obtenus étaient ensuite analysés grâce au séquenceur automatique ABI 3730 (48 capillaires de 50 cm).

### **2.4.3 Analyse des séquences**

L'analyse des séquences nucléotidiques et peptidiques a été accomplie à l'aide du logiciel Vector NTI (Invitrogen). Des alignements BLAST ont été accomplis sur le site internet du National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). L'identification des CDR des chaînes de l'anticorps a été effectuée par l'outil en ligne IMGT/V-QUEST de l'International ImMunoGeneTics information system (<http://imgt.cines.fr>).

## **2.5 Sélection et amplification de la chaîne légère fonctionnelle de l'anticorps murin 72A1**

La présence de chaînes aberrantes non fonctionnelles dans l'ARNm de l'hybridome 72A1 a nécessité la mise au point de techniques permettant d'isoler la chaîne fonctionnelle désirée. La méthode utilisée pour l'isolement et l'amplification de la région variable de la LC est une modification de Yuan *et al.* (184). La PCR sélective a été effectuée à l'aide des amorces indiquées dans le tableau VIII. Un mélange équimolaire de quatre amorces contre l'extrémité 5' de la chaîne et une amorce contre l'extrémité 3' a été utilisé à la concentration habituelle de 10  $\mu$ M. De plus, une amorce additionnelle spécifique à la chaîne aberrante était incluse dans la réaction à une concentration de 175  $\mu$ M. La réaction PCR a été accomplie avec l'AccuPrime Pfx DNA Polymerase (Invitrogen) sur 3  $\mu$ L d'ADNc de l'hybridome 72A1 amplifié avec des oligo (dT) et contenait 35 cycles avec les paramètres suivants : 95°C – 1

minute, 55°C – 1 minute, 68°C – 1 minute 30 secondes. Les produits PCR ont été séparés par gel d'électrophorèse en agarose et la bande attendue a été isolée. L'ADN extrait de cette bande a été cloné à l'aide du Zero Blunt Topo PCR Cloning Kit (Invitrogen) et la sélection des clones a été faite par PCR sur préparation par ébullition (36). Rapidement, cette technique consiste à faire bouillir pendant 5 minutes 50 µL de culture des clones sélectionnés resuspendus dans 100 µL d'eau. Une quantité de 5 µL de surnageant était ensuite utilisée dans une réaction PCR avec la Taq DNA Polymerase, Recombinant (Invitrogen) et les amorces AbVk et MuKappa C-term. La réaction PCR de 35 cycles (94°C – 1 minute, 55°C – 1 minute, 72°C – 1 minute 30 secondes) incluait un contrôle négatif sans ADN. Les clones négatifs par rapport au contrôle ont été sélectionnés aux fins de séquençage.

**Tableau VIII.** Amorces utilisées pour l'amplification sélective de l'ADN de la LC fonctionnelle. Les quatre premières sont situées à l'extrémité 5' et la suivante est spécifique à la chaîne aberrante (tirées de Yuan *et al.*). La dernière amorce est complémentaire à l'extrémité 3' de la chaîne.

Nom	Séquence 5' – 3'
MKcL-3 5'	TTGCTGTTCTGGGTATCTGGTA
UMIgVk 5'	GACATTCTGATGACCCAGTCT
MVL 5'	GTGCCAGATGTGAGCTCGTGATGACCCAGTCTCCA
Sheriff Kappa 5'	GCCGAATTCGACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTC
AbVk 5'	ACCTATTACTGTCAGCACATTA
MuKappa Cterm 3'	TGTCTCTAACACTCATTCTGTTGAAGCTC

## 2.6 Construction des chaînes chimériques de l'anticorps

La construction des chaînes a été accomplie par la ligation des fragments d'intérêt aux extrémités franches afin de conserver le cadre de lecture. Les différentes régions ont d'abord été amplifiées par l'AccuPrime Pfx DNA Polymerase (Invitrogen) à partir de 2  $\mu$ L d'ADNc pour les régions C<sub>L</sub>, V<sub>H</sub> et C<sub>H</sub> et à partir du clone fonctionnel pour la région V<sub>L</sub>, avec les amorces délimitant les jonctions préétablies. Les V<sub>L</sub> et V<sub>H</sub> de l'anticorps murin 72A1 ont ensuite été liés respectivement aux C<sub>L</sub> et C<sub>H</sub> d'un IgG humain par la T4 DNA Ligase (Invitrogen). La séquence finale ayant la bonne composition et la bonne orientation des fragments a été sélectionnée par PCR à l'aide de la JumpStart AccuTaq LA DNA Polymerase (Sigma) à partir du produit de ligation purifié et extrait d'un gel d'agarose.

### 2.6.1 Spécifications pour la chaîne légère

Les amorces de l'extrémité 5' utilisées pour l'amplification du gène de la LC fonctionnelle ne contenaient pas la séquence-signal nécessaire à l'exportation de la chaîne. Cette séquence a été amplifiée à partir d'un insert de V<sub>H</sub> dans le plasmide pcDNA3.1/V5-His TOPO. La séquence-signal n'étant qu'environ 60 pb, une amorce contre la région du promoteur CMV du plasmide a été utilisée pour générer un produit d'environ 535 pb, taille beaucoup plus facile à isoler d'un gel d'agarose. Les régions d'intérêt ont été amplifiées à l'aide des amorces indiquées dans le tableau IX selon les conditions du tableau X. Les régions V<sub>L</sub> et C<sub>L</sub> ont d'abord été liées dans une première réaction, puis la séquence-signal a été ajoutée par une deuxième ligation. La sélection suite à la première ligation a été accomplie par amplification avec l'AccuPrime Pfx DNA Polymerase (Invitrogen) afin d'obtenir des extrémités

franches pour la deuxième ligation. Cette dernière a été amplifiée à l'aide des amorces 72A1 Kozak sens et Igk\_R.

**Tableau IX.** Amorces utilisées pour l'amplification des régions des anticorps murin et humain pour la construction de la LC chimérique.

<b>Nom et région amplifiée*</b>	<b>Séquence 5' – 3'</b>
CMV promoter	ATCATATGCCAAGTACGCCC
<i>Séquence-signal (V<sub>H</sub>) 5'</i>	
72A1 HC signal seq antisense	GGACAGGACACAGCTTGGGAAAGTCACC
<i>Séquence-signal (V<sub>H</sub>) 3'</i>	
72A1 Kozak sens	CCACCATGGCTGTCTTGGGGCTG
<i>Séquence-signal (V<sub>H</sub>) 5'</i>	
72A1 LC amino terminus	CAGCTCGTGATGACCCAGTCTCCCAAATC
<i>V<sub>L</sub> (72A1) 5'</i>	
72A1 LCVR junction	CCCTCCGAACGTGTACGGATAGC
<i>V<sub>L</sub> (72A1) 3'</i>	
HuIg kappa GTKLEIK	GGGACCAAGCTGGAAATCAAA CG
<i>C<sub>L</sub> (humain) 5'</i>	
Igk_R	CTCCCTCTAACACTCTCCCCTG
<i>C<sub>L</sub> (humain) 3'</i>	

\* La région est identifiée, suivie de la provenance entre parenthèse et de l'extrémité où se trouve l'amorce.

**Tableau X.** Paramètres des réactions PCR ayant permis d'amplifier les régions d'intérêt de la LC et les ligations. Chaque réaction contenait 35 cycles.

<b>Région</b>	<b>Description des cycles</b>
Séquence-signal ( $V_H$ )	95°C – 45 secondes / 55°C – 45 secondes / 68°C – 1 minute
$V_L$ (72A1)	95°C – 1 minute / 56°C – 45 secondes / 68°C – 1 minute
$C_L$ (humain)	95°C – 45 secondes / 55°C – 45 secondes / 68°C – 1 minute
Ligation $V_L - C_L$	95°C – 1 minute / 55°C – 1 minute / 68°C – 1 minute
Ligation SS – ( $V_L C_L$ )	95°C – 45 secondes / 55°C – 45 secondes / 68°C – 1 minute

### 2.6.2 Spécifications pour la chaîne lourde

L'ADNc utilisé pour l'amplification de la région  $V_H$  a été synthétisé à l'aide de l'amorce spécifique JHRC à partir des cellules 72A1. Les amorces utilisées pour l'amplification des deux régions respectives sont fournies dans le tableau XI et les conditions de PCR, dans le tableau XII. Les deux régions ont ensuite été assemblées, puis la chaîne complète a été sélectionnée et amplifiée à l'aide des amorces MHALT3.RV et IgG\_R dans une PCR comprenant les paramètres indiqués dans le tableau XII.

**Tableau XI.** Amorces utilisées pour l'amplification des régions des anticorps murin et humain pour la construction de la HC chimérique.

Nom et région amplifiée*	Séquence 5' – 3'
MHALT3.RV <i>V<sub>H</sub></i> (72A1) 5'	CCACCATGGCTGTCTTGGGGCTGCTCTTCT
72a1 HCVR/CR junction <i>V<sub>H</sub></i> (72A1) 3'	GTAAGCAAACGTACGTCGTGG
HuIgG WQGQ <i>C<sub>H</sub></i> (humain) 5'	TGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTC TCTTCAGCCTCCACC
IgG_R <i>C<sub>H</sub></i> (humain) 3'	TCATTTACCCGGAGACAGGGAG

\* La région est identifiée, suivie de la provenance entre parenthèse et de l'extrémité où se trouve l'amorce.

**Tableau XII.** Paramètres des réactions PCR ayant permis d'amplifier les régions d'intérêt de la HC et la chaîne complète suite à la ligation. Chaque réaction contenait 35 cycles.

Région	Description des cycles
<i>V<sub>H</sub></i> (72A1)	95°C – 1 minute / 55°C – 1 minute / 68°C – 1,5 minute
<i>C<sub>H</sub></i> (humain)	95°C – 1 minute / 60°C – 1 minute / 68°C – 2 minutes
Ligation <i>V<sub>H</sub></i> – <i>C<sub>H</sub></i>	95°C – 50 secondes / 55°C – 45 secondes / 68°C – 2 minutes

## 2.7 Expression des chaînes et de l'anticorps chimère en culture cellulaire

Chacune des chaînes chimériques a été clonée dans un vecteur d'expression. L'expression intracellulaire de chaque plasmide a été vérifiée individuellement par transfection dans les cellules CHO, puis les deux vecteurs ont été co-transfectés dans ces mêmes cellules pour produire l'anticorps chimère.

### **2.7.1 Ligation de chacune des chaînes dans un vecteur d'expression**

La LC et la HC ont chacune été insérées dans le vecteur d'expression pcDNA3.1/V5-HIS TOPO. Les chaînes complètes amplifiées par la JumpStart AccuTaq LA DNA Polymerase (Sigma) se terminaient par un A à l'extrémité 3', ce qui permettait l'utilisation de ce plasmide contenant un T additionnel aux extrémités du site de clonage. Des colonies ont été sélectionnées et des mini cultures ont été préparées pour vérifier la présence de l'insert par digestion. Les clones qui contenaient un insert ont ensuite été analysés par une réaction PCR sur 2 µL d'ADN purifié pour déterminer l'orientation de la chaîne dans le vecteur. Une amorce contre le plasmide (CMV promoter) et une autre dans la chaîne (Igk\_R pour LC et 72A1 HCVR/CR junction pour HC) ont servi pour cette réaction et la polymérase utilisée était la Taq DNA Polymerase, Recombinant (Invitrogen). Les clones dont l'insert se trouvait dans la bonne orientation dans le vecteur ont été séquencés et analysés, et le ou les meilleurs ont été sélectionnés pour l'expression en culture cellulaire.

### **2.7.2 Expression transitoire individuelle des chaînes chimères**

Chaque plasmide a été transfecté individuellement dans les cellules CHO afin de vérifier l'expression intracellulaire des chaînes. Une quantité de 4 µg d'ADN d'un plasmide était transfectée dans  $7,5 \times 10^5$  cellules CHO placées dans un puits d'une plaque à six puits 24 heures avant la transfection. L'agent de transfection était la Lipofectamine 2000 (Invitrogen) et le milieu utilisé pour la transfection était l'Opti-MEM (Invitrogen). Les cellules étaient incubées pendant 6 heures en présence de la lipofectamine et de l'ADN plasmidique, puis le milieu était remplacé par du F-12K (Invitrogen). L'expérience incluait un contrôle positif, soit un plasmide d'expression

contenant la protéine à fluorescence verte (GFP), et un contrôle négatif sans ADN plasmidique. Après 36 heures d'incubation, les cellules étaient récoltées aux fins d'analyse par immunobuvardage Western et par immunofluorescence.

### **2.7.3 Expression transitoire des deux chaînes pour former l'anticorps chimère**

Les deux plasmides contenant l'ADN de la LC ou de la HC chimère ont été co-transfectés de façon transitoire dans les cellules CHO dans le but d'exprimer et de sécréter l'anticorps chimère. Une quantité de 2 µg d'ADN de chaque plasmide a été transfectée dans  $7,5 \times 10^5$  cellules CHO. Le protocole de transfection était identique à la section précédente. Après 36 heures d'incubation, les cellules transfectées et le surnageant des cellules ont été récoltés. L'anticorps chimère sécrété dans le surnageant a été analysé, après purification, par immunobuvardage Western et immunofluorescence sur des cellules B95-8 exprimant la gp350.

### **2.8 Concentration et purification de l'anticorps**

L'anticorps chimère a été purifié du surnageant par deux passages successifs dans une colonne de Protein A - Sepharose (Sigma) à un pH 8. L'élution a été effectuée à un pH 4 et l'éluat a été neutralisé par l'addition de 0.1 M NaOH. La dialyse de l'échantillon était accomplie par l'utilisation de Zeba Desalt Spin Columns (Pierce, Rockford, Illinois, États-Unis).

### **2.9 Détection de l'anticorps**

L'anticorps purifié et concentré a été analysé par immunofluorescence sur des cellules exprimant la gp350 et par immunobuvardage de type Western. Ces

techniques ont également permis d'identifier les deux chaînes à l'intérieur des cellules CHO transfectées.

### **2.9.1 Immunofluorescence**

Les cellules B95-8 étaient préalablement induites au 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) à une concentration finale de 30 ng/mL pendant 4 à 5 jours. Les cellules étaient ensuite fixées sur des lames de 12 puits dans le méthanol : acétone (1:1), pendant 30 minutes à -20°C. Les lames pouvaient être conservées à -20°C pendant environ 1 mois. La procédure d'immunofluorescence se déroulait comme suit. L'anticorps purifié était dilué (1:2) dans du DMEM contenant 10% SFV et 50 µL par puits de cette préparation était utilisée pour une incubation de 90 minutes à la température ambiante. Un anticorps anti-IgG humain couplé à la l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et reconnaissant les deux chaînes, le FITC AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Human IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratory, West Grove, Pennsylvanie, États-Unis), était ensuite utilisé à une dilution de 1:100 dans une deuxième incubation d'environ 40 minutes. L'expérience incluait un contrôle négatif sans anticorps et un contrôle positif utilisant le surnageant des cellules 72A1. Les lames étaient observées à l'aide d'un microscope UV Axioskop 2 (Zeiss, Toronto, Ontario, Canada) et des images ont été prises grâce à la caméra SPOT RT Slider (DIAGNOSTICS Instrument, Sterling Heights, Michigan, États-Unis).

La méthode d'immunofluorescence a également été utilisée pour évaluer l'expression intracellulaire des LC et HC chimères, selon un protocole semblable. Les cellules transfectées avec un des deux plasmides étaient fixées de la même façon, mais celles-

ci étaient ensuite incubées directement en présence de l'anticorps anti-IgG humain couplé à la FITC et observé au microscope. Des images ont également été prises pour chacune des chaînes. L'anticorps utilisé reconnaît la partie F(ab')<sub>2</sub> des chaînes individuelles ou assemblée dans un anticorps.

### **2.9.2 Immunobuvardage Western**

L'expression intracellulaire des deux chaînes a été vérifiée par immunobuvardage Western en conditions dénaturantes par l'addition de dithiothréitol (DTT) dans le tampon de chargement. L'anticorps sécrété et purifié a également été analysé par immunobuvardage de type Western, mais en conditions non dénaturantes, c'est-à-dire sans l'ajout de DTT dans le tampon de chargement. L'échantillon bouilli 5 minutes dans le tampon de chargement était d'abord séparé dans un gel de 12% d'acrylamide, puis transféré sur une membrane Immun-Blot PVDF (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada) à l'aide d'un appareil de transfert Semi Dry Blotter (Clever Scientific, Rugby, Warwickshire, Royaume-Uni), à 20 V pendant 35 minutes. La membrane était bloquée dans une solution tampon saline de phosphate (PBS) contenant 3% de lait écrémé en poudre et 0,05% de Tween 20, sur un agitateur pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, la membrane était immergée dans une solution contenant un anticorps anti-IgG humain couplé à la biotine, le Biotin-SP-AffiniPure Goat Anti-Human IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratory), dilué à 1:12 000 dans du PBS additionné de 0,05% Tween 20 pendant 2 heures à 4°C. La membrane était ensuite mise en contact avec l'Extravidin Peroxidase (Sigma), dilué à 1:6000 pendant 45 minutes. La détection était réalisée à l'aide de la trousse Chemiluminescent Peroxidase Substrate 1 (Sigma) avec une incubation de 5 minutes en présence du substrat. Un film était

finalement exposé à la membrane puis développé par le RGII Fuji X-Ray Film Processor (Fujifilm, Mississauga, Ontario, Canada).

### 2.10 Retour sur la chaîne lourde

La construction de la HC a été complétée dans l'ignorance que la lignée 72A1 pouvait également contenir une HC aberrante. La chaîne lourde fonctionnelle a été amplifiée un peu par hasard par la suite en utilisant une combinaison d'amorces et d'enzymes. Différentes régions  $V_H$  amplifiées ont été alignées avec l'extrémité N-terminale de la HC lorsque les résultats ont été disponibles. Les amorces permettant d'amplifier la chaîne fonctionnelle sont indiquées dans le tableau XIII (79). La région  $V_H$  fonctionnelle a été amplifiée par la Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) à partir de 2  $\mu$ L ADNc synthétisé avec l'amorce spécifique à l'extrémité 3' de cette région (JHRC). Un total de 35 cycles PCR a été effectué selon les paramètres suivants : 94°C – 1 minute, 60 °C – 1 minute et 72°C – 1 minute. Le produit a été analysé sur gel d'électrophorèse en agarose.

**Tableau XIII.** Amorces utilisées pour l'amplification de l'ADN codant pour la  $V_H$  fonctionnelle (Jones *et al.*)

Nom	Séquence 5' – 3'
MHALT2.RV	CCACCATGRACTTCGGGYTGAGCTKGGTTTT
JHRC	CTGAGGAGACGGTGACCATGGTCCCTTGGCCCC

## **2.11 Établissement d'une lignée cellulaire stable exprimant la gp350**

Quelques lignées cellulaires ont été transfectées avec un plasmide exprimant la gp350 et le meilleur clone a été sélectionné. Cette lignée servira aux essais d'ADCC avec l'anticorps chimère, une fois obtenu.

### **2.11.1 Transfection des lignées cellulaires avec le plasmide contenant la gp350 et sélection de clones positifs**

Le système utilisé ici inclut un vecteur rétroviral modifié (pZIP-neo-SV(X)1) dans lequel on a inséré le gène d'intérêt et qui est d'abord transfecté dans une lignée cellulaire appelée « packaging cell line » (18). Le virus produit par ces cellules est ensuite utilisé pour l'infection de la lignée cellulaire souhaitée. Le promoteur du vecteur, le MuLV LTR (pour « murine leukemia virus long terminal repeats »), contrôle l'expression du gène d'intérêt ainsi que du gène de résistance et permet l'intégration d'une partie du vecteur dans le génome de la cellule hôte grâce à une autre séquence LTR située en aval. Le plasmide utilisé ici, le pZIP-MA (annexe I, figure 24), a déjà été construit selon ce système et contient la séquence de la gp350 et un gène de résistance à la néomycine (G418) (178). Le protocole est une modification de Cepko *et al.* et les informations complémentaires sur le vecteur et le système sont fournies dans le même article (18). Brièvement,  $6 \times 10^5$  cellules PA317 ont été transfectées avec 2  $\mu\text{g}$  de vecteur pZIP-MA selon le protocole décrit à la section 2.7.2. Après une période d'incubation de 48 heures, les cellules ont été trypsinisées et mises sous sélection à une concentration de 200  $\mu\text{g}$  de G418 (Sigma) par mL de DMEM (Invitrogen), pendant environ 3 semaines. Des colonies de cellules résistantes ont été testées pour l'expression de gp350 par

immunofluorescence à l'aide du surnageant des cellules 72A1. Les meilleurs clones ont été sélectionnés pour les étapes subséquentes. Le surnageant des cellules PA317 des clones sélectionnés a été utilisé pour infecter les cellules Daudi, Raji et CEM. Un volume de 1,5 mL de surnageant a été utilisé par  $1 \times 10^6$  cellules. Une incubation de 48 heures a permis l'intégration du vecteur dans le génome. Les cellules infectées ont ensuite été sélectionnées dans des plaques de 96 puits en présence de 500  $\mu$ g de G418 (Sigma) par mL de RPMI (Invitrogen), pendant 2 à 3 semaines.

### **2.11.2 Analyse par immunofluorescence et FACS du meilleur clone**

Les clones résistants au G418 ont d'abord été analysés par immunofluorescence. Les cellules étaient fixées sur des lames de 12 puits dans le méthanol : acétone (1:1), pendant 30 minutes à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Les lames étaient ensuite incubées en présence du surnageant des cellules 72A1, à raison de 50  $\mu$ L par puits pendant 1 heure. Puis un anticorps FITC AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (Jackson ImmunoResearch), dilué dans du DMEM (1:100), était mis en présence des cellules pendant 40 minutes. Un contrôle négatif, des cellules non transfectées, et un contrôle positif pour la gp350, des B95-8, étaient inclus. Les lames étaient observées et des images ont été prises avec les mêmes instruments que décrits précédemment. Les cellules fixées ont également été marquées avec un sérum dilué (1:500) provenant d'une patiente souffrant de la maladie chronique active causée par le VEB, puis incubées en présence d'un anticorps FITC AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Human IgG (Jackson ImmunoResearch) selon le même protocole.

L'analyse FACS a été complétée sur le clone CEM-gp350 présentant la fluorescence la plus évidente. Les cellules ont été marquées avec les mêmes anticorps (72A1 et un anti-IgG humain) en incluant les mêmes contrôles positifs et négatifs. Les cellules ont été analysées par FACS Calibur (BD Biosciences, Mississauga, Ontario, Canada).

## **CHAPITRE TROISIÈME**

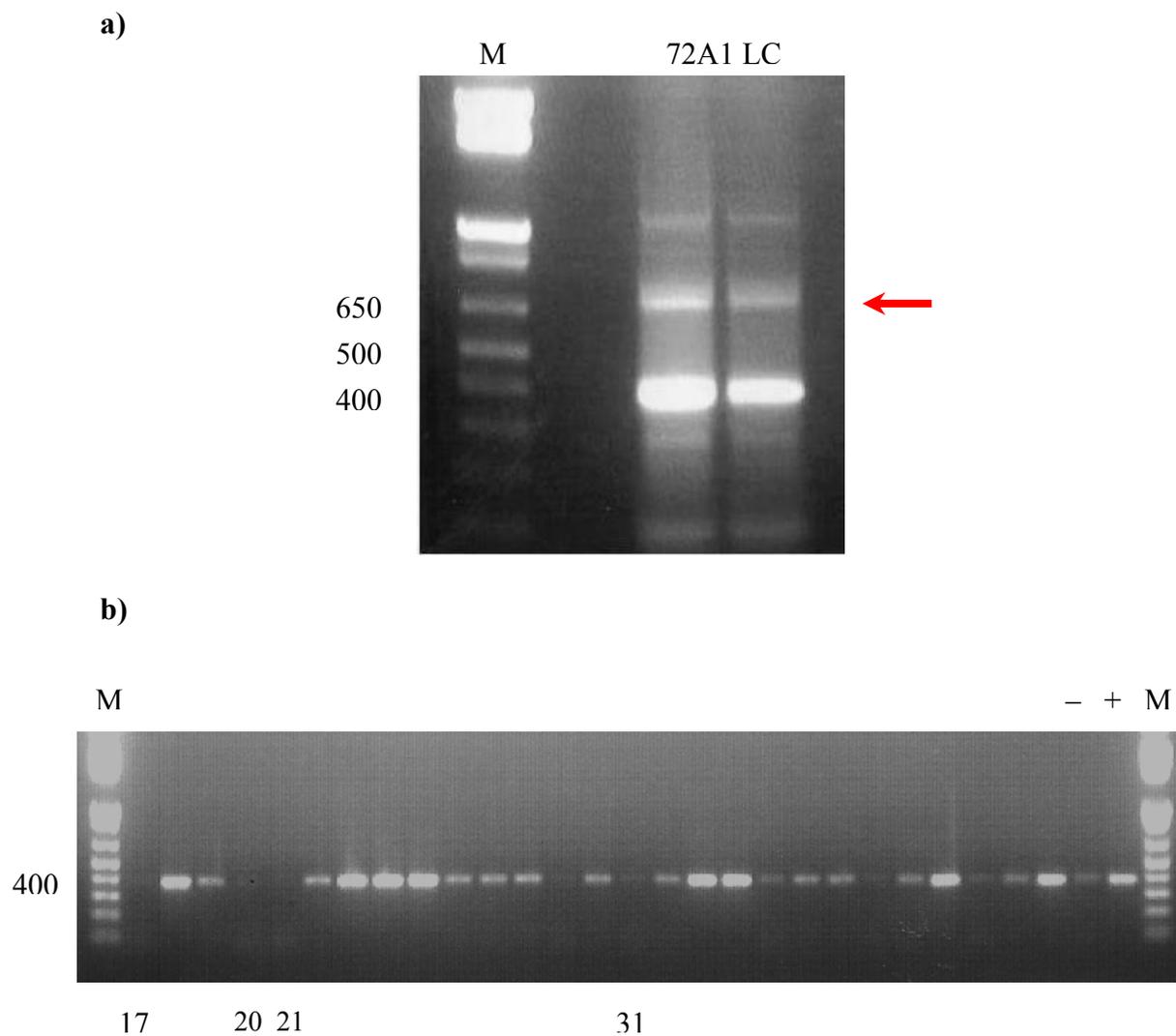
### **RÉSULTATS**

### 3.1 Développement de la chaîne légère chimère

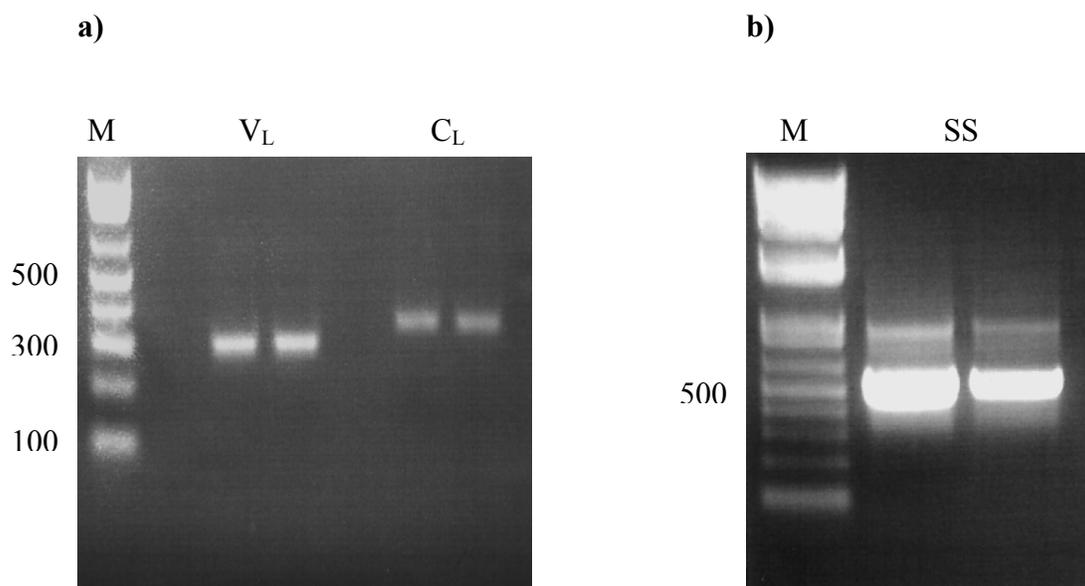
#### 3.1.1 Construction de la chaîne légère

L'amplification sélective de la LC fonctionnelle a produit deux bandes principales : une très intense à 350-400 pb et une autre à 650 pb (figure 4a). La bande à 650 pb a été isolée et clonée dans un vecteur. Le criblage par PCR a été accompli sur plus d'une soixantaine de clones pour cette section (figure 4b). Le contrôle négatif contenait une bande faible à 400 pb. Quatre clones ayant une bande de plus faible intensité ou équivalente au contrôle ont été sélectionnés pour analyse par séquençage. Deux de ces clones étaient des chaînes fonctionnelles et les deux autres étaient des chaînes aberrantes.

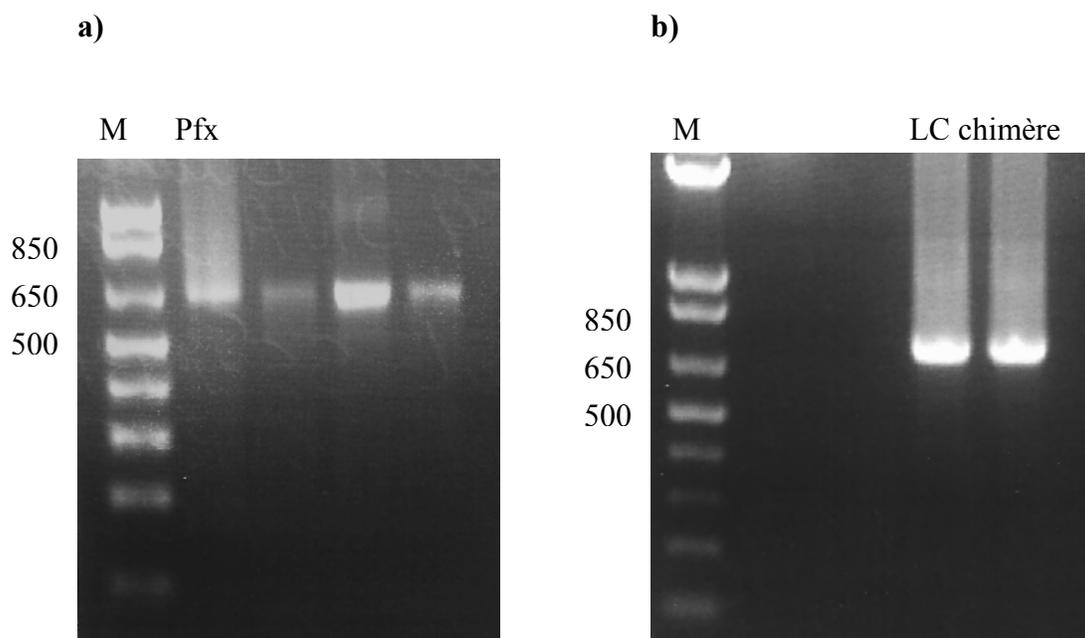
Les régions nécessaires à la construction de la LC chimère ont été amplifiées. La région  $V_L$  a été amplifiée à partir du clone fonctionnel 72A1 LC 31 et la région  $C_L$ , à partir de l'ADNc synthétisé. La séquence-signal, quant à elle, provient d'un clone contenant un insert  $V_H$  analysé par séquençage et qui contenait une séquence-signal. Les trois fragments amplifiés sont montrés à la figure 5. Les bandes attendues sont de 300 pb pour  $V_L$ , 350 pb pour  $C_L$  et 535 pb pour la séquence-signal (car cette dernière contient une partie du plasmide). Tous les fragments avaient des extrémités franches pour conserver le cadre de lecture lors des ligations. La première ligation a assemblé les fragments  $V_L$  et  $C_L$  et l'amplification a été accomplie par différentes enzymes (figure 6a), mais le produit amplifié par l'AccuPrime Pfx DNA Polymerase (Invitrogen) a été conservé pour les étapes ultérieures. La deuxième ligation a assemblé la séquence-signal au reste de la chaîne (figure 6b). Les bandes attendues étaient de 650 pb pour la première ligation et de 710 pb pour la deuxième.



**Figure 4.** Sélection de la région d'intérêt de la LC fonctionnelle. **a)** Amplification sélective biaisée de l'ADN de la LC fonctionnelle par PCR. **b)** Sélection de clones négatifs pour la PCR amplifiant la chaîne aberrante. Les quatre clones indiqués par des numéros ont été sélectionnés pour analyse par séquençage. Les échelles moléculaires (M) sont le 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) et les nombres sont en pb. Les contrôles positif (+) et négatif (-) sont indiqués en b.



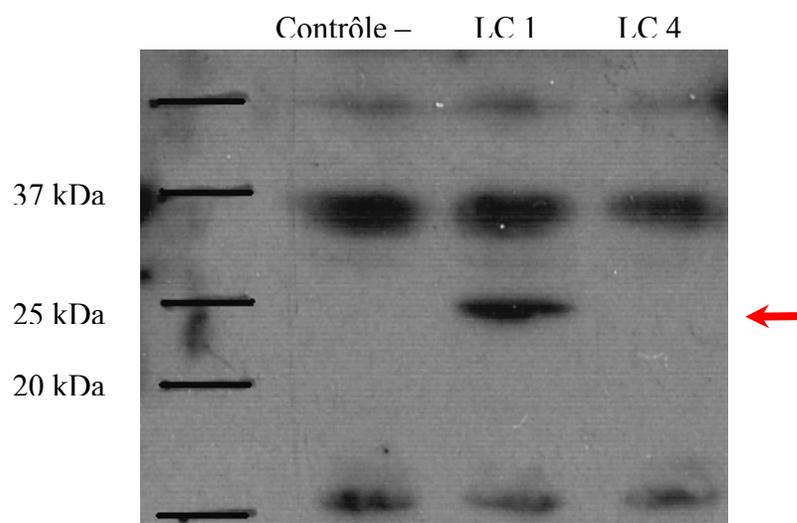
**Figure 5.** Amplification des trois fragments d'ADN formant la LC chimère. **a)** Régions V<sub>L</sub> de la LC de l'anticorps 72A1 et C<sub>L</sub> de la LC d'un IgG humain amplifiés et purifiés sur gel d'agarose. **b)** Séquence-signal amplifiée à partir d'un clone V<sub>H</sub>. Les échelles moléculaires (M) sont le 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) et les nombres indiqués sont en pb.



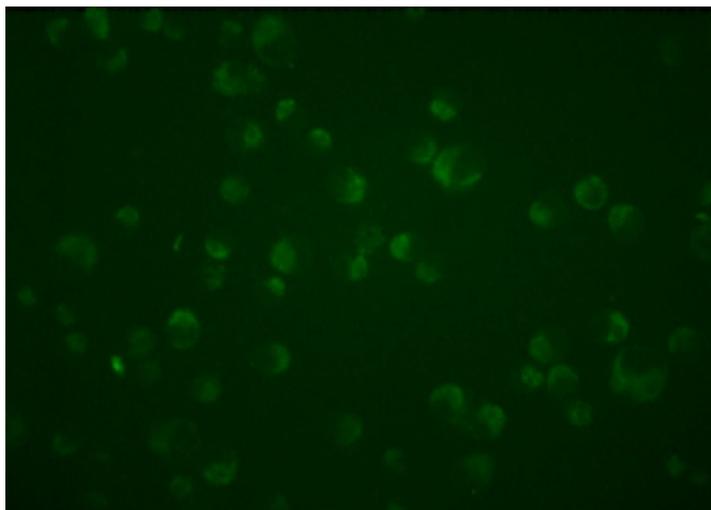
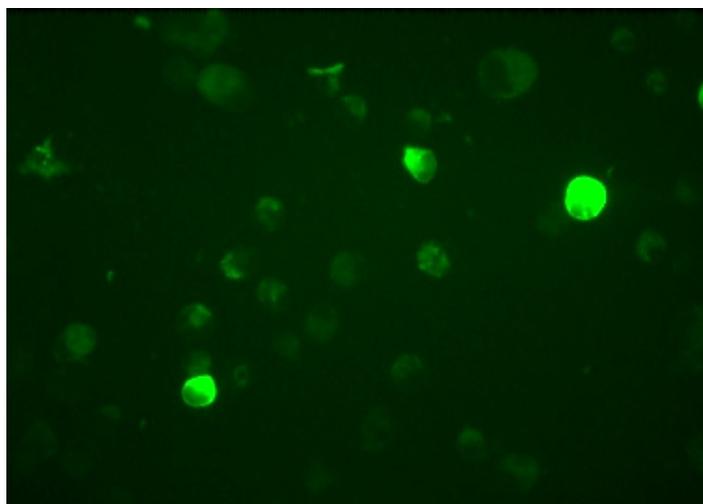
**Figure 6.** Ligation des fragments pour former la séquence de la LC chimère. **a)** Amplification de la première ligation (V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>) avec quatre polymérases différentes. La bande amplifiée avec l'AccuPrime Pfx DNA Polymerase (Invitrogen) est la première et celle utilisée pour les étapes subséquentes. **b)** Amplification de la deuxième ligation ajoutant la séquence-signal et formant ainsi la LC chimère complète. Les échelles moléculaires (M) sont le 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) et les nombres indiqués sont en pb.

### 3.1.2 Expression de la chaîne légère

La LC chimère construite a été clonée dans le vecteur d'expression pcDNA3.1/V5-His TOPO. Le criblage des clones a été accompli par digestion enzymatique pour vérifier la présence de l'insert et une PCR a permis de sélectionner les clones dont l'insert se trouvait dans l'orientation 5' – 3' par rapport au promoteur CMV. Deux clones LC ont été transfectés dans les cellules CHO et l'expression intracellulaire de la chaîne a été analysée par immunobuvardage Western (figure 7) et par immunofluorescence (figure 8). L'analyse de la membrane du buvardage a montré la présence de la LC dans un des deux clones. En effet, une bande à 25 kilodaltons (kDa) est observée pour le clone 1 et non pour le clone 4 ou le contrôle négatif. Les images d'immunofluorescence confirment l'expression du clone LC 1 dans les cellules CHO par rapport au contrôle négatif de transfection.



**Figure 7.** Immunobuvardage Western montrant l'expression de la LC pour un des deux clones testés en culture cellulaire. L'échelle moléculaire (M) est le Precision Plus Protein Standard Kaleidoscope (Bio Rad).

**a)****b)**

**Figure 8.** Immunofluorescence intracellulaire de la LC chimère, clone 1, dans les cellules CHO transfectées. **a)** Contrôle négatif de transfection, cellules CHO non transfectées. **b)** Fluorescence intracellulaire du clone LC 1.

### 3.1.3 Séquençage et analyse des séquences de la chaîne légère

Suite à la confirmation d'expression de la LC, le clone LC 1 a été séquençé et analysé (figure 9). Les différentes régions assemblées sont indiquées dans les séquences de nucléotides et d'acides aminés. La séquence-signal ne fait pas partie de la chaîne formant l'anticorps final car cette séquence est coupée lors de l'exportation de la chaîne, mais elle a tout de même été incluse, à titre indicatif, dans la séquence d'acides aminés. Les CDR ont été identifiés dans la chaîne et des alignements BLAST ont aussi été effectués (annexe II, figures 25, 27 et 28). L'analyse des séquences  $V_L$  et  $C_L$  démontre que les fragments appropriés ont été clonés et assemblés.

La séquence de l'extrémité N-terminale de l'anticorps 72A1 a été obtenue par séquençage peptidique. La figure 10 montre la séquence ainsi qu'un alignement avec les 60 premiers acides aminés de la LC chimère, après la séquence-signal. Au total, 33 acides aminés sur 35 sont identiques entre les deux séquences. Les deux changements mineurs sont une asparagine (N) pour une glutamine (Q) et une isoleucine (I) pour une leucine (L).

a)

CCACCATGGCTGTCTTGGGGCTGCTCTTCTGCCTGGTGACTTTCCCAAGCT  
 GTGTCCTGTCCCAGCTCGTGATGACCCAGTCTCCCAAATCCATGTCCATGT  
 CAGTAGGAGAGAGGGTACCTTGACCTGCAAGGCCAGTGAGAATGTGGT  
 TACTTATGTTTCCTGGTATCAACAGAAACCAGAGCAGTCTCCTAAACTGCT  
 GATATACGGGGCATCCAACCGGTACACTGGGGTCCCCGATCGCTTCACAG  
 GCAGTGGATCTGCAACAGATTTCACTCTGACCATCAGCAGTGTGCAGGCT  
 GAAGACCTTGCAGATTACTGTGGACAGGGTTACAGCTATCCGTACAC  
 GTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCACCA  
 TCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTCC  
 TCTGTTGTGTGCCTGCAGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACA  
 GTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCA  
 CAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGAC  
 GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTC  
 ACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAG  
 AGTGTTAGAGGGAG

b)

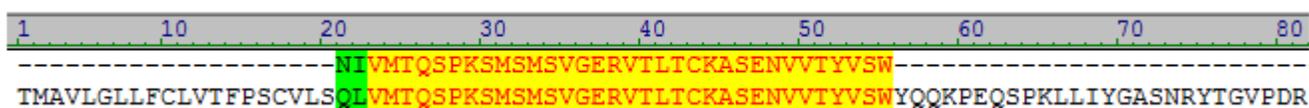
TMAVLGLLFLVTFPSCVLSQLVMTQSPKSMMSVGERVTLTCKASENVVT  
 YVSWYQQKPEQSPKLLIYGASNRYTGVPDRFTGSGSATDFTLTISSVQAEDLA  
 DYHCGQGYSYPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLQN  
 NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYLSSTLTLSKADYEK  
 HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC\*

**Figure 9.** Séquences de la LC chimère exprimée. **a)** Séquence nucléotidique de la chaîne. **b)** Séquence d'acides aminés. Les régions assemblées sont identifiées par un code de couleur : la séquence-signal est en vert, la région  $V_L$  est en rouge et la région  $C_L$ , en bleu. \* : codon stop.

a)

NIVMTQSPKSMMSVGERVTLTCKASENVVTYVSW

b)

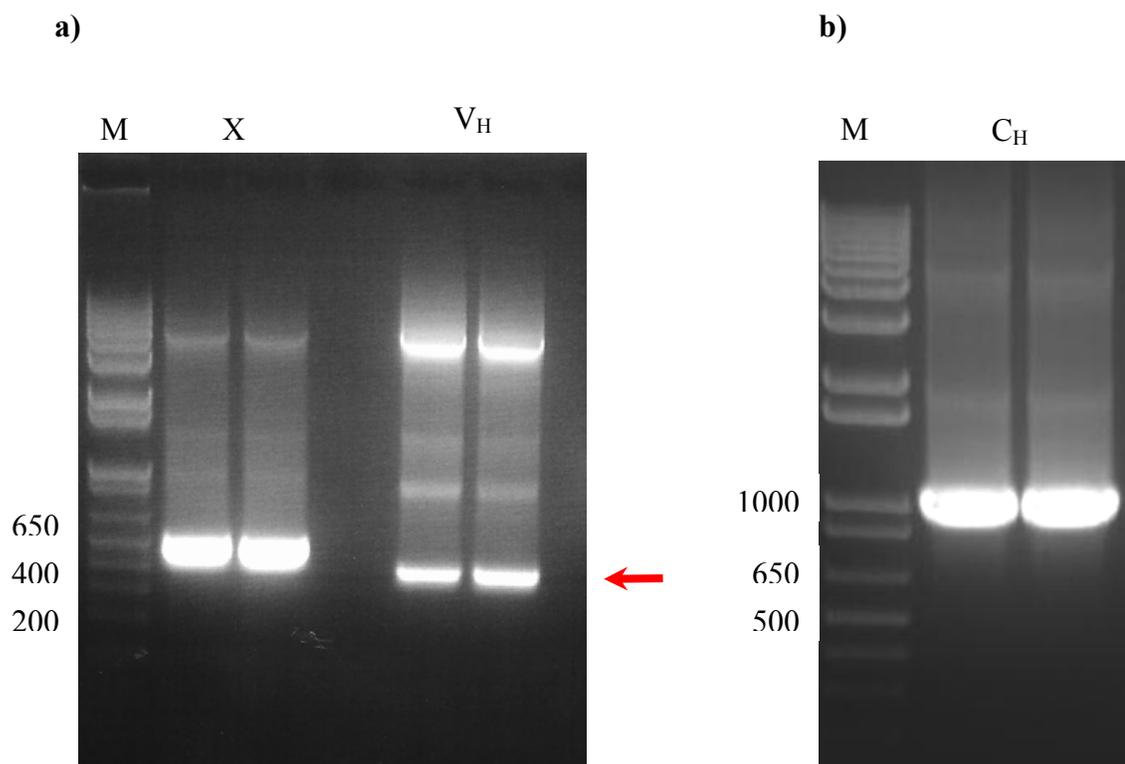


**Figure 10.** a) Séquence de l'extrémité 5' de la LC de l'anticorps murin 72A1 obtenue par séquençage peptidique. b) Alignement de la séquence peptidique de l'extrémité N-terminale avec le début de la LC chimère, accompli à l'aide du logiciel Vector NTI (Invitrogen). Les acides aminés en jaune sont identiques et ceux en vert sont similaires.

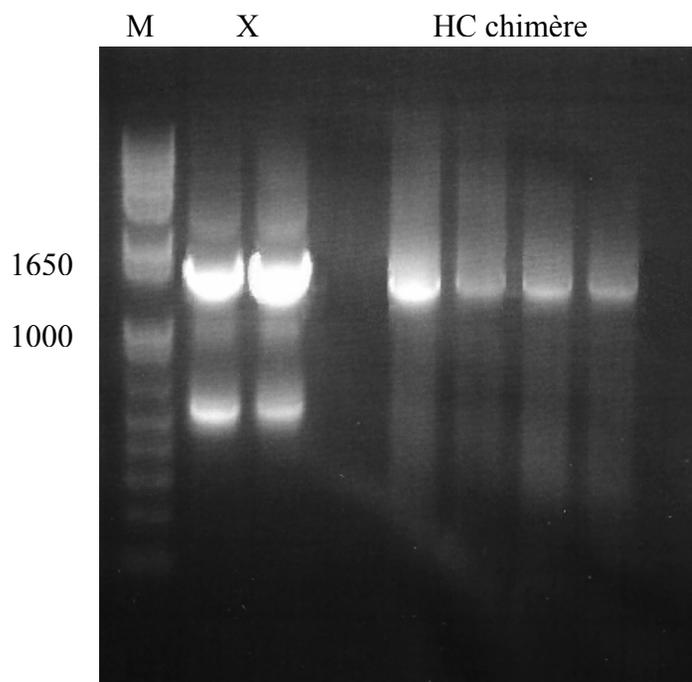
## 3.2 Développement de la chaîne lourde chimère

### 3.2.1 Construction de la chaîne lourde

La région  $V_H$  a été amplifiée à partir de l'ADNc des cellules 72A1 produit avec l'amorce spécifique JHRC et la région  $C_H$ , à partir de l'ADNc de PBMC humains. Les amplifications sont montrées à la figure 11. La longueur des bandes attendues est d'environ 400 pb pour  $V_H$  et de 1000 pb pour  $C_H$ . Les fragments ont été assemblés par ligation d'extrémités franches et le produit recherché a été sélectionné par PCR à l'aide des amorces Kozak et IgG\_R pour former la chaîne complète (figure 12). Le produit final a une longueur attendue d'environ 1,4 kb. Afin de ne pas modifier les photos originales, des résultats n'étant pas en lien direct avec ceux présentés ici ont été conservés dans les figures 11 et 12 et sont identifiés par un « X ».



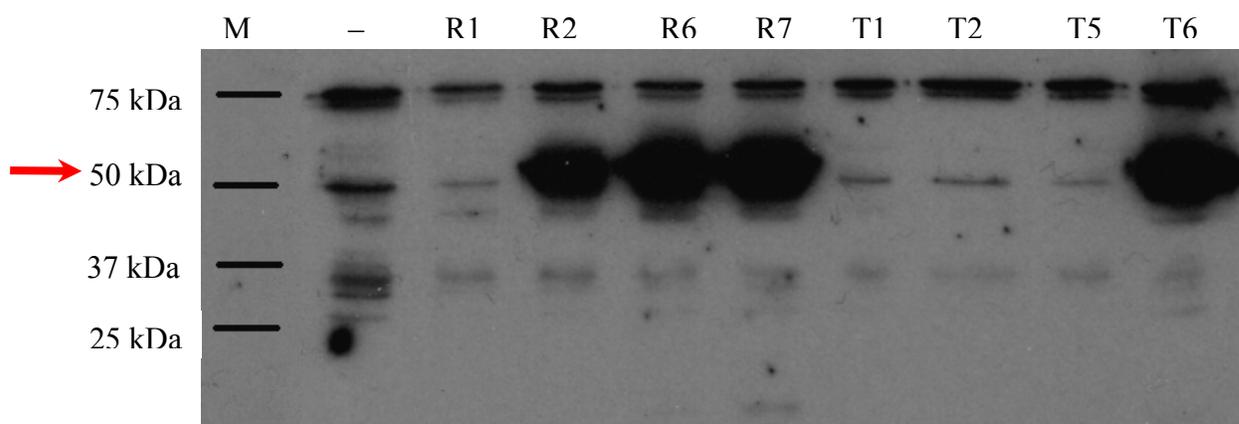
**Figure 11.** Amplification des fragments pour former la HC chimère. **a)** PCR de la région V<sub>H</sub> selon deux réactions différentes. Le produit sélectionné pour les étapes subséquentes est celui de droite, identifié V<sub>H</sub>. **b)** Amplification de la région C<sub>H</sub>. Les échelles moléculaires (M) sont le 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) et les nombres indiqués sont en pb.



**Figure 12.** Sélection de la HC chimère par amplification suite à la ligation des fragments  $V_H$  et  $C_H$  effectué selon deux réactions différentes. Les quatre bandes de droite identifiées représentent le même produit et sont celles sélectionnées pour les étapes subséquentes. L'échelle moléculaire (M) est le 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) et les nombres sont en pb.

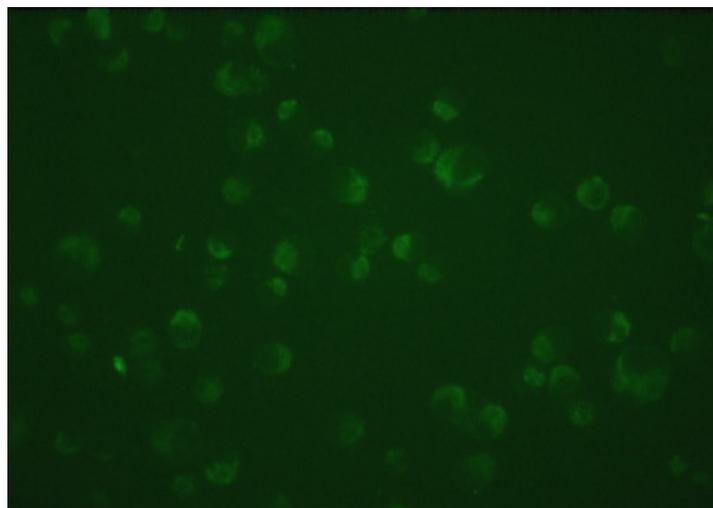
### 3.2.2 Expression de la chaîne lourde

Encore ici, la HC chimère construite a été clonée dans le vecteur d'expression pcDNA3.1/V5-His TOPO. Le criblage des clones a été accompli par digestion enzymatique pour vérifier la présence de l'insert et une PCR a permis de sélectionner les clones dont l'insert se trouvait dans l'orientation 5' – 3' par rapport au promoteur CMV. Huit clones ont été transfectés dans les cellules CHO et l'expression intracellulaire de la chaîne a été observée par deux méthodes : immunobuvardage Western (figure 13) et immunofluorescence (figure 14). La première technique a permis de démontrer que quatre des huit clones exprimaient la HC chimère. Deux clones (R7 et T6) ont été sélectionnés pour analyse par immunofluorescence et ont donné des résultats semblables. Une fluorescence évidente a été observée dans les deux cas, par rapport au contrôle négatif.

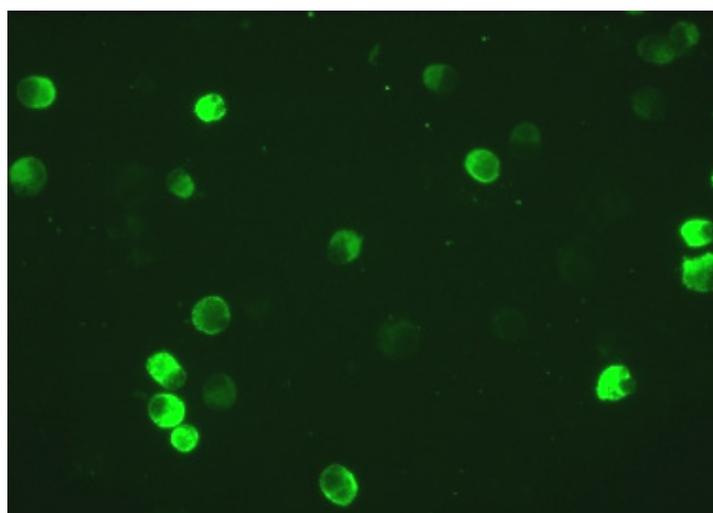


**Figure 13.** Immunobuvardage Western montrant l'expression de la HC pour huit clones testés en culture cellulaire. Un contrôle négatif (-) de transfection a été inclus. L'échelle moléculaire (M) est le Precision Plus Protein Standard Kaleidoscope (Bio Rad).

a)



b)



**Figure 14.** Expression intracellulaire de la HC chimère observée par immunofluorescence. **a)** Contrôle négatif de transfection, cellules CHO non transfectées. **b)** Fluorescence intracellulaire du clone HC R7. Le clone HC T6 (non montré) produisait une fluorescence similaire.

### 3.2.3 Séquençage et analyse des séquences de la chaîne lourde

Les deux clones, HC R7 et HC T6, ont été séquencés. Les deux séquences étaient identiques et l'une d'elles est montrée à la figure 15. Les deux régions assemblées,  $V_H$  et  $C_H$ , sont indiquées par un code de couleur. Les CDR ont également été identifiés et des alignements BLAST ont été accomplis (annexe II, figures 26, 29 et 30). L'analyse des alignements fournit un premier indice de la provenance de la région  $V_H$  assemblée dans la chaîne chimère. En effet, plusieurs résultats indiquent que la région isolée est probablement un réarrangement provenant du partenaire de fusion formant l'hybridome, le P3X63Ag8 dérivé de la lignée MOPC21.

La région variable a également été alignée avec la séquence N-terminale de l'anticorps murin 72A1 obtenue par séquençage peptidique (figure 16a). Après analyse, 22 acides aminés seulement sur 39 sont identiques, 6 sont similaires et 12 sont significativement différents. En effectuant différents autres alignements et des BLAST, la région  $V_H$  de l'anticorps 72A1 s'aligne parfaitement avec le début d'une chaîne HC produite par la lignée MOPC21 (figure 16b). De plus, parmi les diverses régions  $V_H$  amplifiées tout au long du projet, une séquence correspond aussi exactement à la séquence N-terminale et à la chaîne MOPC21 (figure 16c). Le produit amplifié est également montré à la figure 16d sur un gel d'électrophorèse qui incluait également d'autres essais d'amplification de la région  $V_H$  avec différentes amorces et polymérases. La séquence de ce produit n'est cependant pas complète. Des travaux sont toujours en cours dans le laboratoire du Dr. Alfieri pour poursuivre cette voie et construire une nouvelle HC.

a)

CCACCATGGCTGTCTTGGGGCTGCTCTTCTGCCTGGTGACTTTCCCAAGCTGT  
 GTCCTGTCCCAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCT  
 CACAGAGCCTGTCCATCATATGCACCGTCTCAGGGTTCTCATTAAGTAGCTAT  
 GGTGTACACTGGGTTTCGCCAGCCTCCGGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGTAG  
 TGATATGGAGTGATGGAAGCACAACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACT  
 GAGCATCAGCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGT  
 CTCCAAACTGATGACACAGCCATGTACTACTGTGCCAGAGAGCCTCCACGA  
 CGTACGTTTGCTTACGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAGCCTCC  
 ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG  
 GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG  
 ACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGG  
 CTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC  
 TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCA  
 GCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCA  
 CACATGCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTC  
 CTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT  
 CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC  
 TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG  
 GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACC  
 AGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCT  
 CCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA  
 ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAG  
 GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGTGACATCGCCGTGG  
 AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCG  
 TGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG  
 AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC  
 TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA

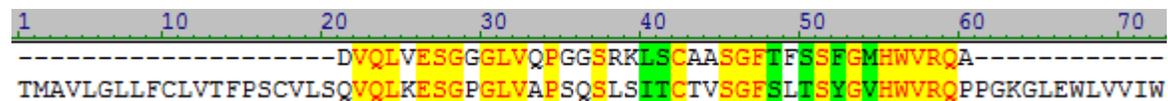
b)

TMAVLGLLFCLVTFPSCVLSQVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTSYGVH  
 WVRQPPGKGLEWLVIWSDGSTTYNSALKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTD  
 TAMYYCAREPPTYVCLRGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG  
 CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI  
 CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS  
 RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT  
 VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN  
 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR  
 WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK\*

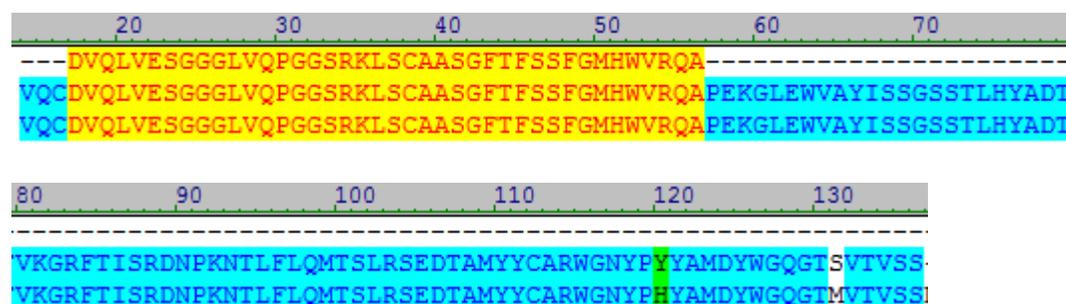
**Figure 15.** Séquences de la HC chimère exprimée. **a)** Séquence nucléotidique de la chaîne. **b)** Séquence d'acides aminés. Les régions assemblées sont identifiées par un code de couleur : la région V<sub>H</sub> est en rouge et la région C<sub>H</sub>, en bleu. \* : codon stop.

a) DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSSFGMHWVRQA

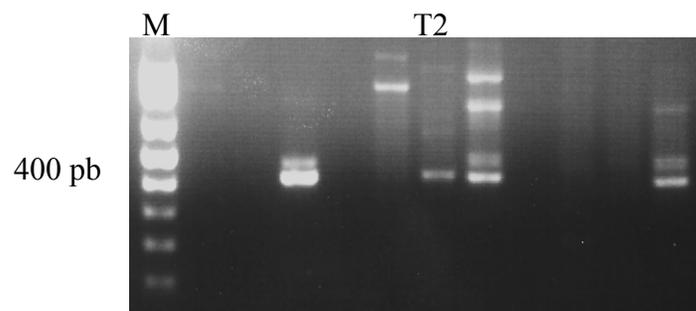
b) HC N terminal - HC R7



c) HC N terminal - V<sub>H</sub> MHALT2 - V<sub>H</sub> MOPC21



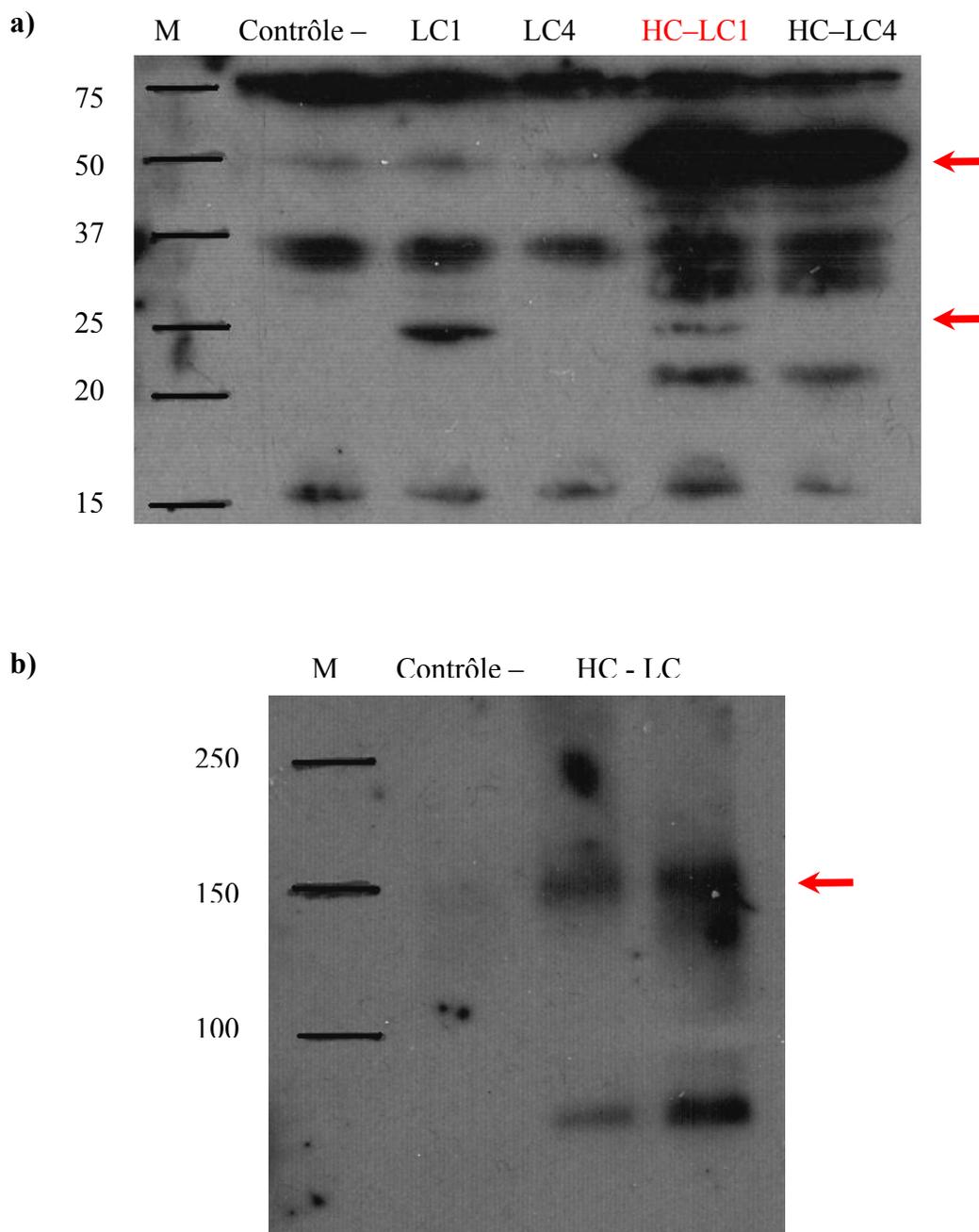
d)



**Figure 16.** a) Séquence de l'extrémité 5' de la HC de l'anticorps murin 72A1 obtenue par séquençage peptidique. b) Alignement de la séquence peptidique de l'extrémité N-terminale avec le début de la HC chimère obtenu à l'aide du logiciel Vector NTI (Invitrogen). c) Alignement de l'extrémité N-terminale, d'un autre clone V<sub>H</sub> amplifié avec l'amorce MHALT2 et de la région V<sub>H</sub> de la chaîne dérivant de MOPC21 (Gen Bank: J00522). Les acides aminés en jaune et en turquoise sont identiques (pour trois ou deux séquences, respectivement), ceux en vert sont similaires et ceux en blanc sont différents. d) Amplification de V<sub>H</sub> avec l'amorce MHALT2 (T2). L'échelle moléculaire (M) est le 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

### **3.3 Expression de l'anticorps chimère**

Les cellules CHO ont été co-transfectées avec les deux chaînes chimères dans le but de produire et de sécréter l'anticorps complet. Cette expérience devait être complétée malgré les résultats du séquençage de la HC, qui ont été disponibles une fois l'expérience débutée de toute façon, afin de vérifier l'impact des réarrangements observés sur l'anticorps chimère. La figure 17 présente les résultats de deux immunobuvardages Western; le premier montre l'expression intracellulaire des deux chaînes LC (1 et 4) ainsi que la combinaison de ces deux LC avec la HC. Les bandes à observer sont de 25 kDa pour la LC et 50 kDa pour la HC. Le deuxième Western a permis d'analyser le surnageant des cellules co-transfectées, après purification et concentration, en conditions non dénaturantes et semble montrer une bande à 150 kDa, ce qui correspondrait à deux LC et deux HC formant l'anticorps complet. L'anticorps chimère purifié du surnageant a été testé par immunofluorescence sur des B95-8 exprimant la gp350. Aucune fluorescence n'a été observée à ce point.

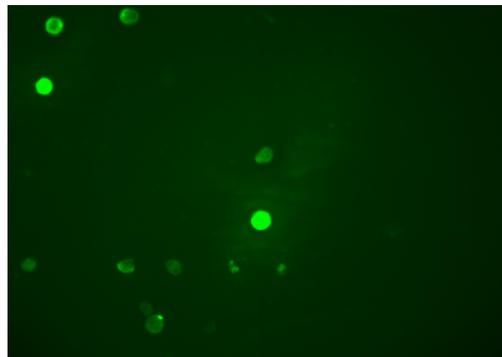
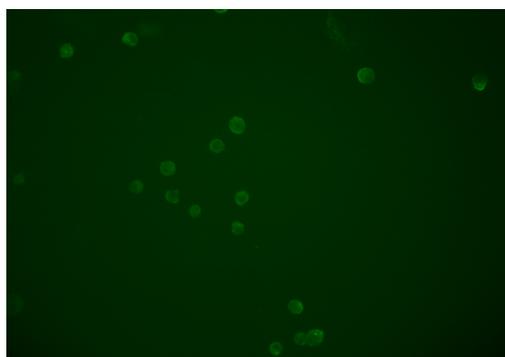
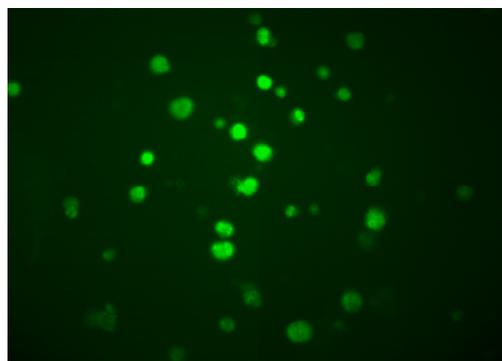
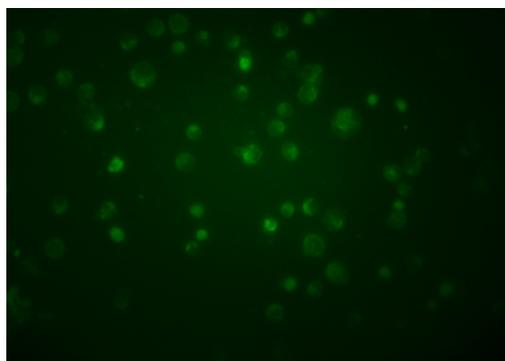


**Figure 17.** Immunobuvardage Western montrant l'expression de l'anticorps chimère. **a)** Expression intracellulaire des deux chaînes transfectées. Le gel contenait différentes combinaisons de HC et de LC. La colonne identifiée HC-LC1 en rouge contient les deux chaînes exprimées. **b)** Surnageant des cellules transfectées analysé en conditions non dénaturantes. L'échelle moléculaire (M) est le Precision Plus Protein Standard Kaleidoscope (Bio Rad) et les nombres indiqués sont en kDa.

### **3.4 Établissement d'une lignée cellulaire stable exprimant la gp350**

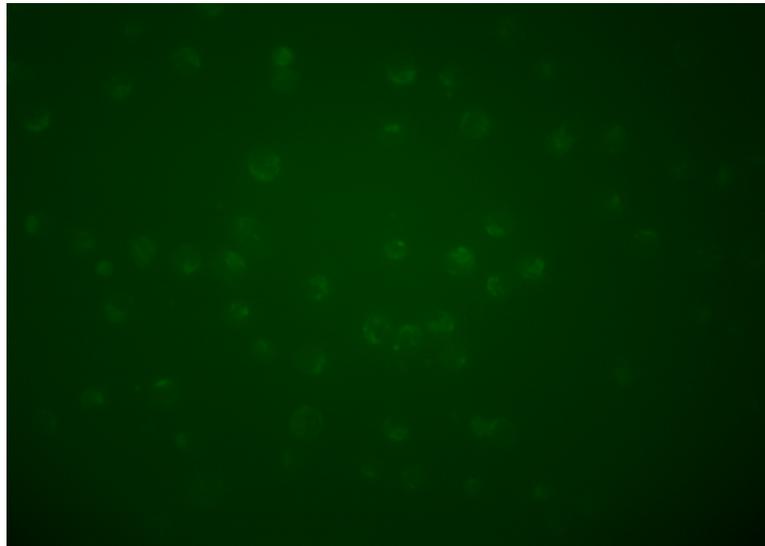
Les cellules Raji et Daudi ont d'abord été transfectées avec le plasmide pZIP-MA dans le but de développer une lignée exprimant la gp350 à leur surface pour les essais d'ADCC. Ces deux lignées, provenant de cellules B lymphomateuses, fournissent un modèle idéal. Un total de 48 clones résistants à la G418 a été sélectionné pour chaque lignée cellulaire afin de vérifier l'expression de la protéine. Aucune fluorescence n'a été observée lorsque les cellules étaient marquées à l'anticorps 72A1. Par contre, ces mêmes cellules incubées en présence du sérum humain VEB-positif montraient une fluorescence évidente pour certains clones (figure 18).

Suite à ces résultats, une autre lignée cellulaire a été transfectée avec le plasmide contenant la gp350. Les cellules CEM ont été traitées de la même façon et dans ce cas, certains clones marqués avec l'anticorps 72A1 ont montré une fluorescence par rapport au contrôle négatif. La figure 19 montre les résultats d'immunofluorescence du clone 2C3, l'intensité était de loin supérieure aux autres clones. Ce même clone a ensuite été analysé par cytométrie de flux afin de vérifier l'expression de la gp350 (figure 20). Environ 40% des cellules analysées exprimaient la gp350 à leur surface. Les deux pics du graphique démontrent que le clone isolé contient deux populations : une exprimant fortement la gp350 et l'autre l'exprimant très peu ou pas du tout.

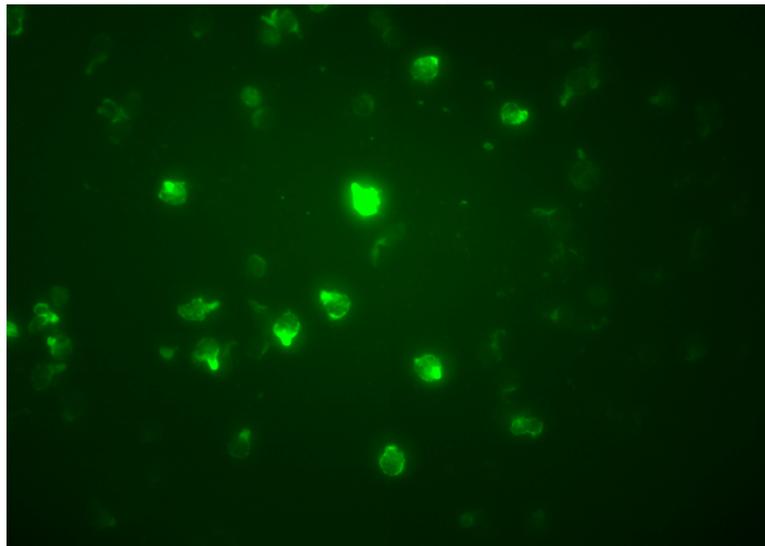
**a)****b)**

**Figure 18.** Établissement de lignées cellulaires exprimant la gp350. Cellules Daudi **(a)** et Raji **(b)** marquées avec l'anticorps 72A1 (gauche) et avec un sérum EBV positif (droite).

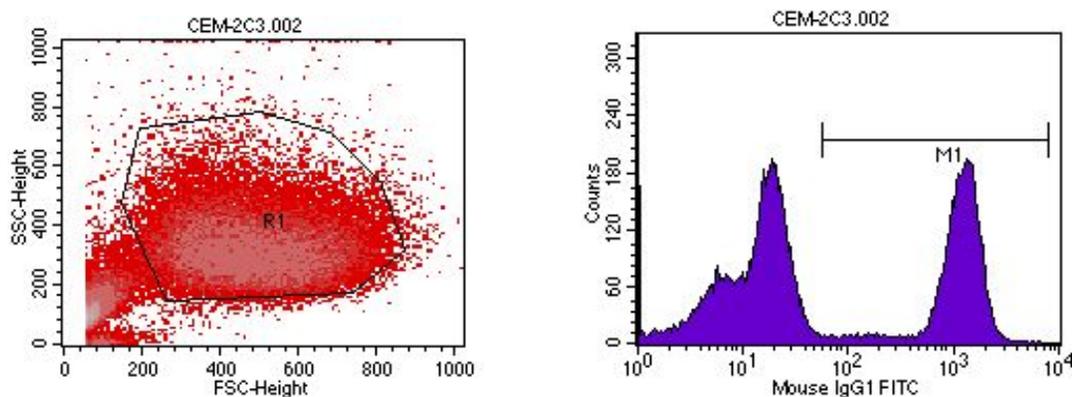
a)



b)



**Figure 19.** Expression de la gp350 dans les cellules CEM. Les cellules ont été marquées avec l'anticorps 72A1. **a)** Contrôle négatif de transfection, cellules CEM non transfectées. **b)** Fluorescence du clone 2C3.



#### Histogram Statistics

File: CEM-2C3.002  
 Sample ID: CEM-2C3  
 Tube: Untitled  
 Acquisition Date: 19-Jun-08  
 Gated Events: 40035  
 X Parameter: Mouse IgG1 FITC (Log)

Log Data Units: Linear Values  
 Patient ID:  
 Panel: Untitled Acquisition Tube Lis  
 Gate: No Gate  
 Total Events: 40035

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	40035	100.00	100.00	487.23	74.62	131.42	23.93	1
M1	56, 7844	16476	41.15	41.15	1162.33	1033.00	40.50	1144.44	1229

**Figure 20.** Analyse FACS du clone CEM-gp350 2C3 montrant l'expression de la gp350. Les cellules ont été marquées avec l'anticorps 72A1 et un anticorps secondaire couplé à la FITC. Le graphique de gauche montre la population de cellules utilisées pour le graphique de droite. Ce deuxième graphique montre d'abord une population de cellules négatives pour l'expression de la gp350 (pic de gauche) ainsi qu'une population de cellules exprimant la gp350 (pic de droite – M1). Les statistiques du second graphique, illustrées dans la partie du bas, indiquent qu'environ 41% des cellules expriment la molécule d'intérêt.

## **CHAPITRE QUATRIÈME**

### **DISCUSSION**

## 4.1 Présence de chaînes aberrantes dans l'hybridome 72A1

### 4.1.1 Chaîne légère

Les hybridomes tels que la lignée cellulaire 72A1 sont formés à partir des cellules B de la rate d'un animal immunisé avec un antigène d'intérêt. Ces cellules sont alors fusionnées avec des cellules tumorales de myélome pour former une lignée cellulaire immortalisée produisant un anticorps spécifique à l'antigène. Dans le cas de l'hybridome 72A1, le partenaire de fusion, le P3X63Ag8.653, est dérivée de la lignée MOPC-21. L'analyse des séquences de la première construction de la LC nous a permis découvrir, par des alignements BLAST, que la région  $V_L$  initialement clonée et amplifiée provenait d'une chaîne aberrante. Une recherche dans la littérature a confirmé que certains hybridomes expriment une LC aberrante, provenant du partenaire de fusion, ayant une délétion de quatre acides aminés menant à un codon stop prématuré après le troisième CDR (17). Une certaine proportion des hybridomes formés à partir de la lignée P3X63Ag8.653 contient cette chaîne aberrante, mais plusieurs ne l'expriment pas probablement dû à une perte ou une répression de la chaîne aberrante. Dans notre cas, la lignée 72A1 exprimait deux LC, une fonctionnelle et une aberrante. Certaines études ont stipulé que la proportion de chaîne aberrante pouvait excéder grandement celle de la chaîne fonctionnelle, d'où la difficulté d'isoler la chaîne fonctionnelle. Par exemple, Duan *et al.* ont dû cribler 150 clones afin d'en obtenir 2 qui contenaient la chaîne fonctionnelle, ce qui représente un pourcentage de 98,7% de chaîne aberrante produite par l'hybridome (35). Notre méthode initiale de criblage des clones par PCR à l'aide d'une amorce spécifique à la chaîne aberrante appuie cette observation. En effet, une cinquantaine de clones LC ont été criblés au total et tous contenaient la chaîne aberrante (résultat non montré). Il

était donc nécessaire de mettre au point une méthode de sélection plus efficace. La méthode utilisée ici est basée sur celle développée par Yuan *et al.* dont l'idée est d'introduire un biais dans la PCR initiale amplifiant la LC de l'anticorps 72A1 en ajoutant un excédent molaire d'une amorce spécifique à la chaîne aberrante (184). En théorie, ceci doit piéger la chaîne aberrante dans une réaction d'amplification donnant un produit plus court que celui recherché et permettre à la chaîne fonctionnelle de participer à l'amplification complète. Les résultats obtenus dans notre laboratoire semblent montrer une certaine efficacité de la méthode, en réduisant la présence de la chaîne aberrante dans les clones criblés (figure 4). En effet, deux clones sur 40 contenaient une LC fonctionnelle. Cette proportion (5%) est néanmoins une sous-estimation probable de l'efficacité de la méthode, car seulement quatre clones négatifs pour la PCR ont été séquencés; il est donc possible que d'autres clones négatifs contenaient également une chaîne fonctionnelle. De plus, en raison d'une contamination vraisemblable de la PCR, il était difficile de dire avec certitude si un clone était positif ou négatif pour la chaîne aberrante, puisque les contrôles négatifs utilisés affichaient une faible bande. Il est donc possible des clones négatifs aient passé inaperçus et que ceci ait également contribué à la sous-estimation de l'efficacité de la méthode.

#### **4.1.2 Chaîne lourde**

La présence de chaînes lourdes aberrantes dans un hybridome est un phénomène beaucoup moins retrouvé dans la littérature, et plus complexe. Contrairement à la LC, il semble exister plus d'une chaîne non fonctionnelle pour la HC. Irani *et al.* en ont identifié deux différentes dans leur hybridome (74). Il est aussi possible de

retrouver des chaînes aberrantes provenant spécifiquement de l'hybridome, en plus de celles provenant du partenaire de fusion (93, 172). L'analyse des différentes amplifications de la région  $V_H$  de la HC a révélé la présence d'au moins trois chaînes différentes dans l'hybridome 72A1. Une était amplifiée plus fréquemment et contenait un réarrangement autour du CDR3. Celle-ci se retrouve dans la construction présentée ici. Une deuxième présentait aussi un réarrangement semblable à la première chaîne aberrante, mais avec quelques différences ponctuelles. Dans notre cas, une méthode de détection de la chaîne fonctionnelle ne s'est pas révélée nécessaire, car la région  $V_H$  fonctionnelle a probablement été amplifiée par une combinaison d'amorces et de polymérase différentes. Les résultats du séquençage peptidique récemment obtenus (figure 16) ont permis d'identifier cette chaîne en faisant des alignements avec toutes les  $V_H$  amplifiées au cours du projet dont on avait la séquence. Fait surprenant, cette région avait été classée non fonctionnelle au départ puisqu'elle s'alignait presque parfaitement avec la chaîne HC dérivant de la lignée MOPC21 (98% d'homologie). Il est difficile d'expliquer comment cette chaîne peut se retrouver dans l'anticorps 72A1. Le séquençage peptidique ne fournissant que l'extrémité 5' de la chaîne (40 acides aminés), il est possible que des différences soient présentes un peu plus loin dans la chaîne. L'équipe du Dr. Alfieri continuera d'explorer cette voie et utilisera cette nouvelle région  $V_H$  dans une autre construction de la HC. L'expression en culture cellulaire permettra de confirmer que cette région isolée est effectivement celle de l'anticorps fonctionnel.

## 4.2 Déroutement de la construction des chaînes chimères

La première construction des chaînes a été accomplie par la méthode de Jones *et al.* (79). Cette méthode amplifie d'abord les régions d'intérêt de chaque anticorps en une première PCR. Les régions sont ensuite assemblées par une deuxième PCR à l'aide des amorces de chaque extrémité de la chaîne chimère en utilisant la similarité d'une région conservée entre les anticorps murins et humains comme point d'ancrage. Le séquençage de ces deux constructions nous a permis d'identifier la LC aberrante. De plus, les chaînes contenaient des additions et des modifications aux jonctions entre les régions variables et constantes. Il semble donc que cette méthode ne fonctionnait pas adéquatement, du moins pour l'anticorps que nous essayions de construire. À partir de ce point, la méthode d'assemblage sélectionnée fut la ligation des régions amplifiées. La construction de la LC s'est révélée difficile par cette technique parce que nous devions lier trois fragments. Après plusieurs essais, la meilleure façon de compléter l'assemblage a été de faire deux ligations séparées (figure 6). Le risque associé à cette méthode était d'augmenter la probabilité d'introduire des mutations dans les séquences, puisque chaque produit de ligation était sélectionné et amplifié par PCR. Le changement de deux acides aminés identifié par le séquençage peptidique a peut-être été introduit au cours de ces amplifications (figure 10). La HC a été assemblée par une seule ligation (figure 12). Étant donné que la présence de HC aberrante dans un hybridome est un problème peu connu, le réarrangement dans la région  $V_H$  n'a été identifié que beaucoup plus tard. Il a été étonnant de constater que la HC était exprimée malgré la région aberrante (figures 13 et 14) et que le cadre de lecture a été conservé sans l'introduction d'un codon stop (figure 15). La séquence

était tout de même identifiée comme une HC d'IgG et devait donc contenir les régions reconnues par l'anticorps utilisé en immunofluorescence.

Des essais de production de l'anticorps chimère en culture cellulaire ont été accomplis avec ces deux chaînes. Les chaînes étaient exprimées et il semble qu'un anticorps ait été assemblé et sécrété dans le milieu de culture (figure 17). Toutefois, la bande observée dans le surnageant des cellules était plutôt faible, même après concentration et purification. Il est possible que cette bande fasse partie du bruit de fond et qu'elle ne soit pas réelle. L'anticorps, si vraiment formé et sécrété, n'a pas reconnu la gp350 par immunofluorescence et n'était donc pas fonctionnel. Ceci n'est pas surprenant lorsque l'on connaît le réarrangement dans la HC. La construction d'un anticorps chimère se doit d'utiliser une stratégie d'essais et erreurs. Même si un changement est observé dans la séquence d'une chaîne, la production de l'anticorps en culture cellulaire devrait être tout de même accomplie car il est possible que le changement soit toléré par l'anticorps et qu'il n'ait pas un impact important au niveau de la liaison.

La grande difficulté associée à la construction d'un anticorps réside dans le fait que la séquence de l'anticorps produit par l'hybridome n'est généralement pas connue. Une série d'amorces dégénérées doit être utilisée pour l'extrémité 5' des régions variables. Cet ensemble d'amorces peut ainsi permettre l'amplification de fragments d'ADN autres que la région voulue et dans certains cas, l'amplification d'une chaîne aberrante. Les problèmes rencontrés au cours du développement de l'anticorps chimère nous ont poussés à faire séquencer l'extrémité N-terminale de l'anticorps

72A1. Ceci nous a d'abord permis de confirmer la séquence de la LC (figure 10). Les changements de l'asparagine (N) pour une glutamine (Q) et de l'isoleucine (I) pour une leucine (L) sont très mineurs en raison de la similarité structurale de ces acides aminés. De plus, N et Q sont des acides aminés polaires sans charge et I et L sont des acides aminés non polaires et hydrophobes. Ces deux changements, qui se trouvent dans le FR1 et non dans un CDR, ne devraient donc pas altérer la structure de la LC. Le séquençage peptidique nous a également permis d'identifier la région V<sub>H</sub> fonctionnelle (figure 16). L'origine de la HC soulève cependant de fortes interrogations. Les 40 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale de la HC de l'anticorps 72A1 correspondent exactement à ceux de la HC exprimée par la lignée MOPC21 (partenaire indirect de fusion). Une première hypothèse pouvant expliquer ce phénomène est que ceci constitue une coïncidence et que des différences seront observées plus loin dans la région V<sub>H</sub>; ou encore qu'il y a eu un réarrangement entre les deux chaînes qui aurait produit une chaîne fonctionnelle. Une autre hypothèse est que la spécificité de l'anticorps 72A1 à l'antigène gp350 provient de la LC. Il a en effet déjà été stipulé que la LC pouvait contribuer de façon dominante à la reconnaissance de l'épitope ainsi qu'à l'affinité de liaison d'un anticorps (25, 152). D'autres études sur la spécificité de divers anticorps ont soulevé la contribution importante, et souvent sous-estimée, de la LC au niveau de la liaison à l'antigène (47, 94, 150). Il est donc possible que la LC de l'anticorps 72A1 contienne en grande partie la spécificité de la liaison et que la HC joue un rôle plutôt structural, mais tout de même nécessaire à la liaison.

### 4.3 Lignée cellulaire exprimant la gp350 pour les essais d'ADCC

Des essais d'ADCC seront éventuellement effectués avec notre anticorps chimère. Le développement d'une lignée cellulaire stable exprimant la gp350 a été d'abord tenté avec les lignées cellulaires Daudi et Raji. Ces deux lignées sont résistantes aux cellules NK, ce qui permet leur utilisation pour des essais d'ADCC (123). Cette caractéristique est importante puisque des cellules sensibles ne permettraient pas de déterminer si l'activité observée est reliée au phénomène d'ADCC ou simplement à l'action des cellules NK. Une étude avait déjà démontré que la gp350 exprimée à la surface des cellules Raji entraînait une réponse ADCC lorsque les cellules étaient incubées en présence d'un anticorps spécifique à la gp350 mais non neutralisant, le 2L10 (86). Nous avons donc tenté de reproduire une expérience semblable avec l'anticorps 72A1 sur les cellules Daudi et Raji. Les cellules exprimaient la gp350, tel que le montrent les résultats d'immunofluorescence avec le sérum positif au VEB, mais l'anticorps 72A1 ne semblait pas reconnaître la gp350 sur ces cellules (figure 18). Un élément de réponse pourrait provenir d'une étude stipulant que le récepteur CR2 se trouvant à la surface de certaines cellules B bloquerait l'épitope de la gp350 étant la cible principale de la neutralisation, ce qui empêcherait la reconnaissance de la glycoprotéine par l'anticorps 72A1 (85). Ceci pourrait donc expliquer pourquoi aucune fluorescence n'a été observée sur les cellules Daudi et Raji, qui ont toutes deux le récepteur CR2, avec l'anticorps 72A1 alors que l'utilisation du sérum positif au VEB (qui contient probablement un mélange d'anticorps neutralisants et non neutralisants) a produit une fluorescence évidente. La même étude (85) avait également utilisé la lignée cellulaire CEM résistante aux cellules NK pour démontrer que l'absence du récepteur CR2 permettait la liaison de l'anticorps 72A1 à la gp350

exprimée à la surface de ces cellules. Nous avons donc entrepris cette voie, en établissant une lignée CEM exprimant de façon stable la gp350 pour une utilisation future pour les essais d'ADCC. L'analyse FACS du clone exprimant le plus fortement la gp350 a démontré que moins de la moitié des cellules exprimaient la protéine (figure 20). Il sera donc nécessaire de refaire une sélection avec le G418 en diluant les cellules du clone positif. Les cellules CEM-gp350, qui sont des lymphocytes T, ne représentent probablement pas le modèle idéal pour les essais d'ADCC puisque dans des conditions *in vivo*, ce phénomène serait observé sur des cellules B infectées par le VEB. Cependant, les expériences d'ADCC permettront tout de même de caractériser l'anticorps chimère et de comparer son activité avec celle de l'anticorps murin 72A1. Les résultats présentés dans cette section permettent ainsi de confirmer les observations de l'étude mentionnée et augmentent ainsi la plausibilité de l'hypothèse, légèrement controversée, stipulant qu'une interaction entre le CR2 et la gp350 voilerait l'épitope reconnu par l'anticorps 72A1.

#### **4.4 L'utilité d'un anticorps chimère neutralisant le VEB dans la prévention des SLP chez les patients à risque**

La poursuite du présent projet est importante car l'hypothèse avancée ici pourrait éventuellement permettre l'établissement d'une thérapie prophylactique efficace pour les patients à risque de développer un SLP. Il est essentiel de déterminer si le cycle lytique (productif) du VEB joue un rôle primordial dans le développement des SLP en engendrant une concentration élevée de particules virales qui infecteraient des cellules B adjacentes. Ces dernières seraient plus à risque d'être immortalisées par le VEB, puisque leur élimination dépend de la réponse des LTC et que celle-ci est

grandement supprimée par les médicaments administrés au receveur d'une greffe. L'anticorps chimère pourrait donc prévenir le développement d'un SLP chez les patients à risque en neutralisant le VEB et en empêchant l'infection de ces cellules adjacentes, avant même que le processus d'oncogenèse ne puisse se mettre en branle. L'anticorps chimère ne pourrait rien contre la cellule B initiale infectée par le VEB mais la réponse des LTC, bien qu'affaiblie par le traitement immunosuppresseur, devrait réussir à détruire cette cellule. Cette réponse n'est vraisemblablement pas suffisante pour contrôler une grande quantité de cellules B nouvellement infectées, mais il est logique de penser qu'elle pourrait détruire les quelques cellules B VEB-positives du donneur. Il est entendu que l'anticorps chimère n'aurait aucun effet sur le processus d'immortalisation et d'oncogenèse. Il agirait plutôt en diminuant considérablement la quantité de cellules qui pourraient justement entrer dans ce processus sous l'action du VEB. Le potentiel de la prévention des SLP par l'action d'anticorps a déjà été démontré dans une étude chez des souris SCID dans lesquelles on a injecté des LCL-VEB (1). Le groupe de souris ayant reçu des gammaglobulines développaient des tumeurs significativement moins fréquemment et plus tardivement que le groupe contrôle. Également, Carpentier *et al.* ont observé que six patients pédiatriques greffés ayant un SLP n'avaient pas développé d'anticorps contre l'antigène EA (de l'anglais pour « early antigen »), alors que 20 autres patients ayant également subi une transplantation mais n'ayant pas développé de SLP avaient un titre élevé d'anticorps contre EA (16). Il semble donc possible qu'un anticorps spécifique au VEB puisse offrir une protection contre le développement des SLP. Il est indispensable de persister dans cette voie pour les patients à risque de développer un SLP et qui pourraient bénéficier d'une thérapie prophylactique permettant d'éviter

une complication associée aux transplantations, ces dernières demeurant des épreuves déjà difficiles à subir.

#### **4.5 Conclusions et perspectives**

Le présent projet proposait la construction d'un anticorps monoclonal chimère ciblant la gp350 et neutralisant le VEB dans le but de bloquer l'infection des cellules B et de prévenir le développement d'un SLP chez les patients greffés à risque. La construction de l'anticorps a été entravée en grande partie par la présence de chaînes aberrantes dans l'hybridome 72A1. Une méthode a été établie pour isoler la LC fonctionnelle et la HC a été identifiée grâce aux résultats du séquençage peptidique de l'extrémité N-terminale de l'anticorps 72A1. La construction de la LC est complète et ne contient que deux changements mineurs dans l'extrémité N-terminale. Le développement de la HC est en cours dans le laboratoire de Dr. Alfieri avec la région V<sub>H</sub> nouvellement identifiée. Finalement, des cellules CEM exprimant la gp350 ont été sélectionnées pour les essais éventuels d'ADCC.

Malgré les difficultés rencontrées, la chimérisation de l'anticorps 72A1 demeure néanmoins la meilleure méthode pour diminuer l'immunogénicité de l'anticorps. Cette méthode est la plus simple en théorie et ne nécessite normalement pas une expertise poussée. De plus, l'anticorps chimère devrait être suffisamment humanisé pour ne pas déclencher une réponse humorale de type HAMA chez des patients immunodéprimés. La construction de la HC chimère devrait être accomplie rapidement, puisque les méthodes spécifiques à cette construction ont déjà été établies au cours du projet. La production en culture cellulaire et la détection de

l'anticorps chimère seront ensuite complétées selon les mêmes protocoles que décrits dans le présent document.

Les premiers tests effectués avec l'anticorps chimère seraient des tests de caractérisation et de comparaison avec les propriétés de l'anticorps murin 72A1. Un essai de neutralisation du VEB est primordial car il permettra de déterminer si l'anticorps peut vraiment exercer sa fonction de bloquer l'infection des lymphocytes B. L'anticorps serait également caractérisé par des essais d'ADCC sur la lignée cellulaire CEM exprimant la gp350 établie au cours du projet. L'obtention de la séquence complète de l'anticorps permettra également de faire des analyses tridimensionnelles dans le but d'élucider la structure de l'anticorps ainsi que les sites de liaison possibles à la gp350. La biodistribution de l'anticorps *in vivo* dans un modèle de souris Balb/c permettrait entre autres de déterminer sa demi-vie dans le sang de l'animal. Finalement, le test ultime dans lequel des souris SCID recevraient l'anticorps chimère et des LCL-VEB permettrait d'observer si l'anticorps peut réellement empêcher le développement de tumeurs dans des conditions *in vivo*.

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. **Abedi, M. R., B. Christensson, S. al-Masud, L. Hammarstrom, and C. I. Smith.** 1993. Gamma-globulin modulates growth of EBV-derived B-cell tumors in SCID mice reconstituted with human lymphocytes. *Int J Cancer* **55**:824-9.
2. **Adhikary, D., U. Behrends, R. Feederle, H. J. Delecluse, and J. Mautner.** 2008. Standardized and highly efficient expansion of Epstein-Barr virus-specific CD4<sup>+</sup> T cells by using virus-like particles. *J Virol* **82**:3903-11.
3. **Backovic, M., T. S. Jardetzky, and R. Longnecker.** 2007. Hydrophobic residues that form putative fusion loops of Epstein-Barr virus glycoprotein B are critical for fusion activity. *J Virol* **81**:9596-600.
4. **Beisel, C., J. Tanner, T. Matsuo, D. Thorley-Lawson, F. Kezdy, and E. Kieff.** 1985. Two major outer envelope glycoproteins of Epstein-Barr virus are encoded by the same gene. *J Virol* **54**:665-74.
5. **Bello, C., and E. M. Sotomayor.** 2007. Monoclonal antibodies for B-cell lymphomas: Rituximab and beyond. *Hematology*:233-242.
6. **Bender, N. K., C. E. Heilig, B. Droll, J. Wohlgemuth, F. P. Armbruster, and B. Heilig.** 2007. Immunogenicity, efficacy and adverse events of adalimumab in RA patients. *Rheumatol Int* **27**:269-74.
7. **Benkerrou, M., A. Durandy, and A. Fischer.** 1993. Therapy for transplant-related lymphoproliferative diseases. *Hematol Oncol Clin North Am* **7**:467-75.
8. **Boratynska, M., and D. Smolska.** 2008. Inhibition of mTOR by sirolimus induces remission of post-transplant lymphoproliferative disorders. *Transpl Int* **21**:605-8.
9. **Boratynska, M., E. Watorek, D. Smolska, D. Patrzalek, and M. Klinger.** 2007. Anticancer effect of sirolimus in renal allograft recipients with de novo malignancies. *Transplant Proc* **39**:2736-9.
10. **Bordron, A., A. Mankai, B. Bendaoud, A. Saraux, V. Devauchelle, I. Ghedira, C. Jamin, J. C. Pers, C. Berthou, and P. Youinou.** 2007. B cell-ablative therapy: where are we now? *Int J Immunopathol Pharmacol* **20**:655-9.
11. **Buell, J. F., T. G. Gross, M. J. Hanaway, J. Trofe, C. Muthiak, M. R. First, R. R. Alloway, and E. S. Woodle.** 2005. Chemotherapy for posttransplant lymphoproliferative disorder: the Israel Penn International Transplant Tumor Registry experience. *Transplant Proc* **37**:956-7.
12. **Buteau, C., S. N. Markovic, and E. Celis.** 2002. Challenges in the development of effective peptide vaccines for cancer. *Mayo Clin Proc* **77**:339-49.
13. **Caldwell, R. G., J. B. Wilson, S. J. Anderson, and R. Longnecker.** 1998. Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity* **9**:405-11.
14. **Callan, M. F. C.** 2004. The immune response to Epstein-Barr virus. *Microbes Infect* **6**:937-45.

15. **Carmen, S., and L. Jermutus.** 2002. Concepts in antibody phage display. *Brief Funct Genomic Proteomic* **1**:189-203.
16. **Carpentier, L., B. Tapiero, F. Alvarez, C. Viau, and C. Alfieri.** 2003. Epstein-Barr virus (EBV) early-antigen serologic testing in conjunction with peripheral blood EBV DNA load as a marker for risk of posttransplantation lymphoproliferative disease. *J Infect Dis* **188**:1853-64.
17. **Carroll, W. L., E. Mendel, and S. Levy.** 1988. Hybridoma fusion cell lines contain an aberrant kappa transcript. *Mol Immunol* **25**:991-5.
18. **Cepko, C. L., B. E. Roberts, and R. C. Mulligan.** 1984. Construction and applications of a highly transmissible murine retrovirus shuttle vector. *Cell* **37**:1053-62.
19. **Chen, A., M. Divisconte, X. Jiang, C. Quink, and F. Wang.** 2005. Epstein-Barr virus with the latent infection nuclear antigen 3B completely deleted is still competent for B-cell growth transformation in vitro. *J Virol* **79**:4506-9.
20. **Choquet, S., V. Leblond, R. Herbrecht, G. Socie, A. M. Stoppa, P. Vandenberghe, A. Fischer, F. Morschhauser, G. Salles, W. Feremans, E. Vilmer, M. N. Peraldi, P. Lang, Y. Lebranchu, E. Oksenhendler, J. L. Garnier, T. Lamy, A. Jaccard, A. Ferrant, F. Offner, O. Hermine, A. Moreau, S. Fafi-Kremer, P. Morand, L. Chatenoud, N. Berriot-Varoqueaux, L. Bergougnoux, and N. Milpied.** 2006. Efficacy and safety of rituximab in B-cell post-transplantation lymphoproliferative disorders: results of a prospective multicenter phase 2 study. *Blood* **107**:3053-7.
21. **Choquet, S., R. Trappe, V. Leblond, U. Jager, F. Davi, and S. Oertel.** 2007. CHOP-21 for the treatment of post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLD) following solid organ transplantation. *Haematologica* **92**:273-4.
22. **Cockfield, S. M.** 2001. Identifying the patient at risk for post-transplant lymphoproliferative disorder. *Transpl Infect Dis* **3**:70-8.
23. **Comoli, P., F. Ginevri, R. Maccario, C. Frasson, U. Valente, S. Basso, M. Labirio, G. C. Huang, E. Verrina, F. Baldanti, F. Perfumo, and F. Locatelli.** 2006. Successful in vitro priming of EBV-specific CD8+ T cells endowed with strong cytotoxic function from T cells of EBV-seronegative children. *Am J Transplant* **6**:2169-76.
24. **Comoli, P., R. Maccario, F. Locatelli, U. Valente, S. Basso, A. Garaventa, P. Toma, G. Botti, G. Melioli, F. Baldanti, A. Nocera, F. Perfumo, and F. Ginevri.** 2005. Treatment of EBV-related post-renal transplant lymphoproliferative disease with a tailored regimen including EBV-specific T cells. *Am J Transplant* **5**:1415-22.
25. **Costante, G., S. Portolano, T. Nishikawa, J. C. Jaume, G. D. Chazenbalk, B. Rapoport, and S. M. McLachlan.** 1994. Recombinant thyroid peroxidase-specific autoantibodies. II. Role of individual heavy and light chains in determining epitope recognition. *Endocrinology* **135**:25-30.
26. **Cullis, B., R. D'Souza, P. McCullagh, S. Harries, A. Nicholls, R. Lee, and C. Bingham.** 2006. Sirolimus-induced remission of posttransplantation lymphoproliferative disorder. *Am J Kidney Dis* **47**:e67-72.
27. **Daibata, M., K. Bandobashi, M. Kuroda, S. Imai, I. Miyoshi, and H. Taguchi.** 2005. Induction of lytic Epstein-Barr virus (EBV) infection by

- synergistic action of rituximab and dexamethasone renders EBV-positive lymphoma cells more susceptible to ganciclovir cytotoxicity in vitro and in vivo. *J Virol* **79**:5875-9.
28. **Darenkov, I. A., M. A. Marcarelli, G. P. Basadonna, A. L. Friedman, K. M. Lorber, J. G. Howe, J. Crouch, M. J. Bia, A. S. Kliger, and M. I. Lorber.** 1997. Reduced incidence of Epstein-Barr virus-associated posttransplant lymphoproliferative disorder using preemptive antiviral therapy. *Transplantation* **64**:848-52.
  29. **Davis, C. L., K. L. Harrison, J. P. McVicar, P. J. Forg, M. P. Bronner, and C. L. Marsh.** 1995. Antiviral prophylaxis and the Epstein Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disorder. *Clin Transplant* **9**:53-9.
  30. **Davis, C. L., B. L. Wood, D. E. Sabath, J. S. Joseph, C. Stehman-Breen, and V. C. Broudy.** 1998. Interferon-alpha treatment of posttransplant lymphoproliferative disorder in recipients of solid organ transplants. *Transplantation* **66**:1770-9.
  31. **Dharnidharka, V. R., and C. E. Araya.** 2007. Post-transplant lymphoproliferative disease. *Pediatr Nephrol* [Epub ahead of print].
  32. **Dominguez, J., K. Mahalati, B. Kiberd, V. C. McAlister, and A. S. MacDonald.** 2000. Conversion to rapamycin immunosuppression in renal transplant recipients: report of an initial experience. *Transplantation* **70**:1244-7.
  33. **Dorner, T., and G. R. Burmester.** 2008. New approaches of B-cell-directed therapy: beyond rituximab. *Curr Opin Rheumatol* **20**:263-8.
  34. **Dotti, G., R. Fiocchi, T. Motta, C. Mammana, E. Gotti, S. Riva, P. Cornelli, B. Gridelli, P. Viero, E. Oldani, P. Ferrazzi, G. Remuzzi, T. Barbui, and A. Rambaldi.** 2002. Lymphomas occurring late after solid-organ transplantation: influence of treatment on the clinical outcome. *Transplantation* **74**:1095-102.
  35. **Duan, L., O. Bagasra, M. A. Laughlin, J. W. Oakes, and R. J. Pomerantz.** 1994. Potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by an intracellular anti-Rev single-chain antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:5075-9.
  36. **Duan, L., and R. J. Pomerantz.** 1994. Elimination of endogenous aberrant kappa chain transcripts from sp2/0-derived hybridoma cells by specific ribozyme cleavage: utility in genetic therapy of HIV-1 infections. *Nucleic Acids Res* **22**:5433-8.
  37. **El-Salem, M., P. N. Raghunath, M. Marzec, P. Wlodarski, D. Tsai, E. Hsi, and M. A. Wasik.** 2007. Constitutive activation of mTOR signaling pathway in post-transplant lymphoproliferative disorders. *Lab Invest* **87**:29-39.
  38. **Eliopoulos, A. G., and L. S. Young.** 1998. Activation of the cJun N-terminal kinase (JNK) pathway by the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1). *Oncogene* **16**:1731-42.
  39. **Elliott, S. L., A. Suhrbier, J. J. Miles, G. Lawrence, S. J. Pye, T. T. Le, A. Rosenstengel, T. Nguyen, A. Allworth, S. R. Burrows, J. Cox, D. Pye, D. J. Moss, and M. Bharadwaj.** 2008. Phase I trial of a CD8+ T-cell peptide epitope-based vaccine for infectious mononucleosis. *J Virol* **82**:1448-57.

40. **Elstrom, R. L., C. Andreadis, N. A. Aqui, V. N. Ahya, R. D. Bloom, S. C. Brozena, K. M. Olthoff, S. J. Schuster, S. D. Nasta, E. A. Stadtmauer, and D. E. Tsai.** 2006. Treatment of PTLD with rituximab or chemotherapy. *Am J Transplant* **6**:569-76.
41. **Faro, A.** 1998. Interferon-alpha and its effects on post-transplant lymphoproliferative disorders. *Springer Semin Immunopathol* **20**:425-36.
42. **Feng, S., J. F. Buell, R. S. Chari, J. M. DiMaio, and D. W. Hanto.** 2003. Tumors and transplantation: The 2003 Third Annual ASTS State-of-the-Art Winter Symposium. *Am J Transplant* **3**:1481-7.
43. **Feng, W. H., G. Hong, H. J. Delecluse, and S. C. Kenney.** 2004. Lytic induction therapy for Epstein-Barr virus-positive B-cell lymphomas. *J Virol* **78**:1893-902.
44. **Feng, W. H., B. Israel, N. Raab-Traub, P. Busson, and S. C. Kenney.** 2002. Chemotherapy induces lytic EBV replication and confers ganciclovir susceptibility to EBV-positive epithelial cell tumors. *Cancer Res* **62**:1920-6.
45. **Feng, W. H., E. Westphal, A. Mauser, N. Raab-Traub, M. L. Gulley, P. Busson, and S. C. Kenney.** 2002. Use of adenovirus vectors expressing Epstein-Barr virus (EBV) immediate-early protein BZLF1 or BRLF1 to treat EBV-positive tumors. *J Virol* **76**:10951-9.
46. **Flint, S., L. Enquist, V. Racaniello, and A. Skalka.** 2004. Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control of Animal Viruses, Second ed. ASM Press, Washington, DC.
47. **Fujimura, Y., H. Tachibana, N. Eto, and K. Yamada.** 2000. Antigen binding of an ovomucoid-specific antibody is affected by a carbohydrate chain located on the light chain variable region. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**:2298-305.
48. **Funch, D. P., A. M. Walker, G. Schneider, N. J. Ziyadeh, and M. D. Pescovitz.** 2005. Ganciclovir and acyclovir reduce the risk of post-transplant lymphoproliferative disorder in renal transplant recipients. *Am J Transplant* **5**:2894-900.
49. **George, A., and C. Urch.** 2000. Diagnostics and Therapeutics Antibodies (Methods in Molecular Medicine). Human Press, Totowa, NJ.
50. **Ghosh, S. K., L. W. Forman, I. Akinsheye, S. P. Perrine, and D. V. Faller.** 2007. Short, discontinuous exposure to butyrate effectively sensitizes latently EBV-infected lymphoma cells to nucleoside analogue antiviral agents. *Blood Cells Mol Dis* **38**:57-65.
51. **Gires, O., U. Zimmer-Strobl, R. Gonnella, M. Ueffing, G. Marschall, R. Zeidler, D. Pich, and W. Hammerschmidt.** 1997. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *Embo J* **16**:6131-40.
52. **Golay, J. T., E. A. Clark, and P. C. Beverley.** 1985. The CD20 (Bp35) antigen is involved in activation of B cells from the G0 to the G1 phase of the cell cycle. *J Immunol* **135**:3795-801.
53. **Gonzalez-Barca, E., E. Domingo-Domenech, F. J. Capote, J. Gomez-Codina, A. Salar, A. Bailen, J. M. Ribera, A. Lopez, J. Briones, A. Munoz, M. Encuentra, and A. F. de Sevilla.** 2007. Prospective phase II trial

- of extended treatment with rituximab in patients with B-cell post-transplant lymphoproliferative disease. *Haematologica* **92**:1489-94.
54. **Gottschalk, S., C. M. Rooney, and H. E. Heslop.** 2005. Post-transplant lymphoproliferative disorders. *Annu Rev Med* **56**:29-44.
  55. **Green, M., M. Kaufmann, J. Wilson, and J. Reyes.** 1997. Comparison of intravenous ganciclovir followed by oral acyclovir with intravenous ganciclovir alone for prevention of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus disease after liver transplantation in children. *Clin Infect Dis* **25**:1344-9.
  56. **Green, M., M. G. Michaels, S. A. Webber, D. Rowe, and J. Reyes.** 1999. The management of Epstein-Barr virus associated post-transplant lymphoproliferative disorders in pediatric solid-organ transplant recipients. *Pediatr Transplant* **3**:271-81.
  57. **Gross, T. G., J. C. Bucuvalas, J. R. Park, T. C. Greiner, S. H. Hinrich, S. S. Kaufman, A. N. Langnas, R. A. McDonald, F. C. Ryckman, B. W. Shaw, D. L. Sudan, and J. C. Lynch.** 2005. Low-dose chemotherapy for Epstein-Barr virus-positive post-transplantation lymphoproliferative disease in children after solid organ transplantation. *J Clin Oncol* **23**:6481-8.
  58. **Guasparri, I., D. Bubman, and E. Cesarman.** 2008. EBV LMP2A affects LMP1-mediated NF-kappaB signaling and survival of lymphoma cells by regulating TRAF2 expression. *Blood* **111**:3813-20.
  59. **Gulley, M. L., M. Raphael, C. T. Lutz, D. W. Ross, and N. Raab-Traub.** 1992. Epstein-Barr virus integration in human lymphomas and lymphoid cell lines. *Cancer* **70**:185-91.
  60. **Guppy, A. E., E. Rawlings, J. A. Madrigal, P. L. Amlot, and L. D. Barber.** 2007. A quantitative assay for Epstein-Barr Virus-specific immunity shows interferon-gamma producing CD8+ T cells increase during immunosuppression reduction to treat posttransplant lymphoproliferative disease. *Transplantation* **84**:1534-9.
  61. **Haddad, E., S. Paczesny, V. Leblond, J. M. Seigneurin, M. Stern, A. Achkar, M. Bauwens, V. Delwail, D. Debray, C. Duvoux, P. Hubert, B. Hurault de Ligny, J. Wijdenes, A. Durandy, and A. Fischer.** 2001. Treatment of B-lymphoproliferative disorder with a monoclonal anti-interleukin-6 antibody in 12 patients: a multicenter phase 1-2 clinical trial. *Blood* **97**:1590-7.
  62. **Haque, T., I. Johannessen, D. Dombagoda, C. Sengupta, D. M. Burns, P. Bird, G. Hale, G. Mieli-Vergani, and D. H. Crawford.** 2006. A mouse monoclonal antibody against Epstein-Barr virus envelope glycoprotein 350 prevents infection both in vitro and in vivo. *J Infect Dis* **194**:584-87.
  63. **Haque, T., G. M. Wilkie, M. M. Jones, C. D. Higgins, G. Urquhart, P. Wingate, D. Burns, K. McAulay, M. Turner, C. Bellamy, P. L. Amlot, D. Kelly, A. MacGilchrist, M. K. Gandhi, A. J. Swerdlow, and D. H. Crawford.** 2007. Allogeneic cytotoxic T-cell therapy for EBV-positive posttransplantation lymphoproliferative disease: results of a phase 2 multicenter clinical trial. *Blood* **110**:1123-31.
  64. **Harada, S., and E. Kieff.** 1997. Epstein-Barr virus nuclear protein LP stimulates EBNA-2 acidic domain-mediated transcriptional activation. *J Virol* **71**:6611-8.

65. **Harley, J. B., I. T. Harley, J. M. Guthridge, and J. A. James.** 2006. The curiously suspicious: a role for Epstein-Barr virus in lupus. *Lupus* **15**:768-77.
66. **Hayashida, M., K. Ogita, T. Matsuura, Y. Takahashi, Y. Nishimoto, S. Ohga, T. Hara, Y. Soejima, A. Taketomi, Y. Maehara, K. Kohashi, M. Tsuneyoshi, and T. Taguchi.** 2007. Successful prolonged rituximab treatment for post-transplant lymphoproliferative disorder following living donor liver transplantation in a child. *Pediatr Transplant* **11**:671-5.
67. **Hedrick, J. A., Z. Lao, S. G. Lipps, Y. Wang, S. C. Todd, J. D. Lambris, and C. D. Tsoukas.** 1994. Characterization of a 70-kDa, EBV gp350/220-binding protein on HSB-2 T cells. *J Immunol* **153**:4418-26.
68. **Hoffman, G. J., S. G. Lazarowitz, and S. D. Hayward.** 1980. Monoclonal antibody against a 250,000-dalton glycoprotein of Epstein-Barr virus identifies a membrane antigen and a neutralizing antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**:2979-83.
69. **Holliger, P., and P. J. Hudson.** 2005. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* **23**:1126-36.
70. **Hong, G. K., M. L. Gulley, W.-H. Feng, H.-J. Delecluse, E. Holley-Guthrie, and S. C. Kenney.** 2005. Epstein-Barr virus lytic infection contributes to lymphoproliferative disease in a SCID mouse model. *J Virol* **79**:13993-14003.
71. **Hutt-Fletcher, L. M.** 2007. Epstein-Barr virus entry. *J Virol* **81**:7825-32.
72. **Hwang, W. Y., J. C. Almagro, T. N. Buss, P. Tan, and J. Foote.** 2005. Use of human germline genes in a CDR homology-based approach to antibody humanization. *Methods* **36**:35-42.
73. **Hwang, W. Y., and J. Foote.** 2005. Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods* **36**:3-10.
74. **Irani, Y., M. Tea, R. G. Tilton, D. J. Coster, K. A. Williams, and H. M. Brereton.** 2008. PCR amplification of the functional immunoglobulin heavy chain variable gene from a hybridoma in the presence of two aberrant transcripts. *J Immunol Methods* **336**:246-50.
75. **Izumi, K. M., and E. D. Kieff.** 1997. The Epstein-Barr virus oncogene product latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein to mediate B lymphocyte growth transformation and activate NF-kappaB. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:12592-7.
76. **Jakobovits, A., R. G. Amado, X. Yang, L. Roskos, and G. Schwab.** 2007. From XenoMouse technology to panitumumab, the first fully human antibody product from transgenic mice. *Nat Biotechnol* **25**:1134-43.
77. **Janz, A., M. Oezel, C. Kurzeder, J. Mautner, D. Pich, M. Kost, W. Hammerschmidt, and H. J. Delecluse.** 2000. Infectious Epstein-Barr virus lacking major glycoprotein BLLF1 (gp350/220) demonstrates the existence of additional viral ligands. *J Virol* **74**:10142-52.
78. **Johannsen, E., M. Luftig, M. R. Chase, S. Weicksel, E. Cahir-McFarland, D. Illanes, D. Sarracino, and E. Kieff.** 2004. Proteins of purified Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:16286-91.
79. **Jones, M. L., and R. T. Barnard.** 2005. Chimerization of multiple antibody classes using splice overlap extension PCR. *Biotechniques* **38**:181-2.

80. **Jones, R. J., W. T. Seaman, W.-H. Feng, E. Barlow, S. Dickerson, H.-J. Delecluse, and S. C. Kenney.** 2007. Roles of lytic viral infection and IL-6 in early versus late passage lymphoblastoid cell lines and EBV-associated lymphoproliferative disease. *Int J Cancer* **121**:1274–81.
81. **Kashmiri, S. V., R. De Pascalis, N. R. Gonzales, and J. Schlom.** 2005. SDR grafting--a new approach to antibody humanization. *Methods* **36**:25-34.
82. **Katz, B. Z., N. Raab-Traub, and G. Miller.** 1989. Latent and replicating forms of Epstein-Barr virus DNA in lymphomas and lymphoproliferative diseases. *J Infect Dis* **160**:589-98.
83. **Kenney, S.** 2006. Theodore E. Woodward Award: Development of Novel, EBV-Targeted Therapies for EBV-Positive Tumors. *Trans Am Clin Climatol Assoc* **117**:55-74.
84. **Khanna, R., S. Bell, M. Sherritt, A. Galbraith, S. R. Burrows, L. Rafter, B. Clarke, R. Slaughter, M. C. Falk, J. Douglass, T. Williams, S. L. Elliott, and D. J. Moss.** 1999. Activation and adoptive transfer of Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T cells in solid organ transplant patients with posttransplant lymphoproliferative disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:10391-6.
85. **Khyatti, M., A. Ahmad, M. Blagdon, R. Frade, and J. Menezes.** 1998. Binding of the endogenously expressed Epstein-Barr virus (EBV) envelope glycoprotein gp350 with the viral receptor masks the major EBV-neutralizing epitope and affects gp350-specific ADCC. *J Leukoc Biol* **64**:192-7.
86. **Khyatti, M., P. C. Patel, I. Stefanescu, and J. menezes.** 1991. Epstein-Barr virus (EBV) glycoprotein gp350 expressed on transfected cells resistant to natural killer cell activity serves as a target antigen for EBV-specific antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Virol* **65**:996-1001.
87. **Kim, S. J., Y. Park, and H. J. Hong.** 2005. Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. *Mol Cells* **20**:17-29.
88. **Kimball, J. A., D. J. Norman, C. F. Shield, T. J. Schroeder, P. Lisi, M. Garovoy, J. B. O'Connell, F. Stuart, S. V. McDiarmid, and W. Wall.** 1995. The OKT3 Antibody Response Study: a multicentre study of human anti-mouse antibody (HAMA) production following OKT3 use in solid organ transplantation. *Transpl Immunol* **3**:212-21.
89. **Kirschner, A. N., A. S. Lowrey, R. Longnecker, and T. S. Jardetzky.** 2007. Binding-site interactions between Epstein-Barr virus fusion proteins gp42 and gH/gL reveal a peptide that inhibits both epithelial and B-cell membrane fusion. *J Virol* **81**:9216-29.
90. **Kirschner, A. N., J. Omerovic, B. Popov, R. Longnecker, and T. S. Jardetzky.** 2006. Soluble Epstein-Barr virus glycoproteins gH, gL, and gp42 form a 1:1:1 stable complex that acts like soluble gp42 in B-cell fusion but not in epithelial cell fusion. *J Virol* **80**:9444-54.
91. **Knoop, C., A. Kentos, M. Remmelink, C. Garbar, S. Goldman, W. Feremans, and M. Estenne.** 2006. Post-transplant lymphoproliferative disorders after lung transplantation: first-line treatment with rituximab may induce complete remission. *Clin Transplant* **20**:179-87.

92. **Koffman, B. H., A. S. Kennedy, M. Heyman, J. Colonna, and C. Howell.** 2000. Use of radiation therapy in posttransplant lymphoproliferative disorder (PTLD) after liver transplantation. *Int J Cancer* **90**:104-9.
93. **Krebber, A., S. Bornhauser, J. Burmester, A. Honegger, J. Willuda, H. R. Bosshard, and A. Pluckthun.** 1997. Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *J Immunol Methods* **201**:35-55.
94. **Kumar, S., S. Nagl, J. K. Kalsi, C. T. Ravirajan, D. Athwal, D. S. Latchman, L. H. Pearl, and D. A. Isenberg.** 2005. Beta-2-glycoprotein specificity of human anti-phospholipid antibody resides on the light chain: a novel mechanism for acquisition of cross-reactivity by an autoantibody. *Mol Immunol* **42**:39-48.
95. **Kutok, J. L., and F. Wang.** 2006. Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol* **1**:375-404.
96. **Lazure, C., M. Villemure, D. Gauthier, R. J. Naude, and M. Mbikay.** 2001. Characterization of ostrich (*Struthio camelus*) beta-microseminoprotein (MSP): identification of homologous sequences in EST databases and analysis of their evolution during speciation. *Protein Sci* **10**:2207-18.
97. **Leblond, V., L. Sutton, R. Dorent, F. Davi, M. O. Bitker, J. Gabarre, F. Charlotte, J. J. Ghossoub, C. Fourcade, A. Fischer, and et al.** 1995. Lymphoproliferative disorders after organ transplantation: a report of 24 cases observed in a single center. *J Clin Oncol* **13**:961-8.
98. **Lee, W., Y. H. Hwang, S. K. Lee, C. Subramanian, and E. S. Robertson.** 2001. An Epstein-Barr virus isolated from a lymphoblastoid cell line has a 16-kilobase-pair deletion which includes gp350 and the Epstein-Barr virus nuclear antigen 3A. *J Virol* **75**:8556-68.
99. **Lees, J. F., J. E. Arrand, S. D. Pepper, J. P. Stewart, M. Mackett, and J. R. Arrand.** 1993. The Epstein-Barr virus candidate vaccine antigen gp340/220 is highly conserved between virus types A and B. *Virology* **195**:578-86.
100. **Lei, K. I., L. Y. Chan, W. Y. Chan, P. J. Johnson, and Y. M. Lo.** 2000. Quantitative analysis of circulating cell-free Epstein-Barr virus (EBV) DNA levels in patients with EBV-associated lymphoid malignancies. *Br J Haematol* **111**:239-46.
101. **Lerner, A. M., S. H. Beqaj, R. G. Deeter, and J. T. Fitzgerald.** 2007. Valacyclovir treatment in Epstein-Barr virus subset chronic fatigue syndrome: thirty-six months follow-up. *In Vivo* **21**:707-13.
102. **Levine, S. M., L. Angel, A. Anzueto, I. Susanto, J. I. Peters, E. Y. Sako, and C. L. Bryan.** 1999. A low incidence of posttransplant lymphoproliferative disorder in 109 lung transplant recipients. *Chest* **116**:1273-7.
103. **Li, H. P., and Y. S. Chang.** 2003. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1: structure and functions. *J Biomed Sci* **10**:490-504.
104. **Li, J., B. Mookerjee, J. Wagner, and N. Flomenberg.** 2007. In vitro methods for generating highly purified EBV associated tumor antigen-specific T cells by using solid phase T cell selection system for immunotherapy. *J Immunol Methods* **328**:169-81.

105. **Li, Q., C. Buranathai, C. Grose, and L. M. Hutt-Fletcher.** 1997. Chaperone functions common to nonhomologous Epstein-Barr virus gL and Varicella-Zoster virus gL proteins. *J Virol* **71**:1667-70.
106. **Lim, W. H., G. R. Russ, and P. T. Coates.** 2006. Review of Epstein-Barr virus and post-transplant lymphoproliferative disorder post-solid organ transplantation. *Nephrology (Carlton)* **11**:355-66.
107. **Limaye, A. P., M. L. Huang, E. E. Atienza, J. M. Ferrenberg, and L. Corey.** 1999. Detection of Epstein-Barr virus DNA in sera from transplant recipients with lymphoproliferative disorders. *J Clin Microbiol* **37**:1113-6.
108. **Lin, J. C., M. C. Smith, and J. S. Pagano.** 1984. Prolonged inhibitory effect of 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine against replication of Epstein-Barr virus. *J Virol* **50**:50-5.
109. **Liu, Z., B. Savoldo, H. Huls, T. Lopez, A. Gee, J. Wilson, M. K. Brenner, H. E. Heslop, and C. M. Rooney.** 2002. Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T lymphocytes for the prevention and treatment of EBV-associated post-transplant lymphomas. *Recent Results Cancer Res* **159**:123-33.
110. **Lockey, T. D., X. Zhan, S. Surman, C. E. Sample, and J. L. Hurwitz.** 2008. Epstein-Barr virus vaccine development: a lytic and latent protein cocktail. *Front Biosci* **13**:5916-27.
111. **Longnecker, R., and E. Kieff.** 1990. A second Epstein-Barr virus membrane protein (LMP2) is expressed in latent infection and colocalizes with LMP1. *J Virol* **64**:2319-26.
112. **Mauray, S., M. T. Fuzzati-Armentero, P. Trouillet, M. Ruegg, G. Nicoloso, M. Hart, L. Aarden, M. Schapira, and M. A. Duchosal.** 2000. Epstein-Barr virus-dependent lymphoproliferative disease: critical role of IL-6. *Eur J Immunol* **30**:2065-73.
113. **McShane, M. P., and R. Longnecker.** 2004. Cell-surface expression of a mutated Epstein-Barr virus glycoprotein B allows fusion independent of other viral proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:17474-9.
114. **Mentzer, S. J., S. P. Perrine, and D. V. Faller.** 2001. Epstein-Barr virus post-transplant lymphoproliferative disease and virus-specific therapy: pharmacological re-activation of viral target genes with arginine butyrate. *Transpl Infect Dis* **3**:177-85.
115. **Miller, G., L. Heston, and G. Hoffman.** 1982. Neutralization of lymphocyte immortalization by different strains of Epstein-Barr virus with a murine monoclonal antibody. *Infect Immun* **37**:1028-31.
116. **Mosier, D. E.** 1996. Viral pathogenesis in hu-PBL-SCID mice. *Semin Immunol* **8**:255-62.
117. **Mosier, D. E., G. R. Picchio, M. B. Kirven, J. L. Garnier, B. E. Torbett, S. M. Baird, R. Kobayashi, and T. J. Kipps.** 1992. EBV-induced human B cell lymphomas in hu-PBL-SCID mice. *AIDS Res Hum Retroviruses* **8**:735-40.
118. **Moutschen, M., P. Leonard, E. M. Sokal, F. Smets, M. Haumont, P. Mazzu, A. Bollen, F. Denamur, P. Peeters, G. Dubin, and M. Denis.** 2007. Phase I/II studies to evaluate safety and immunogenicity of a recombinant gp350 Epstein-Barr virus vaccine in healthy adults. *Vaccine* **25**:4697-705.

119. **Mullen, M. M., K. M. Haan, R. Longnecker, and T. S. Jardetzky.** 2002. Structure of the Epstein-Barr virus gp42 protein bound to the MHC class II receptor HLA-DR1. *Mol Cell* **9**:375-85.
120. **Nadler, L. M., J. Ritz, R. Hardy, J. M. Pesando, S. F. Schlossman, and P. Stashenko.** 1981. A unique cell surface antigen identifying lymphoid malignancies of B cell origin. *J Clin Invest* **67**:134-40.
121. **Nemerow, G. R., C. Mold, V. K. Schwend, V. Tollefson, and N. R. Cooper.** 1987. Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *J Virol* **61**:1416-20.
122. **Nepomuceno, R. R., C. E. Balatoni, Y. Natkunam, A. L. Snow, S. M. Krams, and O. M. Martinez.** 2003. Rapamycin inhibits the interleukin 10 signal transduction pathway and the growth of Epstein Barr virus B-cell lymphomas. *Cancer Res* **63**:4472-80.
123. **North, J., I. Bakhsh, C. Marden, H. Pittman, E. Addison, C. Navarrete, R. Anderson, and M. W. Lowdell.** 2007. Tumor-primed human natural killer cells lyse NK-resistant tumor targets: evidence of a two-stage process in resting NK cell activation. *J Immunol* **178**:85-94.
124. **Ohga, S., A. Nomura, H. Takada, and T. Hara.** 2002. Immunological aspects of Epstein-Barr virus infection. *Crit Rev Oncol Hematol* **44**:203-15.
125. **Omerovic, J., L. Lev, and R. Longnecker.** 2005. The amino terminus of Epstein-Barr virus glycoprotein gH is important for fusion with epithelial and B cells. *J Virol* **79**:12408-15.
126. **Omiya, R., C. Buteau, H. Kobayashi, C. V. Paya, and E. Celis.** 2002. Inhibition of EBV-induced lymphoproliferation by CD4(+) T cells specific for an MHC class II promiscuous epitope. *J Immunol* **169**:2172-9.
127. **Papadopoulos, E. B., M. Ladanyi, D. Emanuel, S. Mackinnon, F. Boulad, M. H. Carabasi, H. Castro-Malaspina, B. H. Childs, A. P. Gillio, T. N. Small, and et al.** 1994. Infusions of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med* **330**:1185-91.
128. **Pascual, J.** 2007. Post-transplant lymphoproliferative disorder--the potential of proliferation signal inhibitors. *Nephrol Dial Transplant* **22 Suppl 1**:i27-35.
129. **Patel, T., and K. B. Gordon.** 2004. Adalimumab: efficacy and safety in psoriasis and rheumatoid arthritis. *Dermatol Ther* **17**:427-31.
130. **Peng, R., S. C. Moses, J. Tan, E. Kremmer, and P. D. Ling.** 2005. The Epstein-Barr virus EBNA-LP protein preferentially coactivates EBNA2-mediated stimulation of latent membrane proteins expressed from the viral divergent promoter. *J Virol* **79**:4492-505.
131. **Penn, I.** 1998. The role of immunosuppression in lymphoma formation. *Springer Semin Immunopathol* **20**:343-55.
132. **Perrine, S. P., O. Hermine, T. Small, F. Suarez, R. O'Reilly, F. Boulad, J. Fingerroth, M. Askin, A. Levy, S. J. Mentzer, M. Di Nicola, A. M. Gianni, C. Klein, S. Horwitz, and D. V. Faller.** 2007. A phase 1/2 trial of arginine butyrate and ganciclovir in patients with Epstein-Barr virus-associated lymphoid malignancies. *Blood* **109**:2571-8.

133. **Pescovitz, M. D.** 2006. Rituximab, an anti-CD20 monoclonal antibody: History and mechanism of action. *American Journal of Transplantation* **6**:859–66.
134. **Preiksaitis, J. K.** 2004. New developments in the diagnosis and management of posttransplantation lymphoproliferative disorders in solid organ transplant recipients. *Clin Infect Dis* **39**:1016-23.
135. **Qualtiere, L. F., J. F. Decoteau, and M. Hassan Nasr-el-Din.** 1987. Epitope mapping of the major Epstein-Barr virus outer envelope glycoprotein gp350/220. *J Gen Virol* **68 ( Pt 2)**:535-43.
136. **Reff, M. E., K. Carner, K. S. Chambers, P. C. Chinn, J. E. Leonard, R. Raab, R. A. Newman, N. Hanna, and D. R. Anderson.** 1994. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* **83**:435-45.
137. **Rezk, S. A., and L. M. Weiss.** 2007. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders. *Hum Pathol* **38**:1293-304.
138. **Roberge, C. J., P. E. Poubelle, A. D. Beaulieu, D. Heitz, and J. Gosselin.** 1996. The IL-1 and IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) response of human neutrophils to EBV stimulation. Preponderance of IL-1Ra detection. *J Immunol* **156**:4884-91.
139. **Rochford, R., and D. E. Mosier.** 1995. Differential Epstein-Barr virus gene expression in B-cell subsets recovered from lymphomas in SCID mice after transplantation of human peripheral blood lymphocytes. *J Virol* **69**:150-5.
140. **Rooney, C. M., C. A. Smith, C. Y. Ng, S. K. Loftin, J. W. Sixbey, Y. Gan, D. K. Srivastava, L. C. Bowman, R. A. Krance, M. K. Brenner, and H. E. Heslop.** 1998. Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood* **92**:1549-55.
141. **Rowe, M., L. S. Young, J. Crocker, H. Stokes, S. Henderson, and A. B. Rickinson.** 1991. Epstein-Barr virus (EBV)-associated lymphoproliferative disease in the SCID mouse model: implications for the pathogenesis of EBV-positive lymphomas in man. *J Exp Med* **173**:147-58.
142. **Salek-Ardakani, S., S. A. Lyons, and J. R. Arrand.** 2004. Epstein-Barr virus promotes human monocyte survival and maturation through a paracrine induction of IFN-alpha. *J Immunol* **173**:321-31.
143. **Sambrook, J., E. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
144. **Saridakis, V., Y. Sheng, F. Sarkari, M. N. Holowaty, K. Shire, T. Nguyen, R. G. Zhang, J. Liao, W. Lee, A. M. Edwards, C. H. Arrowsmith, and L. Frappier.** 2005. Structure of the p53 binding domain of HAUSP/USP7 bound to Epstein-Barr nuclear antigen 1 implications for EBV-mediated immortalization. *Mol Cell* **18**:25-36.
145. **Savoldo, B., M. L. Cubbage, A. G. Durett, J. Goss, M. H. Huls, Z. Liu, L. Teresita, A. P. Gee, P. D. Ling, M. K. Brenner, H. E. Heslop, and C. M. Rooney.** 2002. Generation of EBV-specific CD4+ cytotoxic T cells from virus naive individuals. *J Immunol* **168**:909-18.

146. **Scala, G., I. Quinto, M. R. Ruocco, A. Arcucci, M. Mallardo, P. Caretto, G. Forni, and S. Venuta.** 1990. Expression of an exogenous interleukin 6 gene in human Epstein Barr virus B cells confers growth advantage and in vivo tumorigenicity. *J Exp Med* **172**:61-8.
147. **Schubert, S., C. Renner, M. Hammer, H. Abdul-Khaliq, H. B. Lehmkuhl, F. Berger, R. Hetzer, and P. Reinke.** 2008. Relationship of immunosuppression to Epstein-Barr viral load and lymphoproliferative disease in pediatric heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant* **27**:100-5.
148. **Sehgal, S. N.** 2003. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc* **35**:7S-14S.
149. **Sherritt, M. A., M. Bharadwaj, J. M. Burrows, L. E. Morrison, S. L. Elliott, J. E. Davis, L. M. Kear, R. E. Slaughter, S. C. Bell, A. J. Galbraith, R. Khanna, and D. J. Moss.** 2003. Reconstitution of the latent T-lymphocyte response to Epstein-Barr virus is coincident with long-term recovery from posttransplant lymphoma after adoptive immunotherapy. *Transplantation* **75**:1556-60.
150. **Smith-Gill, S. J., P. A. Hamel, M. H. Klein, S. Rudikoff, and K. J. Dorrington.** 1986. Contribution of the VK4 light chain to antibody specificity for lysozyme and beta (1,6)D-galactan. *Mol Immunol* **23**:919-26.
151. **Sokal, E. M., K. Hoppenbrouwers, C. Vandermeulen, M. Moutschen, P. Leonard, A. Moreels, M. Haumont, A. Bollen, F. Smets, and M. Denis.** 2007. 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* **196**:1749-53.
152. **Song, M. K., M. S. Oh, J. H. Lee, J. N. Lee, J. H. Chung, S. G. Park, and I. H. Choi.** 2000. Light chain of natural antibody plays a dominant role in protein antigen binding. *Biochem Biophys Res Commun* **268**:390-4.
153. **Subklewe, M., K. Sebelin, A. Block, A. Meier, A. Roukens, C. Paludan, J. F. Fonteneau, R. M. Steinman, and C. Munz.** 2005. Dendritic cells expand Epstein Barr virus specific CD8<sup>+</sup> T cell responses more efficiently than EBV transformed B cells. *Hum Immunol* **66**:938-49.
154. **Sudheendra, D., M. M. Barth, U. Hegde, W. H. Wilson, and B. J. Wood.** 2006. Radiofrequency ablation of lymphoma. *Blood* **107**:1624-6.
155. **Swaminathan, S., R. Hesselton, J. Sullivan, and E. Kieff.** 1993. Epstein-Barr virus recombinants with specifically mutated BCRF1 genes. *J Virol* **67**:7406-13.
156. **Swinnen, L. J.** 2006. Immune-cell treatment of Epstein--Barr-virus-associated lymphoproliferative disorders. *Best Pract Res Clin Haematol* **19**:839-47.
157. **Szakonyi, G., M. G. Klein, J. P. Hannan, K. A. Young, R. Z. Ma, R. Asokan, V. M. Holers, and X. S. Chen.** 2006. Structure of the Epstein-Barr virus major envelope glycoprotein. *Nature Structural and Molecular Biology* **13**:996-1001.

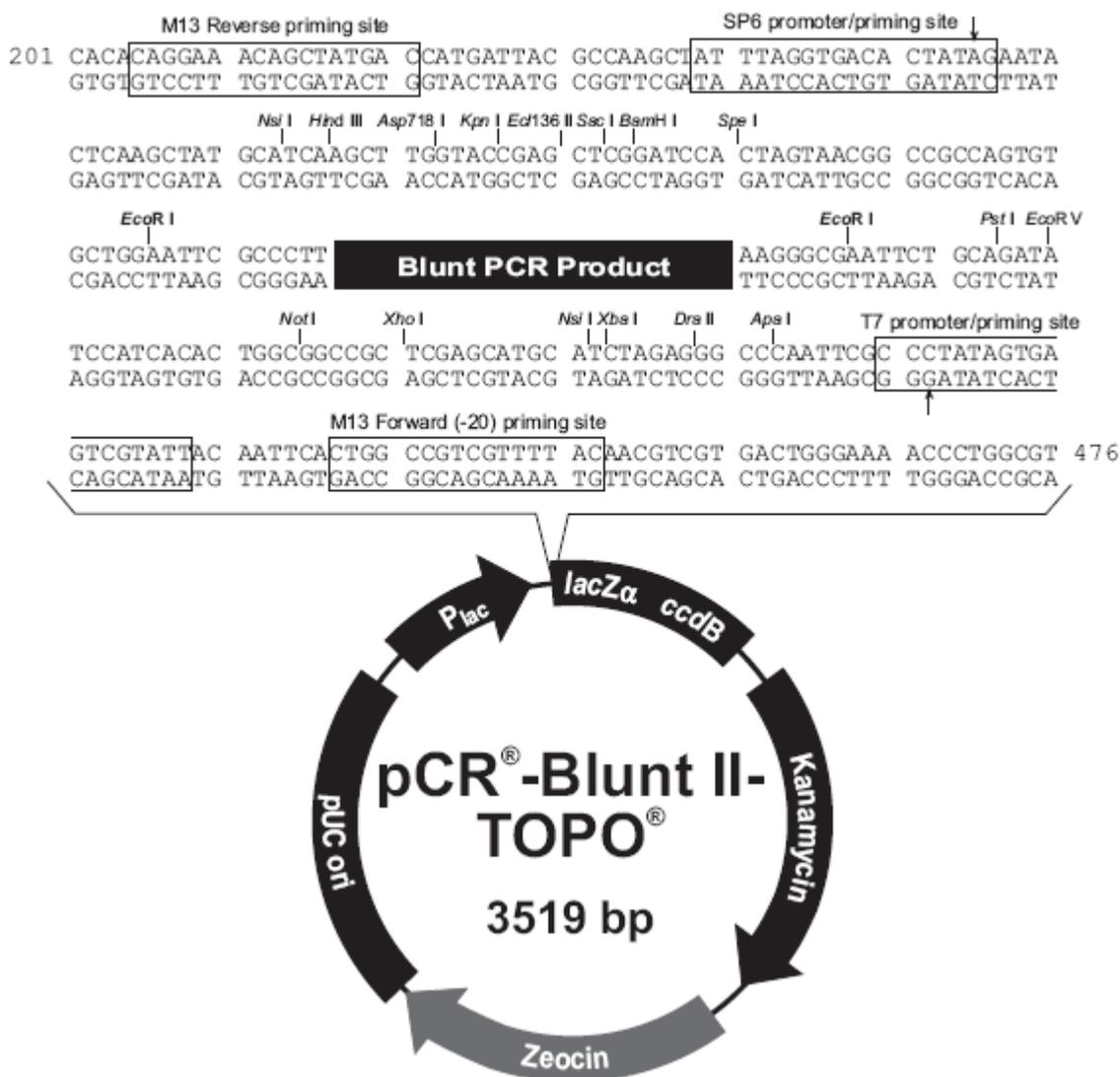
158. **Tabrizi, M. A., C. M. Tseng, and L. K. Roskos.** 2006. Elimination mechanisms of therapeutic monoclonal antibodies. *Drug Discov Today* **11**:81-8.
159. **Tanner, J., Y. Whang, J. Sample, A. Sears, and E. Kieff.** 1988. Soluble gp350/220 and deletion mutant glycoproteins block Epstein-Barr virus adsorption to lymphocytes. *J Virol* **62**:4452-64.
160. **Tanner, J. E., and C. Alfieri.** 1999. Epstein-Barr virus induces Fas (CD95) in T cells and Fas ligand in B cells leading to T-cell apoptosis. *Blood* **94**:3439-47.
161. **Tanner, J. E., C. Alfieri, T. A. Chatila, and F. Diaz-Mitoma.** 1996. Induction of interleukin-6 after stimulation of human B-cell CD21 by Epstein-Barr virus glycoproteins gp350 and gp220. *J Virol* **70**:570-5.
162. **Thorley-Lawson, D. A., and K. Geilinger.** 1980. Monoclonal antibodies against the major glycoprotein (gp350/220) of Epstein-Barr virus neutralize infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**:5307-11.
163. **Thorley-Lawson, D. A., and A. Gross.** 2004. Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N Engl J Med* **350**:1328-37.
164. **Thorley-Lawson, D. A., and C. A. Poodry.** 1982. Identification and isolation of the main component (gp350-gp220) of Epstein-Barr virus responsible for generating neutralizing antibodies in vivo. *J Virol* **43**:730-6.
165. **Todd, P. A., and R. N. Brogden.** 1989. Muromonab CD3. A review of its pharmacology and therapeutic potential. *Drugs* **37**:871-99.
166. **Tomkinson, B., E. Robertson, and E. Kieff.** 1993. Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* **67**:2014-25.
167. **Torkildsen, O., H. Nyland, H. Myrmed, and K. M. Myhr.** 2008. Epstein-Barr virus reactivation and multiple sclerosis. *Eur J Neurol* **15**:106-8.
168. **Tosato, G., K. Jones, M. K. Breinig, H. P. McWilliams, and J. L. McKnight.** 1993. Interleukin-6 production in posttransplant lymphoproliferative disease. *J Clin Invest* **91**:2806-14.
169. **Tosato, G., J. Tanner, K. D. Jones, M. Revel, and S. E. Pike.** 1990. Identification of interleukin-6 as an autocrine growth factor for Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *J Virol* **64**:3033-41.
170. **Tsai, D. E., C. L. Hardy, J. E. Tomaszewski, R. M. Kotloff, K. M. Oloff, B. G. Somer, S. J. Schuster, D. L. Porter, K. T. Montone, and E. A. Stadtmauer.** 2001. Reduction in immunosuppression as initial therapy for posttransplant lymphoproliferative disorder: analysis of prognostic variables and long-term follow-up of 42 adult patients. *Transplantation* **71**:1076-88.
171. **Urquiza, M., R. Lopez, H. Patino, J. E. Rosas, and M. E. Patarroyo.** 2005. Identification of three gp350/220 regions involved in Epstein-Barr virus invasion of host cells. *J Biol Chem* **280**:35598-605.
172. **Vidarsson, G., J. G. van de Winkel, and M. A. van Dijk.** 2001. Multiplex screening for functionally rearranged immunoglobulin variable regions reveals expression of hybridoma-specific aberrant V-genes. *J Immunol Methods* **249**:245-52.
173. **Vugmeyster, Y., J. Beyer, K. Howell, D. Combs, P. Fielder, J. Yang, F. Qureshi, B. Sandlund, L. Kawaguchi, W. Dummer, H. Lowman, and K.**

- McKeever.** 2005. Depletion of B cells by a humanized anti-CD20 antibody PRO70769 in *Macaca fascicularis*. *J Immunother* **28**:212-9.
174. **Walker, R. C., C. V. Paya, W. F. Marshall, J. G. Strickler, R. H. Wiesner, J. A. Velosa, T. M. Habermann, R. C. Daly, and C. G. McGregor.** 1995. Pretransplantation seronegative Epstein-Barr virus status is the primary risk factor for posttransplantation lymphoproliferative disorder in adult heart, lung, and other solid organ transplantations. *J Heart Lung Transplant* **14**:214-21.
175. **Wang, F., C. Gregory, C. Sample, M. Rowe, D. Liebowitz, R. Murray, A. Rickinson, and E. Kieff.** 1990. Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear proteins 2 and 3C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP1 cooperatively induce CD23. *J Virol* **64**:2309-18.
176. **Wang, F., H. Kikutani, S. F. Tsang, T. Kishimoto, and E. Kieff.** 1991. Epstein-Barr virus nuclear protein 2 transactivates a cis-acting CD23 DNA element. *J Virol* **65**:4101-6.
177. **Wang, X., and L. M. Hutt-Fletcher.** 1998. Epstein-Barr virus lacking glycoprotein gp42 can bind to B cells but is not able to infect. *J Virol* **72**:158-63.
178. **Whang, Y., M. Silberklang, A. Morgan, S. Munshi, A. B. Lenny, R. W. Ellis, and E. Kieff.** 1987. Expression of the Epstein-Barr virus gp350/220 gene in rodent and primate cells. *J Virol* **61**:1796-807.
179. **Wilkie, G. M., C. Taylor, M. M. Jones, D. M. Burns, M. Turner, D. Kilpatrick, P. L. Amlot, D. H. Crawford, and T. Haque.** 2004. Establishment and characterization of a bank of cytotoxic T lymphocytes for immunotherapy of Epstein-Barr virus-associated diseases. *J Immunother* **27**:309-16.
180. **Wilkinson, A. H., J. L. Smith, L. G. Hunsicker, J. Tobacman, D. P. Kapelanski, M. Johnson, F. H. Wright, D. M. Behrendt, and R. J. Corry.** 1989. Increased frequency of posttransplant lymphomas in patients treated with cyclosporine, azathioprine, and prednisone. *Transplantation* **47**:293-6.
181. **Wood, A., B. Angus, P. Kestevan, J. Dark, G. Notarianni, S. Miller, M. Howard, S. Proctor, and P. Middleton.** 1997. Alpha interferon gene deletions in post-transplant lymphoma. *Br J Haematol* **98**:1002-3.
182. **Wu, Y., S. Maruo, M. Yajima, T. Kanda, and K. Takada.** 2007. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded RNA 2 (EBER2) but not EBER1 plays a critical role in EBV-induced B-cell growth transformation. *J Virol* **81**:11236-45.
183. **Young, K. A., X. S. Chen, V. M. Holers, and J. P. Hannan.** 2007. Isolating the Epstein-Barr virus gp350/220 binding site on complement receptor type 2 (CR2/CD21). *J Biol Chem* **282**:36614-25.
184. **Yuan, X., M. J. Gubbins, and J. D. Berry.** 2004. A simple and rapid protocol for the sequence determination of functional kappa light chain cDNAs from aberrant-chain-positive murine hybridomas. *J Immunol Methods* **294**:199-207.

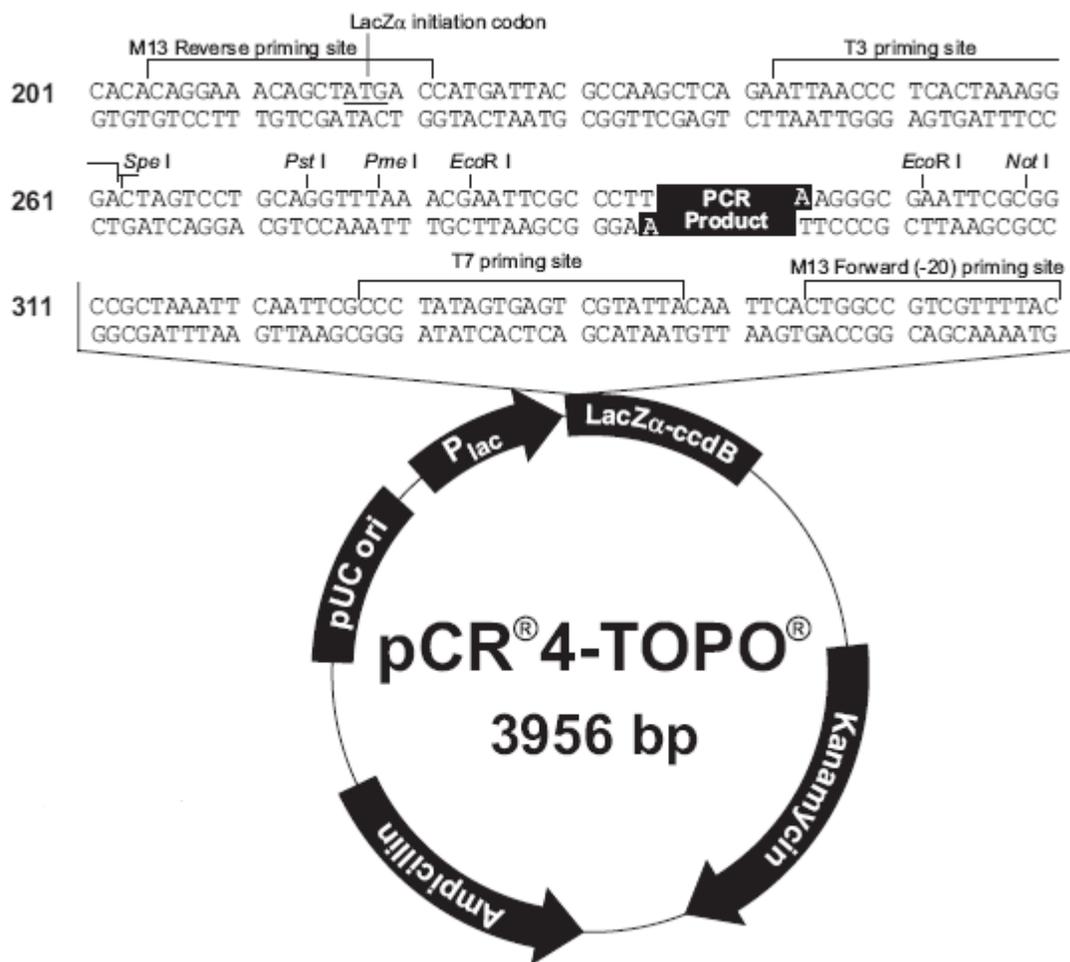
## **ANNEXES**

## Annexe I: Cartes génétiques des plasmides utilisés

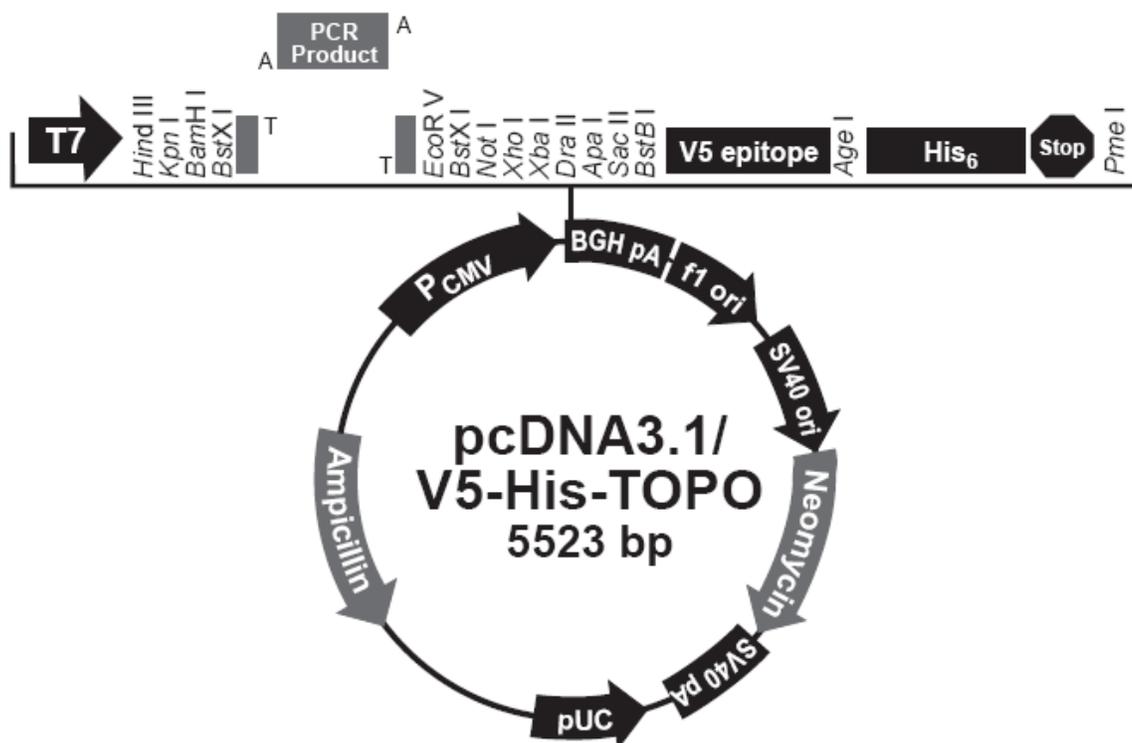
Les cartes génétiques des figures 1 à 3 sont tirées des protocoles accompagnant les trousse de clonage de la compagnie Invitrogen.



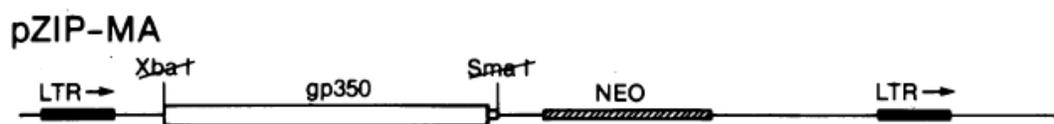
**Figure 21.** Plasmide de clonage pCR-Blunt II-TOPO montrant la séquence entourant le site de clonage et les gènes de résistance aux antibiotiques.



**Figure 22.** Plasmide de clonage pCR4-TOPO montrant la séquence entourant le site de clonage et les gènes de résistance aux antibiotiques.



**Figure 23.** Plasmide de clonage pcDNA3.1/V5-His-TOPO montrant les détails du site de clonage et les gènes de résistance aux antibiotiques.



**Figure 24.** Plasmide pZIP-MA contenant le gène de la gp350 ainsi qu'un gène de résistance à la néomycine (Tiré de Whang *et al.* (178) )

**Annexe II : Identification des CDR et alignements BLAST des différentes  
régions des chaînes chimériques**

CAGCTCGTGATGACCCAGTCTCCCAAATCCATGTCCATGTCAGTAGGAGA  
GAGGGTCACCTTGACCTGCAAGGCCAGT **GAGAATGTGGTTACTTATGTTT**  
CCTGGTATCAACAGAAACCAGAGCAGTCTCCTAAACTGCTGATATAC **GGG**  
**GCATCC**AACCGGTACACTGGGGTCCCCGATCGCTTCACAGGCAGTGGATC  
TGCAACAGATTTCACTCTGACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTTG  
CAGATTATCACTGT **GGACAGGGTTACAGCTATCCGTACACG**TTCGGAGGG

**Figure 25.** Séquence de la région V<sub>L</sub> identifiant les CDR en jaune grâce à l’outil en ligne IMGT/V-QUEST de l’International ImMunoGeneTics information system (<http://imgt.cines.fr>).

CCACCATGGCTGTCTTGGGGCTGCTCTTCTGCCTGGTGACTTTCCTCAAGCT  
GTGTCCTGTCCCAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCG  
CCCTCACAGAGCCTGTCCATCACATGCACCGTCTCA **GGGTTCTCATTA**  
**AGCTATGGT**GTACACTGGGTTCGCCAGCCTCCGGGAAAGGGTCTGGAGTG  
GCTGGTAGTG **ATATGGAGTGATGGAAGCACA**ACCTATAATTCAGCTCTCA  
AATCCAGACTGAGCATCAGCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTA  
AAAATGAACAGTCTCCAAACTGATGACACAGCCATGTACTACTGT **GCCAG**  
**AGAGCCTCCCACGACGTACGTTTGCTTAC**

**Figure 26.** Séquence de la région V<sub>H</sub> identifiant les CDR en jaune grâce à l’outil en ligne IMGT/V-QUEST de l’International ImMunoGeneTics information system (<http://imgt.cines.fr>).

Sequences producing significant alignments:  
(Click headers to sort columns)

Accession	Description
<a href="#">D31904.1</a>	Mus musculus mRNA for nephritogenic antibody, Vk region
<a href="#">L24803.1</a>	Mus musculus anti-amiloride-binding protein Iq light chain mRNA,
<a href="#">M15046.1</a>	Mouse Iq kappa active mRNA from hybridoma 17-1A. chain, mRNA
<a href="#">X99233.1</a>	M.musculus mRNA for immunoglobulin light chain variable domain
<a href="#">M84430.1</a>	Mouse rearranged light chain variable region gene sequence
<a href="#">L41879.1</a>	Mus musculus immunoglobulin kappa chain mRNA, 5' end of cds
<a href="#">L41881.1</a>	Mus musculus immunoglobulin kappa chain mRNA, complete cds
<a href="#">X99231.1</a>	M.musculus mRNA for immunoglobulin light chain variable domain
<a href="#">V00810.1</a>	M.musculus mRNA for mouse immunoglobulin kappa light chain
<a href="#">Y15085.1</a>	Mus musculus mRNA for immunoglobulin light kappa chain variat

Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">532</a>	532	97%	2e-148	99%
<a href="#">532</a>	532	97%	2e-148	99%
<a href="#">532</a>	532	97%	2e-148	99%
<a href="#">531</a>	531	97%	9e-148	99%
<a href="#">531</a>	531	98%	9e-148	98%
<a href="#">527</a>	527	97%	1e-146	99%
<a href="#">527</a>	527	97%	1e-146	99%
<a href="#">521</a>	521	96%	5e-145	99%
<a href="#">520</a>	520	97%	2e-144	98%
<a href="#">516</a>	516	96%	2e-143	98%

**Figure 27.** Dix premiers alignements BLAST de nucléotides de la région  $V_L$  réalisés sur le site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Le tableau est séparé en deux parties pour pouvoir être inséré dans la page.

Sequences producing significant alignments:  
(Click headers to sort columns)

Accession	Description
<a href="#">AK301425.1</a>	Homo sapiens cDNA FLJ59057 complete cds, highly similar to Iq l
<a href="#">BC107733.1</a>	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4704394, **** WARNING: chir
<a href="#">BC073774.1</a>	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:6301146, **** WARNING: chir
<a href="#">BC034146.1</a>	Homo sapiens immunoglobulin kappa variable 1-5, mRNA (cDNA
<a href="#">BC022362.1</a>	Homo sapiens cDNA clone MGC:23888 IMAGE:4704496, complet
<a href="#">BC005332.1</a>	Homo sapiens cDNA clone MGC:12418 IMAGE:3934658, complet
<a href="#">BC095489.1</a>	Homo sapiens immunoglobulin kappa constant, mRNA (cDNA clor
<a href="#">BC073791.1</a>	Homo sapiens immunoglobulin kappa constant, mRNA (cDNA clor
<a href="#">BC095490.1</a>	Homo sapiens immunoglobulin kappa constant, mRNA (cDNA clor
<a href="#">BC073772.1</a>	Homo sapiens immunoglobulin kappa constant, mRNA (cDNA clor

Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">638</a>	638	100%	6e-180	99%
<a href="#">638</a>	638	100%	6e-180	99%
<a href="#">638</a>	638	100%	6e-180	99%
<a href="#">638</a>	638	100%	6e-180	99%
<a href="#">638</a>	638	100%	6e-180	99%
<a href="#">638</a>	638	100%	6e-180	99%
<a href="#">638</a>	638	100%	6e-180	99%
<a href="#">638</a>	638	100%	6e-180	99%
<a href="#">638</a>	638	100%	6e-180	99%
<a href="#">638</a>	638	100%	6e-180	99%

**Figure 28.** Dix premiers alignements BLAST de nucléotides de la région C<sub>L</sub> réalisés sur le site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Le tableau est séparé en deux parties pour pouvoir être inséré dans la page.

Sequences producing significant alignments:  
(Click headers to sort columns)

Accession	Description
<a href="#">U60820.1</a>	Mus musculus anti-dioxin immunoglobulin heavy chain variable
<a href="#">X53483.1</a>	M.musculus mRNA for Lym-1 gamma heavy chain variable region
<a href="#">S65337.1</a>	Iq VH=immunoglobulin heavy chain variable region {rearranged}
<a href="#">EU121635.1</a>	Mus musculus isolate abVH-HF3 nonfunctional immunoglobulin he
<a href="#">D50398.1</a>	Mus musculus mRNA for immunoglobulin variable region, partial :
<a href="#">D14170.1</a>	Mus musculus mRNA, immunoglobulin heavy chain variable regio
<a href="#">D14173.1</a>	Mus musculus mRNA, immunoglobulin heavy chain variable regio
<a href="#">AJ851868.3</a>	Mus musculus immunoglobulin heavy chain locus constant region
<a href="#">L17079.1</a>	Rattus norvegicus NGF-binding Iq rearranged H-chain non-functio
<a href="#">D14171.1</a>	Mus musculus mRNA, immunoglobulin heavy chain variable regio

Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">671</a>	671	98%	0.0	98%
<a href="#">603</a>	603	91%	2e-169	97%
<a href="#">584</a>	584	86%	8e-164	98%
<a href="#">577</a>	577	83%	1e-161	99%
<a href="#">577</a>	577	83%	1e-161	99%
<a href="#">560</a>	560	83%	1e-156	98%
<a href="#">555</a>	555	81%	7e-155	98%
<a href="#">553</a>	8736	92%	2e-154	99%
<a href="#">553</a>	553	80%	2e-154	99%
<a href="#">551</a>	551	82%	9e-154	98%

**Figure 29.** Dix premiers alignements BLAST de nucléotides de la région V<sub>H</sub> réalisés sur le site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Le tableau est séparé en deux parties pour pouvoir être inséré dans la page.

Sequences producing significant alignments:  
(Click headers to sort columns)

Accession	Description
<a href="#">BC089417.1</a>	Homo sapiens immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m r
<a href="#">AY894992.1</a>	Homo sapiens anti-RhD monoclonal T125 gamma1 heavy chain c
<a href="#">BC073773.1</a>	Homo sapiens immunoglobulin heavy variable 4-31, mRNA (cDN
<a href="#">BC053984.1</a>	Homo sapiens immunoglobulin heavy variable 4-31, mRNA (cDN
<a href="#">BC026038.1</a>	Homo sapiens immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m r
<a href="#">AK130813.1</a>	Homo sapiens cDNA FLJ27303 fis, clone TMS04901, highly similar
<a href="#">AK129510.1</a>	Homo sapiens cDNA FLJ25999 fis, clone DMC07355, highly simila
<a href="#">AK301327.1</a>	Homo sapiens cDNA FLJ59055 complete cds, highly similar to Iq
<a href="#">AK289373.1</a>	Homo sapiens cDNA FLJ78387 complete cds
<a href="#">AK128394.1</a>	Homo sapiens cDNA FLJ46537 fis, clone THYMU3037772, highly s

Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">1888</a>	1888	100%	0.0	99%
<a href="#">1882</a>	1882	100%	0.0	99%
<a href="#">1877</a>	1877	100%	0.0	99%
<a href="#">1877</a>	1877	100%	0.0	99%
<a href="#">1877</a>	1877	100%	0.0	99%
<a href="#">1877</a>	1877	100%	0.0	99%
<a href="#">1877</a>	1877	100%	0.0	99%
<a href="#">1877</a>	1877	100%	0.0	99%
<a href="#">1871</a>	1871	100%	0.0	99%
<a href="#">1871</a>	1871	100%	0.0	99%
<a href="#">1871</a>	1871	100%	0.0	99%

**Figure 30.** Dix premiers alignements BLAST de nucléotides de la région C<sub>H</sub> réalisés sur le site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Le tableau est séparé en deux parties pour pouvoir être inséré dans la page.

### Annexe III : Autorisation de reproduction

Le courriel montré ci-dessous confirme l'acceptation de Dr. Foote pour la reproduction de la figure 3 du présent manuscrit.

#### **Re: Permission for reproduction**

De : **Jefferson Foote** (jfoote@oz.net)

Envoyé : 31 juillet 2008 14:13:10

À : Valérie Leblond (valerie.leblond@umontreal.ca)

Valérie,

Yes, go right ahead.

Good luck with your chimeric. I'm out of academia now, which is a relief, but I miss the interaction with students, so don't hesitate to ask me for help, if you need it.

Merci!

Jefferson

-----  
On Jul 31, 2008, at 5:17 AM, Valérie Leblond wrote:

Dr. Foote,

I am a Master's student at the University of Montreal in Quebec (Canada) and I am working on the development of a chimeric antibody. I am currently writing my Master's thesis and I would like your permission to reproduce a figure from one of your articles.

The article is Immunogenicity of engineered antibodies, *Methods* 36 (2005) 3-10, and I would like to include the first figure in my introduction.

May I have your permission to do so?

Thank you very much and have a nice day.

Valerie Leblond