

Université de Montréal

**Étude de l'infection lytique du Virus Epstein-Barr dans le développement de tumeurs post-greffe**

Par

Insaf SALEM

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 2010

© Insaf SALEM, 2010

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Étude de l'infection lytique du Virus Epstein-Barr dans le développement de  
tumeurs post-greffe**

présenté par :

Insaf SALEM

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

\_\_\_\_\_  
Dre Françoise Le Deist

Président - rapporteur

\_\_\_\_\_  
Dre Caroline Alfieri

Directeur de recherche

\_\_\_\_\_  
Dr François Coutlée

Membre du jury

## RÉSUMÉ

---

Le virus Epstein-Barr (VEB) est un pathogène opportuniste qui a la capacité d'immortaliser les lymphocytes B et de provoquer une prolifération maligne, appelée syndrome lymphoprolifératif post-transplantation (SLP), chez les individus immunodéprimés. A l'intérieur de ce groupe, les personnes à plus haut risque sont les enfants, puisqu'ils sont à risque de développer une infection primaire par le VEB pendant leur régime d'immunosuppression post-greffe. Dans le but de développer un anticorps préventif, notre laboratoire s'est attardé au rôle du cycle lytique du VEB dans le développement du SLP. À cette fin, le premier objectif du présent projet vise à fournir la preuve expérimentale de l'existence ou non d'une phase répllicative productive pendant l'infection aiguë des lymphocytes B sanguins. Un examen des événements qui se déroulent au tout début de l'infection par le VEB tant au niveau de la réplication virale qu'au niveau de l'expression des gènes lytiques précoces et tardifs a révélé l'existence d'une phase répllicative productive pendant l'infection aiguë. Ceci a permis de justifier l'élaboration, dans notre laboratoire, d'un anticorps chimère (murin-humain) neutralisant, dirigé contre la protéine gp350 située sur l'enveloppe virale. Le deuxième objectif, quant à lui, vise à fournir la preuve expérimentale de la capacité neutralisante de cet anticorps chimère. Des essais de caractérisation *in vitro* ont démontré une capacité de reconnaissance de la protéine cible, notamment la gp350, et une capacité de neutralisation du virus par l'anticorps chimère. L'anticorps chimère anti-gp350 pourra faire l'objet d'essais précliniques *in vivo* en vue d'évaluer sa capacité à reconnaître le virus et à prévenir l'apparition de tumeurs de type SLP chez les souris SCID. Il pourrait être éventuellement utilisé, par la suite, comme traitement préemptif contre les tumeurs dans l'espoir de mieux gérer les patients à risque de développer un SLP.

## MOTS CLÉS

Virus Epstein-Barr, syndrome lymphoprolifératif post-transplantation, cycle lytique, gp350, anticorps monoclonal chimère, neutralisation du virus, traitement préventif.

## **SUMMARY**

---

Epstein-Barr virus (EBV) is an opportunistic pathogen in immunocompromised transplant patients. In these patients EBV infection can lead to malignant B-cell lymphoproliferation, called post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD). This thesis project aimed to investigate the role of lytic EBV infection in the genesis of PTLT. The first experimental objective was to provide in vitro proof that EBV could induce productive replication upon acute in vitro infection of B cells. Data obtained through study of viral DNA replication and transcription during the first 96 hours post-infection indicate that lytic infection does occur. These results provided justification for proceeding to the second experimental objective which involved the characterization of an anti-gp350 human-mouse chimeric antibody for its capacity to recognize and neutralize EBV. Results showed that this antibody did possess neutralization activity. Further study of this anti-gp350 chimeric antibody in SCID mice is necessary in order to evaluate its in vivo efficacy against PTLT.

## **KEYWORDS**

Epstein-Barr Virus, post-transplant lymphoproliferative disease, lytic cycle, gp350, chimeric monoclonal antibody, neutralization, preventive therapy.

## TABLE DES MATIÈRES

---

IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS.....	iii
SUMMARY AND KEYWORDS.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	xiii
REMERCIEMENTS.....	xvi

### ***CHAPITRE PREMIER : INTRODUCTION***

1.1 Le Virus Epstein-Barr (VEB): Pathogenèse et biologie de l'infection.....	2
1.1.1 Aperçu historique sur le VEB et épidémiologie.....	2
1.1.2 Biologie de l'infection par le VEB.....	4
1.2 Le VEB et le Syndrome Lymphoprolifératif Post-greffe (SLP) en greffe pédiatrique.....	9
1.2.1 Manifestations cliniques et facteurs à risques des SLP.....	10
1.2.2 Implication du cycle latent dans la genèse des SLP.....	11
1.2.2.1 Rôle des antigènes nucléaires latents (EBNAs).....	12
1.2.2.2 Rôle des protéines membranaires de latence (LMPs).....	13
1.2.3 Rôle du cycle lytique dans le développement des SLP.....	16
1.3 La charge virale sanguine comme indice diagnostique/pronostique des SLP.....	19
1.4 Immunothérapie cellulaire contre les SLP des lymphocytes B causés par le VEB.....	23
1.5 Immunoprophylaxie versus chimioprophylaxie.....	26
1.5.1 Antiviraux.....	26

1.5.2 Anticorps neutralisants.....	28
1.5.1 La glycoprotéine majeure de l'enveloppe virale: la gp350.....	30
1.5.2 Anticorps monoclonal murin :72A1.....	32
1.5.3 Anticorps chimère murin-humain 72A1 ch.....	33
1.6 Le projet.....	35

## ***CHAPITRE DEUXIÈME : MATÉRIELS ET MÉTHODES***

2.1 Les lignées cellulaires utilisées.....	38
2.2 Les cellules primaires utilisées.....	40
2.3 Isolement et infection des cellules mononucléées.....	40
2.3.1 Production et concentration de la souche virale B95-8.....	40
2.3.1.1 Immunofluorescence.....	41
2.3.1.1.1 Immunofluorescence indirecte.....	41
2.3.1.1.2 Immunofluorescence anti-complément.....	42
2.3.1.2 Concentration du virus B95-8.....	42
2.3.1.3 Titration du virus B95-8.....	43
2.3.2 Infection des cellules mononucléées.....	44
2.4 Méthodes de manipulation des acides nucléiques.....	44
2.4.1 Extraction de l'ADN total.....	44
2.4.2 Amplification et quantification de l'ADN viral par PCR quantitative en temps réel.....	45
2.4.3 Extraction de l'ARN total.....	45
2.4.4 Quantification de l'ARN viral par NASBA.....	46
2.5 Production de l'anticorps.....	48
2.5.1 Concentration et purification de l'anticorps.....	48
2.6 Électrophorèse en gel de polyacrylamide.....	49

2.7 Évaluation de la capacité de l'anticorps chimère à reconnaître la gp350 produite par les cellules B95-8.....	49
2.8 Production de l'anticorps en présence du SFV avec une quantité ultra faible en IgG.....	50
2.9 Évaluation de la pureté de la préparation d'anticorps chimère.....	50
2.9.1 Dosage des protéines par la méthode Bradford.....	50
2.9.2 ELISA.....	51
2.10 Essais de neutralisation.....	51
2.11 Titration de l'anticorps chimère.....	52

### ***CHAPITRE TROISIÈME: RÉSULTATS***

3.1 Évolution de la charge virale pendant l'infection aiguë.....	54
3.2 Évolution de l'expression des gènes lytiques pendant l'infection aiguë.....	56
3.3 Caractérisation in vitro de l'anticorps chimère 72A1.....	60
3.3.1 Expression de l'anticorps 72A1 ch.....	60
3.3.2 Estimation de la quantité de 72A1 ch par ELISA.....	64
3.3.3 Spécificité de reconnaissance de la gp350 par le 72A1 ch.....	65
3.3.4 Caractérisation in vitro de la capacité neutralisante du 72A1 ch.....	67

### ***CHAPITRE QUATRIÈME: DISCUSSION***

4.1 Infection aiguë par le VEB : preuve de l'existence d'un état viral lytique.....	70
4.2 Chronologie de l'expression des gènes lytiques.....	72

4.3 Anticorps 72A1 chimère : défi thérapeutique en voie de concrétisation.....	77
4.4 Conclusions et perspectives.....	81
<b><i>BIBLIOGRAPHIE</i></b> .....	84
<b><i>ANNEXES</i></b> .....	97

**LISTE DES TABLEAUX**

---

<b>Tableau I.</b>	Programmes de latence du VEB et les patrons d'expression les caractérisant.....	<b>5</b>
<b>Tableau II.</b>	Incidence des SLP dans le cas de greffe d'organes solides.....	<b>11</b>
<b>Tableau III.</b>	Patron d'expression des protéines de latence spécifiques au programme de latence III: Caractéristiques et fonctions probables.....	<b>15</b>
<b>Tableau IV.</b>	Spécimens humains pour le contrôle des SLP et différences entre les différents types de transplantation .....	<b>22</b>
<b>Tableau V.</b>	Lignées cellulaires utilisées, origines, propriétés et milieu de culture approprié.....	<b>39</b>

## LISTE DES FIGURES

---

<b>Figure 1</b>	Représentation schématique des étapes précoces de l'infection par le VEB.....	<b>7</b>
<b>Figure 2</b>	Diagramme représentatif de l'évolution de la charge virale et de la réponse des cellules T.....	<b>9</b>
<b>Figure 3</b>	Rôle des différentes protéines de latence impliquées dans le processus de transformation des cellules B.....	<b>14</b>
<b>Figure 4</b>	Comparaison de l'évolution de la charge virale dans le sang périphérique et le plasma mesurée par la PCR quantitative chez un porteur sain et un patient transplanté.....	<b>20</b>
<b>Figure 5</b>	Modèle hypothétique de l'entrée du virus dans les lymphocytes B.....	<b>30</b>
<b>Figure 6</b>	Schéma récapitulatif des étapes d'élaboration de l'anticorps chimère...	<b>34</b>
<b>Figure 7</b>	Représentation schématique de la réaction d'amplification NASBA...	<b>47</b>
<b>Figure 8</b>	Cinétique d'évolution de la charge virale pendant l'infection aiguë.....	<b>56</b>
<b>Figure 9</b>	Cinétique d'évolution de l'expression des gènes lytiques pendant l'infection aiguë.....	<b>59</b>
<b>Figure 10</b>	Gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et non dénaturantes montrant l'expression de l'anticorps chimère.....	<b>61</b>
<b>Figure 11</b>	Gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes montrant la composition en immunoglobuline du SFV.....	<b>62</b>
<b>Figure 12</b>	Gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes montrant l'expression de l'anticorps chimère en présence de SFV ultra-faible en immunoglobulines.....	<b>63</b>
<b>Figure 13</b>	Quantification de l'anticorps chimère par ELISA et évaluation de sa pureté.....	<b>64</b>
<b>Figure 14</b>	Capacité de reconnaissance de la gp350 par le 72A1 ch révélée par immunofluorescence indirecte.....	<b>66</b>
<b>Figure 15</b>	Essais de neutralisation du VEB par le 72A1 chimère.....	<b>68</b>

<b>Figure 16</b>	Cinétique d'évolution de la charge virale pendant l'infection aiguë des cellules mononuclées du sang de cordon (CMSCs) non diluées du donneur 2.....	<b>96</b>
<b>Figure 17</b>	Cinétique d'évolution de la charge virale pendant l'infection aiguë des cellules mononuclées du sang de cordon (CMSCs) non diluées du donneur 3.....	<b>96</b>
<b>Figure 18</b>	Cinétique d'évolution de la charge virale pendant l'infection aiguë des cellules mononuclées du sang de cordon (CMSCs) diluées du donneur 2.....	<b>97</b>
<b>Figure 19</b>	Cinétique d'évolution de la charge virale pendant l'infection aiguë des cellules mononuclées du sang de cordon (CMSCs) diluées du donneur 3.....	<b>97</b>
<b>Figure 20</b>	Cinétique d'évolution de l'expression du gène lytique BMRF-1 pendant l'infection aiguë des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) du donneur 2.....	<b>98</b>
<b>Figure 21</b>	Cinétique d'évolution de l'expression du gène lytique BMRF-1 pendant l'infection aiguë des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) du donneur 3.....	<b>98</b>
<b>Figure 22</b>	Cinétique d'évolution de l'expression du gène lytique BMRF-1 pendant l'infection aiguë des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) du donneur 2 en présence d'anticorps neutralisant.....	<b>99</b>
<b>Figure 23</b>	Cinétique d'évolution de l'expression du gène lytique BMRF-1 pendant l'infection aiguë des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) du donneur 3 en présence d'anticorps neutralisant.....	<b>99</b>
<b>Figure 24</b>	Cinétique d'évolution de l'expression du gène lytique BLLF-1 pendant l'infection aiguë des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) du donneur 2.....	<b>100</b>
<b>Figure 25</b>	Cinétique d'évolution de l'expression du gène lytique BLLF-1 pendant l'infection aiguë des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) du donneur 3.....	<b>100</b>

<b>Figure 26</b>	Cinétique d'évolution de l'expression du gène lytique BLLF-1 pendant l'infection aiguë des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) du donneur 2 en présence d'anticorps neutralisant.....	<b>101</b>
<b>Figure 27</b>	Cinétique d'évolution de l'expression du gène lytique BLLF-1 pendant l'infection aiguë des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) du donneur 3 en présence d'anticorps neutralisant.....	<b>101</b>

## LISTE DES ABBREVIATIONS

---

<b>ADCC:</b>	cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (de l'anglais « <i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i> »)
<b>ADN:</b>	acide désoxyribonucléique
<b>ARN :</b>	acide ribonucléique
<b>BCR :</b>	récepteur des cellules B (de l'anglais « <i>B cell receptor</i> »)
<b>Bcl-2 :</b>	de l'anglais « <i>B cell lymphoma-2</i> »
<b>BL :</b>	lymphome de Burkitt (de l'anglais « <i>Burkitt lymphoma</i> »)
<b>BSA :</b>	Albumine sérique bovine (de l'anglais « <i>bovine serum albumin</i> »)
<b>CHO :</b>	de l'anglais « <i>Chinese Hamster Ovary</i> »
<b>EA:</b>	antigènes précoces (de l'anglais « <i>early antigen</i> »)
<b>EBER :</b>	de l'anglais « <i>Epstein-Barr Virus encoded RNA</i> »
<b>EBNA :</b>	de l'anglais « <i>Epstein-Barr nuclear antigen</i> »
<b>FITC :</b>	isothiocyanate de fluorescéine
<b>gp350 :</b>	glycoprotéine 350/220
<b>GVHD :</b>	de l'anglais « <i>graft versus host disease</i> »
<b>HC :</b>	chaîne lourde (de l'anglais « <i>heavy chain</i> »)
<b>HHV-4 :</b>	virus herpès humain 4
<b>HL :</b>	lymphome de Hodgkin (de l'anglais « <i>Hodgkin's lymphoma</i> »)
<b>IE :</b>	protéines pré-précoces (de l'anglais « <i>Immediate early</i> »)

<b>IgG :</b>	immunoglobuline G
<b>IM :</b>	mononucléose infectieuse (de l'anglais « <i>infectious mononucleosis</i> »)
<b>kDa :</b>	kilodalton
<b>LC :</b>	chaîne légère (de l'anglais « <i>light chain</i> »)
<b>LCL :</b>	lignée cellulaire lymphoblastique
<b>LCL –VEB :</b>	lignée cellulaire lymphoblastique infectée par le VEB
<b>LFA :</b>	de l'anglais « <i>lymphocyte function associated antigen</i> »
<b>LMP :</b>	de l'anglais « <i>latent membrane protein</i> »
<b>ICAM-1 :</b>	de l'anglais « <i>intercellular cell adhesion molecule</i> »
<b>HACA :</b>	de l'anglais « <i>human anti-chimeric antibody</i> »
<b>HAMA :</b>	de l'anglais « <i>human anti-mouse antibody</i> »
<b>NK :</b>	de l'anglais « <i>natural killer</i> »
<b>NPC :</b>	carcinome du nasopharynx (de l'anglais « <i>nasopharyngeal carcinoma</i> »)
<b>p53 :</b>	protéine 53
<b>PAA :</b>	acide phosphono-acétique (de l'anglais « <i>phosphoacetic acid</i> »)
<b>PBMC :</b>	cellules mononucléées du sang périphérique (de l'anglais « <i>peripheral blood mononuclear cells</i> »)
<b>PBS :</b>	solution tampon saline de phosphate
<b>pb :</b>	paire de base
<b>PCR :</b>	réaction de polymérisation en chaîne

<b>q-PCR :</b>	réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel
<b>SCID</b>	de l'anglais « <i>severe combined immunodeficiency</i> »
<b>SFV :</b>	sérum fœtal de veau
<b>SLP :</b>	syndrome lymphoprolifératif post transplantation
<b>TO :</b>	transplantation d'organe
<b>TPA :</b>	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
<b>TSCH</b>	transplantation de cellules souches hématopoïétiques
<b>TRs :</b>	de l'anglais « <i>terminal repeats</i> »
<b>VEB :</b>	virus Epstein-Barr
<b>VEGF :</b>	de l'anglais « <i>vascular endothelial growth factor</i> »

## Remerciements

---

Au terme de cette maîtrise, je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de recherche, le Dre. Caroline Alfieri, pour sa disponibilité, sa présence et ses observations aussi judicieuses qu'éclairées. Je remercie également le Département de microbiologie et immunologie, ainsi que le Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, de m'avoir accueillie dans leurs lieux respectifs et ainsi parfaire mes connaissances.

Je souhaiterais également remercier les membres du laboratoire: le Dr. Jerome Tanner pour ses conseils et son assistance, madame Jing Hu pour son aide avec la NASBA ainsi que les autres membres du laboratoire, notamment Ramatoulaye Bah et Elodie Rance pour leur soutien technique et moral au quotidien.

J'aimerais remercier les membres du Groupe de recherche sur la transplantation et l'immunologie du sang de cordon pour leurs conseils lors de mon séminaire, et pour m'avoir permis accès aux unités de sang de cordon. J'ai pu ainsi réaliser une partie importante du présent projet.

Je souhaiterais également exprimer mon appréciation au Gouvernement Tunisien pour l'attribution d'une bourse d'excellence. La réalisation de ce projet a été accomplie grâce à l'appui financier de la Fondation CHU Ste-Justine et la Fondation des étoiles qui a fourni une bourse de formation à la maîtrise, et à une subvention du Fonds de la recherche en santé du Québec, programme hémo et histovigilance.

Enfin, je tiens particulièrement à remercier mon très cher mari Amine en guise de témoignage de ma profonde reconnaissance et gratitude pour son encouragement constant, son soutien psychologique et sa grande patience. Je souhaiterais remercier grandement mes très chers parents qui m'ont inculqué les valeurs du travail sérieux et qui, malgré qu'ils soient loin de moi, m'offrent un soutien et un support inconditionnels. Je remercie également mes chères sœurs, qui sont mes meilleures amies, pour leur soutien moral et leur présence. Je tiens à remercier spécialement mes chers beaux parents pour leur précieuse aide.

# **CHAPITRE PREMIER**

## **INTRODUCTION**

## 1.1 Le Virus Epstein-Barr: Pathogenèse et biologie de l'infection

### 1.1.1 Aperçu historique sur le VEB et épidémiologie

Le Virus Herpes-4 (HHV-4), communément appelé Virus Epstein-Barr (VEB), appartient au genre lymphocryptovirus (ou gamma-1 herpèsvirus) de la sous-famille des *gamma-herpèsviridae*, infectant exclusivement les humains. C'est un virus à ADN linéaire double brin d'environ 172 kpb dont la capsidie icosaédrique est enveloppée (1). Le génome du VEB possède, typiquement, à l'extrémité de sa forme linéaire des TRs (pour « *Terminal Repeats*») qui constituent le site de la circulation du génome suite à l'infection de la cellule cible, en l'occurrence les lymphocytes B. Le génome viral compte, également, six à douze séquences répétées d'ADN de 3 kpb, dénommées les IR1 (pour « *major internal repeat 1*») qui sont présentes à l'intérieur de la séquence génomique et qui jouent un fonctionnel important étant donné qu'elles contiennent le promoteur du gène viral latent, EBNA (pour « *Esptein-Barr Nuclear Antigen*»). Les IR1 permettent, de ce fait, de diviser le génome en séquence unique courte (Us pour « *Unique Short sequence*») et en séquence unique longue (Ul pour « *Unique long sequence*») (2).

Le VEB est le premier virus humain ayant été associé avec l'oncogenèse des tumeurs tant lymphoïdes qu'épithéliales. En effet, il a été découvert par Epstein, Achong et Barr, en 1964 (3,4), par microscopie électronique réalisée sur des cellules cultivées à partir de tissus provenant de lymphomes de Burkitt (BL) (5). Il a été par la suite détecté dans les tissus de patients souffrant de carcinome du nasopharynx (NPC), de lymphome de Hodgkin (HL), ainsi que de lymphome de cellules T/NK (6). Depuis ce temps, des études

subséquentes ont mené à son association, faible ou forte, à un large spectre de maladies aussi bien bénignes que malignes (7). En effet, on note de nos jours plus d'une dizaine de tumeurs malignes lymphoïdes ou solides associées au VEB, chez les individus immunocompétents et immunodéprimés (8). L'épidémiologie de ces proliférations malignes varie entre les différentes régions géographiques. Toutefois, l'origine de la concentration d'un patron de pathologies caractérisant une région donnée est encore mal connue. Des facteurs génétiques, environnementaux ou encore des facteurs viraux semblent être en lien direct avec cette variation (9). En ce qui concerne les NPC, on note une incidence beaucoup plus importante dans le sud de la Chine, le Sud-est de l'Asie et en Afrique du Nord (10, 11). Quant au BL et au HL, on remarque une prédominance frappante en Afrique équatoriale pour le premier (10, 12, 13) et une concentration en Afrique et en Amérique du Sud pour le second (14, 15). Le virus a été également suggéré comme facteur impliqué dans le développement de maladies auto-immunes à savoir la sclérose en plaques (16), le syndrome de fatigue chronique (17) et le lupus érythémateux systémique (18).

Des études épidémiologiques ont démontré qu'il constitue l'un des virus les plus répandus dans la population mondiale, avec une prévalence moyenne de plus de 90% (19). Dans les pays en voie de développement, l'infection par le VEB survient pendant l'enfance et est généralement peu symptomatique tandis que dans les pays développés, l'infection advient le plus souvent pendant l'adolescence voire même l'âge adulte. Dans ce cas, on parle d'infection cliniquement symptomatique caractérisée par une infection auto-limitée connue sous le nom de mononucléose infectieuse (IM) (20).

### 1.1.2. Biologie de l'infection par le VEB

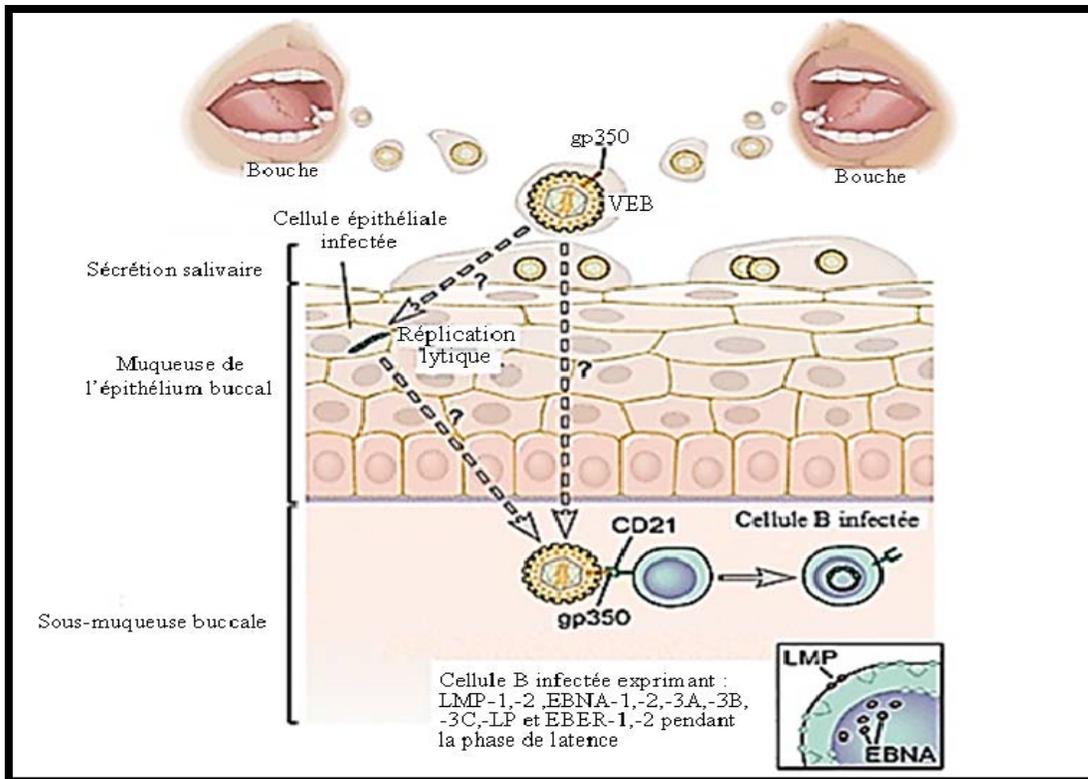
Normalement la transmission du VEB à un hôte naïf s'effectue via la salive provenant d'un individu positif (figure 1). Selon le modèle représenté dans la figure 1, il y aurait premièrement un événement lytique avec production de virus au niveau de l'épithélium mucosal du nasopharynx (21). Vu le contact étroit avec la couche sous-épithéliale riche en lymphocytes, le VEB peut alors atteindre sa principale cible, le lymphocyte B mature (22). Selon certains auteurs celui-ci serait capable, exceptionnellement, de soutenir l'infection lytique (23). L'entrée du virus dans les lymphocytes B est médiée par l'interaction de la glycoprotéine majeure du virus, la gp350, avec le récepteur CD21 (récepteur du complément CR2) (24) présent à la surface de la cellule cible. D'autres molécules de surface agissent comme co-récepteurs pour l'infection des lymphocytes B, notamment le complexe d'histocompatibilité de classe II (CMH II) qui lie la glycoprotéine virale, la gp42 (25). Ainsi, les interactions entre ligand et récepteur mises en œuvre, assurent l'entrée du virus dans la cellule B naïve par internalisation dans des vésicules cytoplasmiques (26). Bien que l'infection lytique dans la cellule B soit possible, cette dernière est plus apte à restreindre l'expression des gènes viraux à un programme de latence. Pour ce faire, le génome linéaire se circularise au niveau des TRs donnant ainsi naissance à la forme épisomale du génome viral caractérisant l'établissement de la latence et constituant un pré-requis pour l'initiation de l'expression des gènes de latence. Quatre programmes de latence sont décrits selon les profils de gènes exprimés (tableau I) (15).

**Tableau I.** Programmes de latence du VEB et les patrons d'expression les caractérisant (Adapté de Hardie., 2010 (15)).

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

À noter que seul le programme de latence III permet l'expression de tous les gènes de latence encodés par le VEB, notamment les gènes spécifiques aux six antigènes nucléaires EBNAs (pour «*Esptein-Barr Nuclear Antigens*»), aux trois protéines membranaires incluant le LMP1, LMP2a et LMP2b (pour «*Latent Membrane Proteins*»), et des deux EBERs (pour «*Epstein-Barr encoded RNAs*»). Les protéines de latence interagissent d'une part entre elles et d'autre part avec les facteurs de transcription cellulaire pour garantir l'activation et la prolifération des cellules B infectées (8). Par ailleurs, ces dernières s'engagent, dans les centres germinaux, dans une dynamique d'expansion clonale, de différenciation et de survie en absence de toute stimulation par les lymphocytes T ou par les signaux de survie. Ceci aboutit à la différenciation des cellules B infectées en cellules mémoires, principal réservoir du virus (27). Selon ce modèle, le VEB en état de latence 0 assurerait ainsi sa persistance dans l'organisme

pendant toute la durée de vie de l'individu sans avoir à exprimer aucun gène latent (à l'exception des EBERs) (28). Lors de la différenciation des cellules B mémoires en plasmocytes, on assiste à la réactivation du virus (27, 29) qui se traduit par une initiation de la phase lytique du cycle viral aboutissant à la production de nouveaux virions. La dite phase implique l'expression séquentielle d'approximativement 80 gènes lytiques codant respectivement pour **(i)** des protéines pré-précoces (*IE pour «Immediately Early»*), agissant comme trans-activateurs de l'expression des gènes précoces, **(ii)** des protéines précoces (*EA pour «Early Antigen»*) incluant les principaux acteurs du complexe de la réplication de l'ADN viral et **(iii)** des protéines lytiques tardives qui ne sont autres que les protéines structurales du virion et qui témoignent d'une infection répliquative productive (30). L'ADN linéaire viral est par la suite clivé au niveau des TRs, encapsidé et le virus enveloppé est libéré suite à la mort des cellules B.

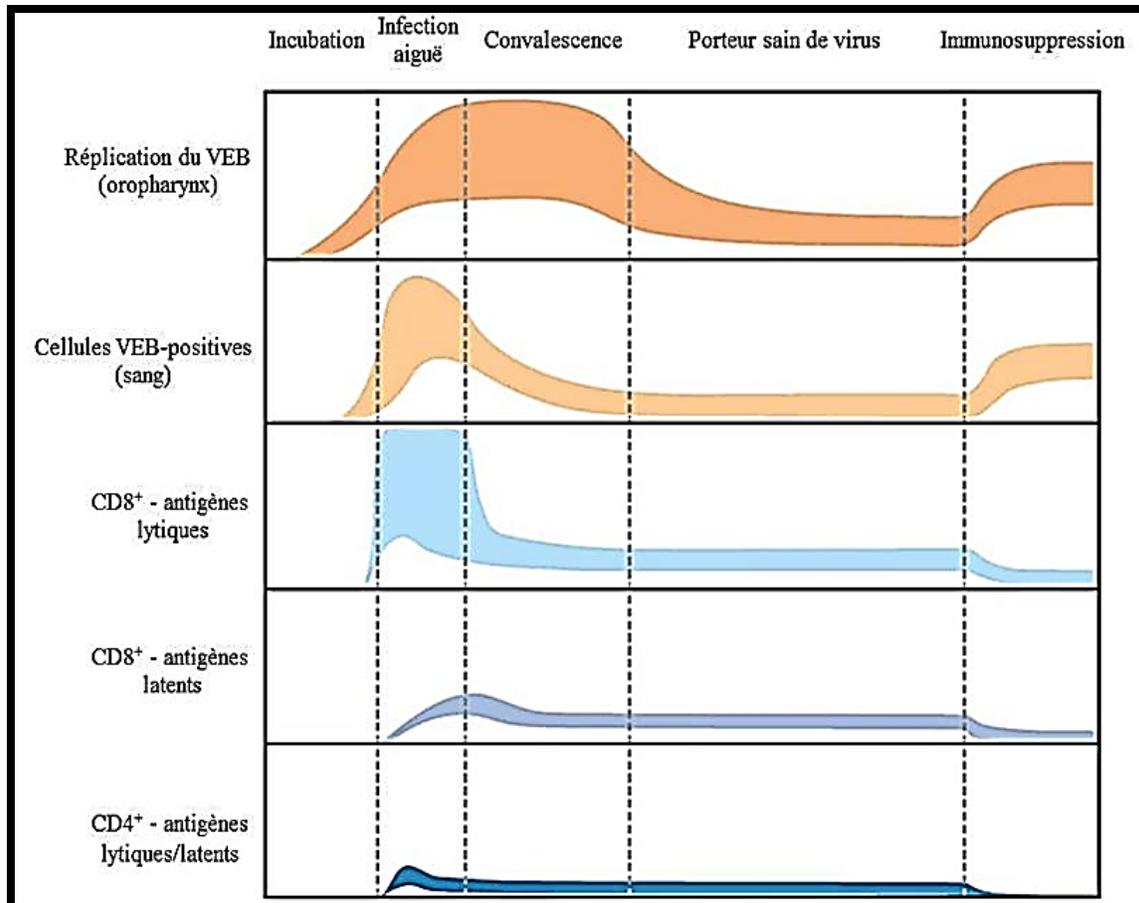


**Figure 1:** Représentation schématique des étapes précoces de l'infection par le VEB. Après un contact étroit, les particules virales présentes dans la salive des individus infectés pénètrent dans la muqueuse épithéliale où il peut y avoir une réplication lytique. La proximité au tissu lymphoïde sous-jacent, riche en lymphocytes B, permet l'infection de ces derniers via l'interaction entre le CD21 exprimé à la surface de la cellule B et la glycoprotéine virale, la gp350. Suite à l'infection des lymphocytes B, et dépendamment des circonstances relatives à l'hôte, le VEB peut adopter un état de latence voulant l'expression d'un ou de plusieurs gènes viraux. Le programme de latence III est caractérisé par l'expression de tout le répertoire des gènes viraux. LMP, protéine membranaire latente; EBNA, antigène nucléaire du virus Epstein-Barr (Adapté de Kutok *et al.*, 2006 (8)).

Chez un individu en santé, le développement d'une réponse immunitaire spécifique au VEB, assure, non pas l'élimination complète du virus de l'organisme, mais plutôt le maintien d'un perpétuel équilibre entre les cellules B infectées et le système immunitaire. Le contrôle de l'infection par les acteurs de la réponse immunitaire innée et adaptative, particulièrement les lymphocytes CD8<sup>+</sup>, contribue au maintien du nombre de cellules B

infectées par le VEB à un taux ne dépassant pas 1-50 cellules infectées/millions (31). Récemment, il a été suggéré que l'autophagie joue un rôle important dans le contrôle de l'infection latente par les cellules T CD4<sup>+</sup>. En effet, elle intervient dans la dégradation et la présentation des fragments antigéniques au CMH II de deux protéines de latence, soit EBNA-1 (32) et LMP-1 (33). Cette dernière induit l'autophagie par un mécanisme dose-dépendant. Par ailleurs, les cellules exprimant un taux élevé de LMP-1 ne peuvent pas achever le cycle cellulaire alors que les cellules qui expriment cette protéine avec modération sont capables de proliférer de manière exponentielle (34).

L'importance de la réponse CD8<sup>+</sup> est témoignée chez les greffés sous l'effet de leur régime d'immunosuppression post-transplantation. L'absence d'une réponse T adéquate entraîne une relâche, voire même une perte du contrôle de l'infection VEB par les cellules T, ce qui favorise l'apparition de syndrome lymphoprolifératif post-transplantation (figure 2).



**Figure 2 :** Diagramme représentatif de l'évolution de la charge virale et de la réponse des cellules T. L'effet de la suppression des cellules T sur le maintien de l'équilibre entre virus et hôte est également représenté (Adaptée de Hislop et *al.*, 2007 (30)).

## 1.2 Le VEB et le Syndrome Lymphoprolifératif Post-greffe (SLP) en greffe pédiatrique

Sous l'effet du régime immunosuppresseur employé pour prévenir le rejet de greffe, on assiste à une perte de l'équilibre entre la prolifération des cellules B infectées et leur élimination par le système immunitaire. Cette croissance incontrôlée peut engendrer l'apparition du syndrome lymphoprolifératif post-greffe (27, 35) affectant dans 85% des cas les lymphocytes B (36). Bien que la tumorigenèse semble être l'aboutissement des actions concertées d'une multitude de facteurs, la présence du VEB dans 90% des lésions

lymphoprolifératives (37, 38) permet de le considérer comme le « chef l'orchestre du processus d'oncogenèse ». Dans ce cas, les lésions observées contiennent des cellules infectées monoclonales ou polyclonales et permettent ainsi de les classer, respectivement, parmi les SLP monomorphiques (39) ou polymorphiques (40).

### **1.2.1 Manifestations cliniques et facteurs à risques des SLP**

Les SLP surviennent le plus souvent pendant la première année suivant la greffe. Ils peuvent être subdivisés en SLP précoces (41) et SLP tardifs (42) en fonction de la durée de leur apparition pendant la période post-transplantation. Ils se manifestent sous forme d'une masse au niveau de l'organe greffé ou au niveau des tissus lymphoïdes. Certains patients présentant un SLP sont asymptomatiques tandis que d'autres présentent des symptômes non-spécifiques tels que de la fièvre ou une anorexie (43). Les facteurs de risque pour le développement de SLP sont les suivants : **(I)** la séronégativité vis-à-vis du VEB, surtout pour les enfants qui reçoivent une greffe d'organe solide (44) et qui sont susceptibles de développer une primo-infection par le VEB au moment de la greffe, **(II)** l'âge du patient, **(III)** la nature du régime immunosuppresseur et son intensité, lesquelles causent une profonde déplétion des cellules T (45, 46), **(IV)** le type d'organe greffé (tableau II), **(V)** la coïnfection avec le cytomégalovirus (CMV), et **(VI)** le type de HLA influence la capacité du système immunitaire à détruire les cellules infectées (47). L'association de deux ou de plusieurs facteurs de risque augmente grandement l'incidence des SLP (48).

**Tableau II.** Incidence des SLP dans le cas de greffe d'organes solides (Adapté de Gulley et al., 2010 (44)).

<i>Organe transplanté</i>	<i>Incidence %</i>	
	<b>Tout âge confondu</b>	<b>Enfant</b>
<i>Rein</i>	0.5-1	1-10
<i>Moelle osseuse ou Cellules souches</i>	0.5-1	13
<i>Foie</i>	1.6-5	4-15
<i>Cœur et poumons</i>	1.9-10	6-20
<i>Intestin</i>	-	12

### 1.2.2 Implication du cycle latent dans la genèse des SLP

Après établissement de l'infection latente *in vitro*, et dans un contexte d'immunosuppression, le VEB peut exercer son pouvoir oncogénique et ainsi transformer les lymphocytes B naïfs en lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCLs). Ces dernières ont constitué un modèle d'étude *in vitro*, d'importance majeure, du processus d'oncogenèse et du potentiel lymphomagénique du virus menant à l'immortalisation des lymphocytes B. En absence d'infection par le VEB, on note, suite à une stimulation antigénique ou mitotique des lymphocytes B naïfs, une expression importante mais transitoire des marqueurs d'activation. Il a été démontré que cette expression se fait de manière constitutive dans les LCLs-VEB. En effet, la détection du CD23, CD30, CD39, CD70 ainsi que des molécules d'adhésion incluant le LFA-1, le LFA-3 et l'ICAM-1 dans

les cellules infectées par le VEB témoignent de la capacité des gènes latents à mimer les voies de signalisation cellulaires menant à la prolifération de ces dernières (49). Le rôle-clé que jouent les gènes latents dans le processus de transformation a également été appuyé de manière élégante par l'utilisation de virus recombinant (28).

### **1.2.2.1 Rôle des antigènes nucléaires latents (EBNAs)**

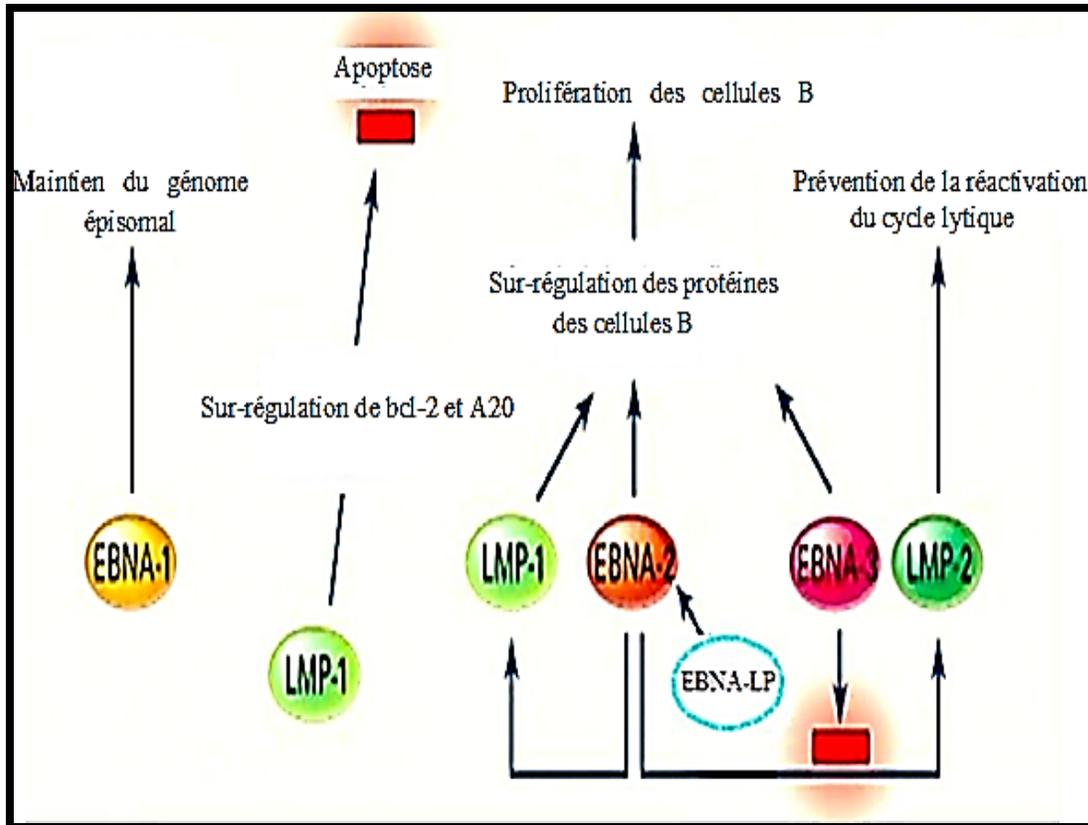
La famille des antigènes nucléaires latents renferme une multitude de protéines impliquées directement ou indirectement dans la transformation des cellules B. Les LCL contiennent plusieurs copies extra-chromosomiques du génome épisomal transférées de manière égale aux cellules filles lors du processus mitotique. Ceci est assuré par la protéine de latence, EBNA-1, qui joue un rôle-clé dans le maintien et la réplication de la forme épisomale du génome viral (28, 50). La principale particularité de cette protéine de latence réside dans la présence de séquences répétitives formées d'une combinaison de glycine et d'alanine qui sont à l'origine de sa faible immunogénicité évitant ainsi son élimination par le protéosome (51, 52, 53). Ceci permet au virus de demeurer à l'état latent dans les cellules d'intérêt sans constituer une cible de choix pour les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. L'importance d'EBNA-1 ne se limite pas au maintien du génome viral. En effet, elle joue un rôle important dans la régulation de sa propre expression ainsi que de celle de LMP-1 (54). En outre, elle permet de promouvoir la survie des cellules infectées en agissant sur les niveaux d'expression du facteur pro-apoptotique p53 (55). Quant à EBNA-2, l'importance de son intervention dans le processus d'immortalisation réside principalement dans l'activation de certains gènes cellulaires tels que le CD23 et de gènes viraux à savoir le LMP-1 et le LMP-2A, principaux acteurs de la transformation (28, 56).

Parmi les EBNA3, seules les protéines 3A et 3C sont essentielles pour le processus de transformation (57, 58). Ces dernières perturbent le contrôle du cycle cellulaire probablement via l'interaction avec des facteurs cellulaires qui contrôlent sa progression et modulent la transcription des gènes cellulaires (59). Enfin, il a été démontré que l'EBNA-LP interagit avec EBNA-2 et augmente, par ailleurs, l'activité de cette dernière sur le promoteur de LMP1 (60) (figure 3).

### **1.2.2.2 Rôle des protéines membranaires de latence (LMPs)**

La famille des protéines de latence membranaires peut être subdivisée en deux classes en fonction de leur potentiel oncogénique. Le premier groupe renferme la LMP-1, acteur-clé et oncogène principal du processus de transformation. Quand elle est exprimée dans la cellule, elle agit sur une large panoplie de voies de signalisation cellulaire allant de l'induction de l'expression des molécules de surface jusqu'à la surexpression de facteurs anti-apoptotiques (le bcl-2 et le A20) voire la métastase (61) (figure 3). LMP1 agit, également, 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 (62-64). LMP-1 permet ainsi de promouvoir la survie cellulaire. Quant au deuxième groupe de la présente famille, il renferme LMP-2, incluant LMP2A et LMP2B, qui ne semblent pas avoir, *in vitro*, un effet sur la transformation des cellules B. Toutefois, des expériences réalisées chez la souris ont démontré que l'expression de LMP2A permet la prolifération et la survie des cellules B en absence de stimulation via le récepteur des cellules B (BCR) (65). En outre, LMP2A intervient probablement dans le contrôle de l'expression d'une protéine importante dans la voie de signalisation NF- $\kappa$ B activée par LMP-1 (66). Il a été

démonstré qu'elle prévient également l'activation du cycle lytique suite à une stimulation antigénique (67).



**Figure 3 :** Rôle des différentes protéines de latence impliquées dans le processus de transformation des cellules B. La protéine EBNA2 favorise l'expression de LMP1, suite à son interaction avec EBNA-LP, et de LMP2. Les protéines EBNA3 inhibent la stimulation de l'expression de LMP2. La LMP1 inhibe l'apoptose en sur-régulant le bcl-2 et le A20 (Adaptée de Cohen J. et *al.*, 2000 (68)).

A la lumière de ce qui a été présenté ci-dessus, on conclut que LMP1 et EBNA2 sont absolument requis pour le processus de transformation cellulaire. En outre, les protéines EBNA3A, EBNA3C, EBNA-LP renforcent l'action des principaux oncogènes. Enfin, les transcrits latents, à savoir les EBERs, semblent jouer un rôle dans la persistance du virus en inhibant les fonctions des protéines kinases PKR (pour «*Protein Kinase R*») qui

interviennent dans la médiation de l'effet antiviral exercé par l'interféron (49) (tableau III).

**Tableau III.** Patron d'expression des protéines de latence spécifiques au programme de latence III : Caractéristiques et fonctions probables.

<b>Gène</b>	<b>Fonctions probables</b>
<i>EBNA1</i>	Maintien et persistance extra-chromosomique du génome viral sous forme épisomale dans le noyau cellulaire.
<i>EBNA2</i>	Transactivation de plusieurs gènes cellulaires (CD21, cMYC et CD23) et viraux (LMP1 et LMP2A); Rôle important dans la transformation des cellules B naïves en LCL-VEB.
<i>EBNA3C</i>	Stimulation de l'expression de LMP1 en présence d'EBNA2; Rôle important dans le processus de transformation.
<i>EBNA-LP</i>	Sur-régulation des gènes cellulaires nécessaire à la croissance des LCLs; Accroissement de la stimulation de LMP1 par EBNA2.
<i>LMP1</i>	Activation et différenciation des cellules B en mimant le CD40; Rôle important dans la survie cellulaire et la formation de lymphome; Principal acteur oncogénique.
<i>LMP2A</i>	Prévention de l'activation du cycle lytique; Rôle important dans la survie cellulaire.
<i>EBER1 et 2</i>	Rôle important dans la résistance à l'apoptose médiée par la voie <i>Fas</i> .

### 1.2.3 Rôle du cycle lytique dans le développement des SLP

Jusqu'à présent, beaucoup de travaux ont été réalisés sur le cycle latent du VEB et plus particulièrement sur les gènes latents ainsi que leur implication possible dans l'apparition des SLP des lymphocytes B. Tel que discuté dans la section précédente, la fonction et le rôle joué par la plupart des protéines de latence dans le processus d'oncogenèse ont fait l'objet d'investigations très vigoureuses. Toutefois très peu d'attention a été accordée à l'infection lytique productive du virus.

Des biopsies réalisées sur des tissus prélevés à partir de patients immunodéprimés présentant des SLP ont révélé que 80% des tumeurs analysées démontraient la présence du virus en phase réplivative et que 30-40% contenaient des antigènes lytiques tardifs (69, 70, 71). De plus, l'accroissement de la charge virale dans le plasma de patients ayant reçu une ou plusieurs greffes et présentant des lymphoproliférations malignes permet d'appuyer l'existence d'une phase réplivative productive post-greffe (72, 73, 74), laquelle a été utilisée comme biomarqueur de l'apparition de la maladie ainsi que de sa régression (44). En outre, une étude de la spécificité des lymphocytes T cytotoxiques (LTC) autologues spécifiques au VEB suite à leur injection à un patient greffé atteint d'un SLP a démontré que la réponse cytotoxique initiale était dirigée contre des antigènes lytiques (75).

Des expériences réalisées chez les souris SCID (pour « *severe combined immunodeficiency* ») (76), modèle animal permettant de reproduire les étapes aboutissant à l'établissement des SLP, ont mené à des évidences expérimentales expliquant l'intervention du cycle lytique dans le processus d'oncogenèse. En effet, l'injection de

LCL chez les souris SCID a révélé qu'environ 80% des cellules VEB positives entraînait l'apparition de tumeurs présentant les deux formes de l'ADN viral : la forme linéaire caractéristique de la réplication lytique et la forme épisomale caractéristique de l'amplification latente (77). De plus, Hong et *al.* ont démontré que les LCLs-VEB générées avec un virus présentant une délétion des gènes codant pour les transactivateurs du cycle lytique, soit BZLF-1 et BRLF-1, sont défectueuses dans leur capacité de produire les lymphoproliférations lorsqu'injectées dans la souris SCID. En outre, il s'est avéré que le phénomène était réversible dans la mesure où une expression en trans du gène muté permettrait de promouvoir davantage la croissance des tumeurs suite au rétablissement du cycle lytique (78). Rochford et *al.* ont démontré que l'injection, dans des souris SCID, de LCL présentant le virus en phase latente a engendré des tumeurs présentant le virus majoritairement sous sa forme lytique (79).

Il a été suggéré que le cycle lytique du virus peut contribuer à la genèse des SLP par principalement 3 mécanismes potentiels (78).

(i) L'accroissement de la transmission horizontale cellule à cellule du virus (48) entraînerait une augmentation du nombre de cellules B infectées par le VEB qui vont proliférer indéfiniment en exprimant le programme de latence III, caractérisant les SLP. Ceci peut être associé à une perte du contrôle de l'infection par les lymphocytes T cytotoxiques (LTCs), majoritairement spécifiques des antigènes lytiques (80). De plus, lors de la réactivation du virus suite à la différenciation des cellules mémoires en plasmocytes, on assiste à une augmentation substantielle du nombre de particules virales qui infecteront de nouvelles cellules adjacentes, à savoir les cellules B mémoires et les cellules B germinales (29) dont la destruction est LTC-dépendante.

**(ii)** La sécrétion de facteurs de croissance agissant par voie paracrine permettrait de promouvoir la croissance et la survie des tumeurs (48). Une fois à l'intérieur de la cellule B, le VEB débute la sécrétion de cytokines qui offrent un avantage de croissance à la cellule infectée, modulent la réponse immunitaire et mènent éventuellement à la tumorigenèse dans le cas d'une immunosuppression (81). Certaines protéines du cycle lytique induisent justement la production de ces cytokines et ont été identifiées comme facteurs de risque pour le développement des SLP en offrant un microenvironnement unique pour le processus d'oncogenèse (44, 82, 83). Il a été démontré que l'initiation du cycle lytique est accompagnée d'un déclenchement d'une cascade médiée par le transactivateur viral, BZLF-1, et aboutissant à l'expression d'une large panoplie de cytokines incluant l'IL-8, l'IL-10 cellulaire et virale (84, 85, 86), l'IL-6 (87, 78) ainsi que l'IL-13 (88). Chez les souris SCID, l'infection des cellules B par un virus exempt du gène Zta (codant pour BZLF-1) entraîne la génération de LCL dotées d'une capacité moindre du point de vue production des cytokines et génération de lymphoproliférations B malignes (78). Le rôle joué par les gènes lytiques se manifeste également par la production de facteur pro-angiogénique, le VEGF (pour « *Vascular Endothelial Growth Factor*»), jouant un rôle important dans la formation de vaisseaux sanguins et par conséquent la croissance de la tumeur (89).

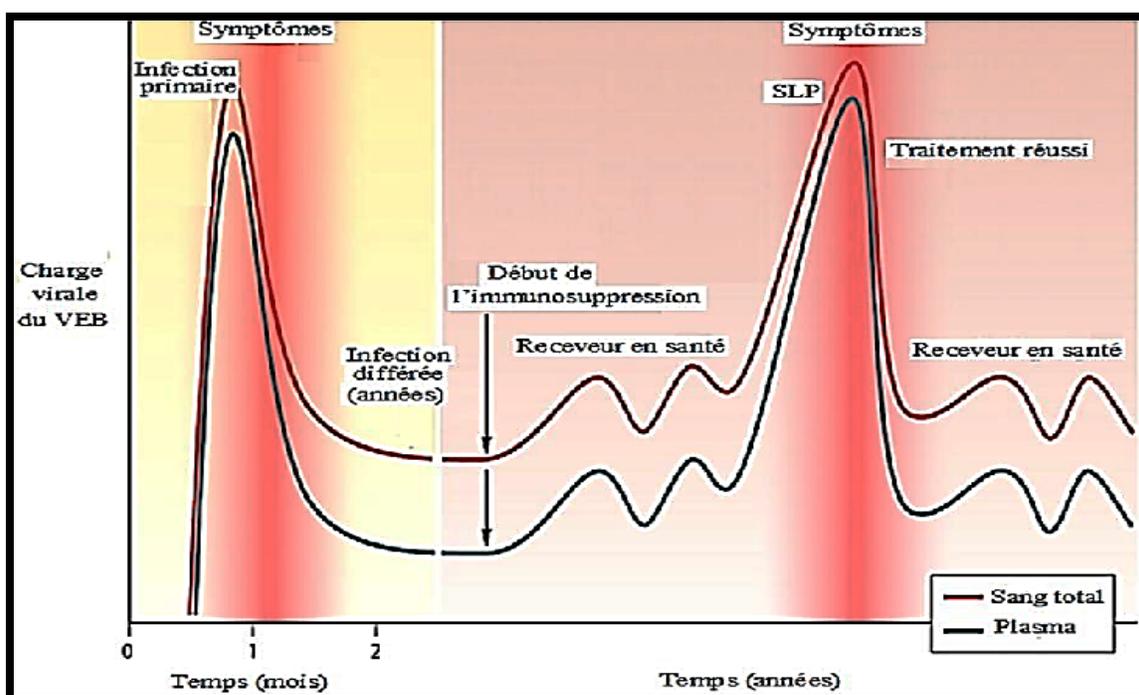
**(iii)** L'effet anti-apoptotique médié par le virus jouerait un rôle important dans la croissance de SLP (48). Deux protéines du cycle lytique permettent d'accomplir cette fonction. La protéine BZLF-1 exerce un contrôle négatif sur les fonctions de la p53 (90), et la protéine BHRF-1 agit comme un homologue du bcl-2 (91). Chez la souris SCID, les LCLs produites à partir de virus n'exprimant pas la protéine BZLF-1 sont plus sensibles à

la cytotoxicité induite par la voie apoptotique *Fas* comparée à la souche sauvage. Ce phénotype a été associé à la déficience au niveau de l'expression de BHRF-1 (44).

### **1.3 La charge virale sanguine comme indice diagnostique/pronostique des SLP**

Étant donné que le VEB établit une persistance pendant toute la vie d'un individu, la simple détection de la présence du génome viral dans l'organisme se trouve être insuffisante pour la prédiction de l'apparition des SLP. De même la caractérisation du profil sérologique spécifique aux antigènes viraux lytiques ou latents ne permet en aucun cas d'affirmer la prédisposition d'un patient à développer un SLP. Par conséquent, il serait essentiel de mettre au point et d'optimiser une méthode de diagnostic de routine standardisée, commune à tous les centres, qui puisse prédire le risque de développer un SLP en fonction de la charge virale du patient et autres informations cliniques (92, 93), (94, 95), prévenir sa genèse (96, 97) et, le cas échéant, faciliter son contrôle (98). Le choix d'une méthode de diagnostic optimale (précise et rapide) en vue d'une utilisation clinique, passe tout d'abord par une bonne compréhension de la biologie de l'infection associée au VEB. Jusqu'à présent, les techniques mises au point pour l'évaluation de la charge virale n'ont pas été standardisées et varient entre les centres (99). Le fait que le développement de SLP a été longtemps et uniquement associé au cycle latent du VEB, a été à l'origine des différences au niveau de l'échantillon humain utilisé pour la charge virale. En effet, certains laboratoires ont opté pour l'utilisation des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMCs) étant donné que chez les individus immunodéprimés, on assiste à une prolifération des cellules B transformées par le VEB dans les tissus lymphoïdes suivie d'une migration vers le sang périphérique (93, 100). Bien qu'il soit présent en quantité moindre que celle détectée dans les lymphocytes B, l'ADN viral

non-associé aux cellules a constitué la principale cible de nombreux laboratoires qui ont utilisé le sérum, voire même le plasma (101, 102, 103). L'ADN viral contenu dans ces échantillons peut être encapsidé, témoignant de la production de nouveaux virions, ou, le plus fréquemment, libre émanant probablement des cellules mortes (44). De plus, il a été suggéré d'utiliser le sang total sous prétexte qu'il contienne toutes les fractions d'intérêt (104, 105, 106) et qu'il permette un gain de temps par rapport à l'utilisation du plasma étant donné l'absence d'une étape de séparation du sang (figure 4).



**Figure 4 :** Comparaison de l'évolution de la charge virale dans le sang périphérique et le plasma mesurée par la PCR quantitative chez un porteur sain et un patient transplanté. Les porteurs sains contiennent une quantité d'ADN viral (VEB) mesurable uniquement dans le sang. Chez un patient transplanté soumis à un régime immunosuppresseur pour prévenir le rejet de greffe, l'infection virale active résulte en une augmentation de la charge virale et dans le sang et dans le plasma. L'augmentation de la charge virale précède la manifestation clinique des SLP et permet une meilleure gestion des patients à haut risque (Adapté de Gulley et *al.*, 2010 (44)).

La variation du type de spécimen humain utilisé a été également à l'origine d'une différence au niveau des unités reflétant la charge virale. En effet, elle peut être exprimée en nombre de copies/ $\mu\text{g}$  d'ADN, nombre de copies/ml de sang ou en nombre de copies/ $10^6$  PBMCs (107). Jusqu'à présent, aucun consensus portant le chiffre absolu qui serait pronostic d'un SLP n'a été obtenu. A titre d'exemple, Wagner et *al.* (108) ont démontré qu'une infection active chez les patients présentant des SLP se traduit par une charge virale médiane de 3,225 copies/100  $\mu\text{l}$  de plasma comparée à moins de 740 copies/100  $\mu\text{l}$  de plasma pour les patients sans SLP. Parallèlement, Schubert et *al.* (109) ont démontré que sur 41 patients ayant reçu une greffe de cœur, six ont développé un SLP et présentaient une charge virale dans le sang de plus que 2000 copies VEB/ $\mu\text{g}$  d'ADN. Certains patients ne présentant pas de SLP avaient une charge virale aussi importante.

Une large panoplie de méthodes de diagnostic a été utilisée. Ces méthodes incluaient l'hybridation *in situ*, faisant appel à une sonde EBER-1 pour l'évaluation de la charge virale dans les spécimens humains (110). Toutefois, de part sa difficulté du point de vue manipulation, cette technique pourrait être à l'origine d'une sous-estimation de la charge étant donné qu'elle ne détecte pas les virus libres. Cette imprécision a été contournée par l'utilisation de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) semi-quantitative dont les principaux atouts consistent dans la grande sensibilité et la rapidité de l'évaluation de la charge virale (48, 92). Toutefois, le plateau atteint en aval de la phase logarithmique de la réaction laisse place au doute quant à la précision de cette méthode, pour les charges virales élevées, qui a été remplacée par la PCR quantitative en temps réel (qPCR) (48). Faisant appel à des standards préparés conformément à des méthodes spécifiques à

chaque laboratoire, la qPCR permet d'établir des seuils de risque qui, bien que précis, ne peuvent pas être standardisés étant donné les valeurs de cut-off spécifiques à chaque centre. Enfin, lors du diagnostic des SLP, il est indispensable de considérer le type de transplantation soit : une transplantation de cellules souches hématopoïétiques ou d'organe solide. En effet, l'origine de l'infection, l'incidence et les facteurs de risque varient entre ces différents groupes et au sein d'un même groupe (type de l'organe transplanté) (48). Ceci fait que l'évaluation de la charge virale pour le premier groupe est importante pour la prédiction des SLP tandis qu'elle ne l'est pas forcément pour le second étant donné que certains greffés présentent des charges virales élevées sans développer la pathologie (48) (tableau IV).

**Tableau IV.** Spécimens humains pour le contrôle des SLP et différences entre les types de transplantation (Adapté de Kimura *et al.*, 2008 (48)).

<b>Spécimens humains pour la mesure de la charge virale</b>			
<i>SLP</i>	<i>Plasma/sérum</i>	<i>PBMCs</i>	<i>Sang total</i>
	Controversé	Désirable	Préférable
<b>Évaluation de la charge virale</b>			
	<i>TSCH*</i>	<i>TOS**</i>	
<i>Période</i>	Pendant les 3 premiers mois après la transplantation	Pendant la première année post-transplantation; Pendant toute la durée de vie	
<i>Valeur prédictive</i>	Bonne	Faible	

\* TSCH : Transplantation de cellules souches hématopoïétiques.

\*\* TOS : Transplantation d'organes solides.

A la lumière de ce qui a été présenté ci-dessus, on peut conclure que l'augmentation de la valeur prédictive positive de la charge virale du VEB passe par le choix d'un deuxième marqueur qui sera utilisé simultanément avec le premier chez les patients greffés d'organe solide. En effet, le développement d'une réponse humorale spécifique au VEB pourrait offrir une protection contre le développement des SLP. Carpentier *et al.* ont observé que six patients greffés ayant un SLP n'avaient pas développé d'anticorps contre les antigènes précoces (EA), alors que les vingt autres, avec une charge virale élevée mais faisant preuve de titres robustes anti-EA IgG, n'ont pas présenté de SLP (111). Les auteurs ont conclu qu'un titre élevé d'anticorps contre les EA constituait un indice de la capacité de défense immunologique anti-VEB chez ces patients (111).

#### **1.4 Immunothérapie cellulaire contre les SLP des lymphocytes B causés par le VEB**

Une variété de traitements a été développée pour assurer la prévention ou le contrôle des SLP chez les patients pour qui les options thérapeutiques conventionnelles, à savoir la chimiothérapie, la réduction du régime immunosuppresseur et la chirurgie, ne permettent pas la résolution de la maladie. L'immunothérapie par les LTCs constitue une alternative de traitement des SLP très intéressante (112). Elle permet une éradication ciblée des cellules cancéreuses en absence de tout autre dommage pouvant affecter les tissus normaux adjacents. L'expression du programme de latence III par les cellules tumorales les rend fortement immunogéniques et par conséquent la cible principale des LTCs. Ces derniers, activés par les antigènes viraux immunodominants, migrent jusqu'au site de la tumeur puis détruisent les cellules cancéreuses grâce à leurs fonctions cytotoxiques (112). Bien que cette thérapie soit prometteuse, elle ne peut pas être appliquée avec succès dans les deux types de transplantations.

Dans le cas d'une transplantation de cellules souches hématopoïétiques, le transfert adoptif des cellules T du donneur qui reconnaissent spécifiquement les cellules B infectées par le VEB provenant de la même source, permet de rétablir l'équilibre entre l'immunité et les cellules B infectées et par conséquent parvient à contrôler le SLP. Toutefois, n'ayant pas subi de manipulation *ex vivo* préalablement à l'infusion, les cellules T peuvent être à l'origine d'alloréactivité, voire même de maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) (113). Pour contourner ces problèmes, la thérapie cellulaire consiste maintenant en une infusion des LTCs stimulés et sélectionnés *ex vivo* (114, 115, 112). Le suivi de l'expansion ainsi que la persistance *in vivo* des cellules transférées a été réalisé suite à un marquage génétique par un rétrovirus contenant un gène de résistance à la néomycine. Les résultats ont démontré une sécurité et une durabilité de la protection de plus de sept ans chez les patients à risque (113). Ceci a été associé au caractère polyclonal des cellules qui combinent les fonctions auxiliaires et les fonctions cytotoxiques pour garantir la persistance. Récemment, une étude réalisée par Heslop et *al.* sur 114 patients provenant de trois centres de transplantation différents a démontré une efficacité de 100% quand les LTCs sont utilisés comme prophylaxie et de 80% quand ils sont utilisés comme thérapie (112).

Le succès qu'a révélé cette approche pour le traitement des SLP suite à une transplantation de moelle a incité bien des centres à envisager son utilisation dans le cas d'une transplantation d'organe. Toutefois, l'application du même protocole d'expansion et de sélection *ex vivo* s'est avérée non appropriée étant donné que dans ce cas les cellules infectées par le virus proviennent du receveur alors que les LTCs proviennent du donneur. L'incompatibilité des HLA entre donneur et receveur rend nécessaire

l'utilisation de LTCs autologues au receveur (116, 117, 118). Cependant, cette approche est coûteuse et requiert approximativement trois mois pour générer un nombre suffisant de cellules spécifiques à chaque patient (119). De plus, il a été démontré que les LTCs autologues permettent une prévention ainsi qu'une résolution efficace mais transitoire de la maladie (120). La récurrence de cette dernière a été associée au fait que ces patients reçoivent continuellement un régime immunosuppresseur qui rend ces cellules non fonctionnelles à long terme (112). En outre, cette option thérapeutique ne s'applique pas aux patients séronégatifs vis-à-vis du VEB qui représentent le groupe le plus à risque (121). Des protocoles d'activation et d'expansion des LTCs autologues spécifiques au VEB ont été alors développés et testés chez des patients à risque (75, 117).

Étant donné que les patients à haut risque sont VEB-séronégatifs au moment de la transplantation, il est difficile de prévoir le moment opportun pour la génération et l'expansion *ex-vivo* des LTCs. L'idéal serait de disposer d'une banque de cellules T disponibles rapidement pour le traitement des SLP. En réponse à ce besoin, une équipe anglaise a généré une banque de 70 lignées cellulaires de LTC allogéniques provenant d'individus séropositifs pour le VEB (122) qui ont été récemment utilisés dans une étude clinique de phase II, après sélection selon la compatibilité HLA la plus élevée, chez des patients ayant développé des SLP (123). Après une période de six mois, 42% des patients étaient en rémission complète et 9% étaient en rémission partielle (123).

Les alternatives d'immunothérapie cellulaire exposées ci-dessus visent principalement les tumeurs formées de cellules exprimant le programme de latence III. Bien que les résultats soient prometteurs et encourageants, ces stratégies visent le contrôle de la tumeur après son apparition. Ce mode d'action ne caractérise pas uniquement les alternatives

d'immunothérapie cellulaire présentées. En effet, le Rituximab, un anticorps monoclonal qui se lie au récepteur CD20 à la surface des cellules B et induit leur mort, en est un exemple (124). Bien qu'il ait été utilisé avec succès depuis plusieurs années (125), le Rituximab n'offre pas une alternative de traitement optimale étant donnée que son action n'est perçue qu'une fois l'infection est établie. Il serait judicieux de développer un agent préventif efficace et sécuritaire ayant la capacité de bloquer l'infection primaire par le VEB, de prévenir son établissement ainsi que l'immortalisation des lymphocytes B chez les individus immunodéprimés. Jusqu'à présent, les traitements dirigés contre les SLP en étude clinique n'ont pas permis d'atteindre le niveau d'efficacité et de sécurité escomptés. Il est donc impératif de développer un traitement prophylactique pouvant être utilisé chez les patients transplantés à haut risque de développer des lymphoproliférations B malignes.

## **1.5 Immunoprophylaxie versus chimioprophylaxie**

### **1.5.1. Les antiviraux**

Étant donné l'association causale qui existe entre l'infection par le VEB et le développement de SLP, l'utilisation des agents antiviraux comme une option thérapeutique permettant de prévenir ou, le cas échéant, de traiter les SLP a été fortement suggérée. Ayant comme principale cible la thymidine kinase virale exprimée pendant le cycle lytique, l'acyclovir, le ganciclovir exercent une activité antivirale inhibitrice *in vitro* uniquement contre la réplication du VEB (126). Ceci dit, le rôle de ces agents antiviraux est restreint à la phase répllicative productive du cycle viral et aucun effet inhibiteur n'a été observé pour les cellules en phase de latence. Théoriquement, en se

basant sur notre première hypothèse qui stipule que le cycle lytique jouerait un rôle dans la genèse des SLP en augmentant la transmission horizontale du virus, l'acyclovir et le ganciclovir devraient prévenir l'établissement du processus oncogène. Toutefois, les avis demeurent controversés quant à leur efficacité dans la prévention des SLP. En effet, certains centres suggèrent que l'introduction des agents antiviraux dans le protocole d'immunosuppression permet une diminution de l'incidence des SLP (127, 128). Une étude réalisée par Darenkov et *al.* (129) a associé la réduction des SLP à une administration précoce des antiviraux et ce simultanément avec les anticorps anti-thymocyte globuline. Ceci a été appuyé par une étude randomisée réalisée par Green et *al.* (130) dans le but de comparer l'efficacité de l'administration du ganciclovir à court terme versus à long terme, dans la prévention des SLP dans un groupe de receveurs de greffe pédiatrique. Les résultats n'ont démontré aucun intérêt à utiliser le ganciclovir comme thérapie antivirale à long terme étant donné que son effet est uniquement exercé pendant la phase aiguë productive de l'infection (131). D'autres centres remettent en question la capacité des agents antiviraux à prévenir les SLP associés au VEB (132, 133). En effet, certains estiment que les antiviraux agiraient, plutôt, en prévenant des infections virales causées par le cytomégalovirus, considéré comme un facteur de risque pour les SLP associés au VEB (134). De plus, une étude randomisée réalisée sur 43 patients séronégatifs vis-à-vis du VEB ayant reçu une transplantation d'organe provenant d'individus séropositifs pour le VEB, a révélé, qu'en dépit de l'utilisation du ganciclovir comme prophylaxie post-transplantation, il y a une évidence d'une présence virale importante détectée dans 37% des patients (135). Pour contourner la limite liée à la forme latente du virus, une nouvelle stratégie de traitement a été proposée impliquant

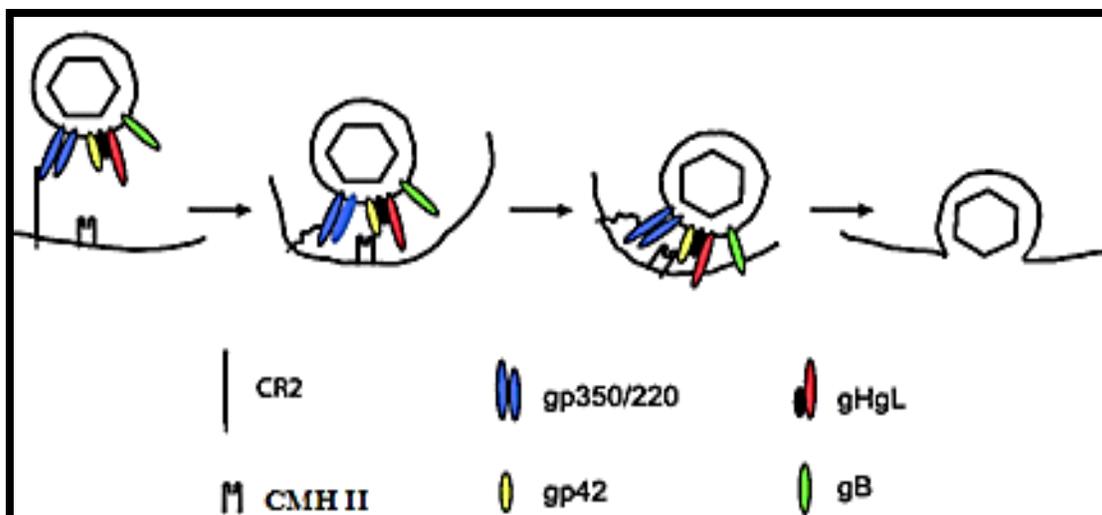
l'utilisation de l'arginine butyrate pour induire la transcription de la thymidine kinase virale et rendre les cellules B immortalisées par le VEB susceptibles au ganciclovir (136). Récemment, un essai clinique de phase II/III (137) a été réalisé, sur quinze patients souffrant de pathologies réfractaires aux méthodes de traitements conventionnelles, dans le but d'évaluer la sécurité ainsi que la tolérabilité de l'arginine butyrate utilisé en combinaison avec le ganciclovir pour le traitement de pathologies malignes causées par le VEB, incluant les SLP. Dix des quinze patients ont démontré une réponse anti-tumorale significative au bout de 21 jours de traitement dont quatre ont atteint une réponse complète. Les six autres patients ont atteint une réponse partielle et ont fini par développer un SLP. Les effets secondaires associés à cette thérapie combinée semblent être tolérables. Enfin, il a été suggéré que la prévention des SLP grâce à l'effet inhibiteur des agents antiviraux pourrait être renforcée par l'administration simultanée par voie intraveineuse d'immunoglobulines spécifiques au VEB (138).

### **1.5.2. Les anticorps neutralisants**

Comme leur nom l'indique, les anticorps neutralisants assurent la neutralisation des particules virales libres et, de ce fait, préviennent l'attachement des virions aux lymphocytes B. Cette interaction illustre la fonction directe de l'anticorps neutralisant en absence de toute autre intervention des acteurs de la réponse immunitaire innée ou adaptative (139). L'intervention des anticorps neutralisants dans la résolution de l'infection ne se limite pas à la simple induction de la perte de l'infectivité des particules virales mais s'étend également à la lyse des cellules infectées. A cet effet, la fonction antivirale effectrice mise en jeu est la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) (140) qui ciblerait les cellules productrices du virus. La conception

ainsi que l'élaboration *in vitro* d'un anticorps neutralisant nécessite tout d'abord la détermination de la cible principale qui doit absolument être présente à une densité élevée à la surface du virion (140) et stable génétiquement.

En regardant de plus près le processus d'entrée du VEB dans la cellule B, on remarque qu'il fait intervenir une multitude d'interactions entre les glycoprotéines de surface et les récepteurs cellulaires (26). Certaines d'entre elles assurent la concentration du virus à la surface de la cellule cible alors que d'autres déterminent le tropisme cellulaire et jouent un rôle important dans le transfert du virus à l'intérieur de la cellule (141). Parmi cette deuxième catégorie, on distingue approximativement quatre protéines absolument requises pour l'entrée virale dans la cellule B, qui se déroule comme suit. L'attachement du VEB au lymphocyte B est médié par l'interaction, avec une grande affinité, entre la glycoprotéine majeure de l'enveloppe virale (la gp350) et le récepteur du complément (CR2/CD21) (24). A partir de ce moment, on assiste à une initiation du processus de fusion qui est la résultante de l'action concertée de trois glycoprotéines : la gHgL, la gB et la gp42, permettant l'entrée du virus par endocytose. Suite à sa liaison au CMH II, la gp42 s'associe à la gH et la gL pour former un complexe stable (142). Ceci est assuré en grande partie par la région N-terminale de la protéine gH qui constitue un élément indispensable pour la fusion membranaire (143). Quant à la protéine gL, elle joue un rôle de protéine chaperonne qui se charge du repliement et du transport de la gH fonctionnelle (144, 145) (figure 5).



**Figure 5 :** Modèle hypothétique de l'entrée du virus dans les lymphocytes B. L'interaction entre la gp350 et le CD21 permet d'amener le virus à proximité de la membrane cellulaire et d'assurer l'interaction entre la gp42 et le CMH II. L'interaction entre cette dernière et la machinerie de fusion, incluant la gH et la gL, initie le processus d'endocytose. Enfin, le virus est internalisé à l'intérieur de la cellule (Adapté de Hutt-Fletcher et *al.*, 2007 (26)).

### 1.5.1 La glycoprotéine majeure de l'enveloppe virale: la gp350

Il est évident que le complexe impliqué dans l'entrée virale, tel qu'exposé ci-dessus, joue un rôle primordial dans le processus de l'infection des lymphocytes B. Toutefois, la gp350 se distingue particulièrement des autres par le rôle majeur qu'elle joue pendant l'étape initiale du processus d'entrée et dans le développement de cancer. L'infection des cellules B par un VEB recombinant exempt du gène BLLF-1 codant pour la gp350 résulte en une diminution drastique de la capacité transformante du virus (146). Bien qu'il ait été suggéré, suite à ces résultats, que le récepteur CR2 ne constitue pas la seule porte d'entrée du virus, l'internalisation médiée par la gp350 est nettement celle qui prédomine. La gp350 est un polypeptide de 907 acides aminés présent à la surface d'une cellule infectée sous deux formes, la gp350 (pour 350 kD) et la gp220 (pour 220 kD), dérivées

de l'épissage alternatif du même transcrit d'ARN (147). La délétion de 259 acides aminés qui différencie les deux formes, conserve le cadre de lecture et permet au virus de se fixer au CR2, moyennant l'une ou l'autre des deux protéines et ce en conservant la même affinité (148). Une étude de la structure cristalline de la gp350 a révélé la présence de 14 chaînes de peptidoglycanes recouvrant un peu partout la surface de la protéine (149). Cette glycosylation permet de stabiliser la protéine, de protéger le virus de la protéolyse pendant la transmission virale (150) et peut-être même de garantir un bon repliement ainsi qu'un ciblage de la protéine (151). En dépit de sa forte glycosylation, la gp350 fait partie des glycoprotéines les plus abondantes du VEB (152).

Des essais de mutagenèse ont démontré que la partie N-terminale de la gp350 formée de 407 acides aminés est la seule région non-glycosylée offrant ainsi un microenvironnement unique pour l'interaction entre ligand et récepteur (153, 154).

Une étude de la dynamique d'évolution de la région N-terminale a permis de démontrer une forte conservation de la séquence en acides aminés (155). Ceci a mis l'accent sur l'importance de la partie N-terminale en particulier et de la gp350 en général dans la survie et la transmission du VEB. Parallèlement, la structure des domaines impliqués dans cette interaction et présents au niveau du récepteur CR2 a été également caractérisée. Il s'agit, en fait, de deux domaines extracellulaires, le SCR1 et le SCR2, qui interagissent par contact avec la gp350 (156). En effet, la forte glycosylation de la protéine lui confère un nuage de charges négatives et lui permet de lier les acides aminés du récepteur, qui eux, sont chargés positivement (151).

Étant exprimée à la surface des cellules infectées, il a été démontré que la gp350 est reconnue par des anticorps neutralisants qui vont permettre la destruction des cellules par

le mécanisme d'ADCC (157). Tout ce qui a été présenté laisse croire que la protéine gp350 constitue un site d'intervention de première importance pour prévenir l'établissement de SLP chez les patients à risque.

### **1.5.2 Anticorps neutralisant monoclonal murin : 72A1**

Un anticorps murin monoclonal, le 72A1, a été développé par Hoffman et *al.* en 1980 et a constitué le fruit de la fusion de la lignée cellulaire de myélome de souris avec des splénocytes de souris immunisées avec la souche virale B95-8. L'immunoglobuline G produite présente une activité anti-VEB qui s'est manifestée à travers différentes observations *in vitro*. En effet, le 72A1 est capable de reconnaître et d'interagir avec la gp350 au même titre que le sérum humain (158). De plus, il peut reconnaître et lier, *in vitro*, la gp350 et la gp220 (23) de 7 lignées cellulaires productrices du VEB (159). Cette interaction neutralise le virus et réduit, par conséquent, considérablement l'infectivité des souches virales utilisées. Il a été suggéré que l'épitope reconnu par le 72A1 se trouve entre les acides aminés 1 et 162 au niveau de la région N-terminale de la gp350 (148). Ayant révélé des résultats prometteurs du point de vue capacité de reconnaissance de la cible et de neutralisation de l'infection, le 72A1 murin a fait l'objet d'essais *in vivo* chez la souris SCID réalisés par Haque et *al.* (158). Ces derniers ont permis de mimer, via l'injection de PBMCs provenant d'un individu séropositif et de virus concentré, le transfert du VEB d'un donneur séropositif à un receveur de greffe séronégatif. Ceci avait pour but de caractériser la capacité de l'anticorps à prévenir l'apparition de SLP chez les receveurs de greffe (160). L'injection intrapéritonéale du 72A1 prévient l'apparition de tumeurs VEB-positives chez les souris SCID contrairement au groupe contrôle où huit sur douze souris ont développé des SLP (158). L'absence d'effet secondaire indésirable

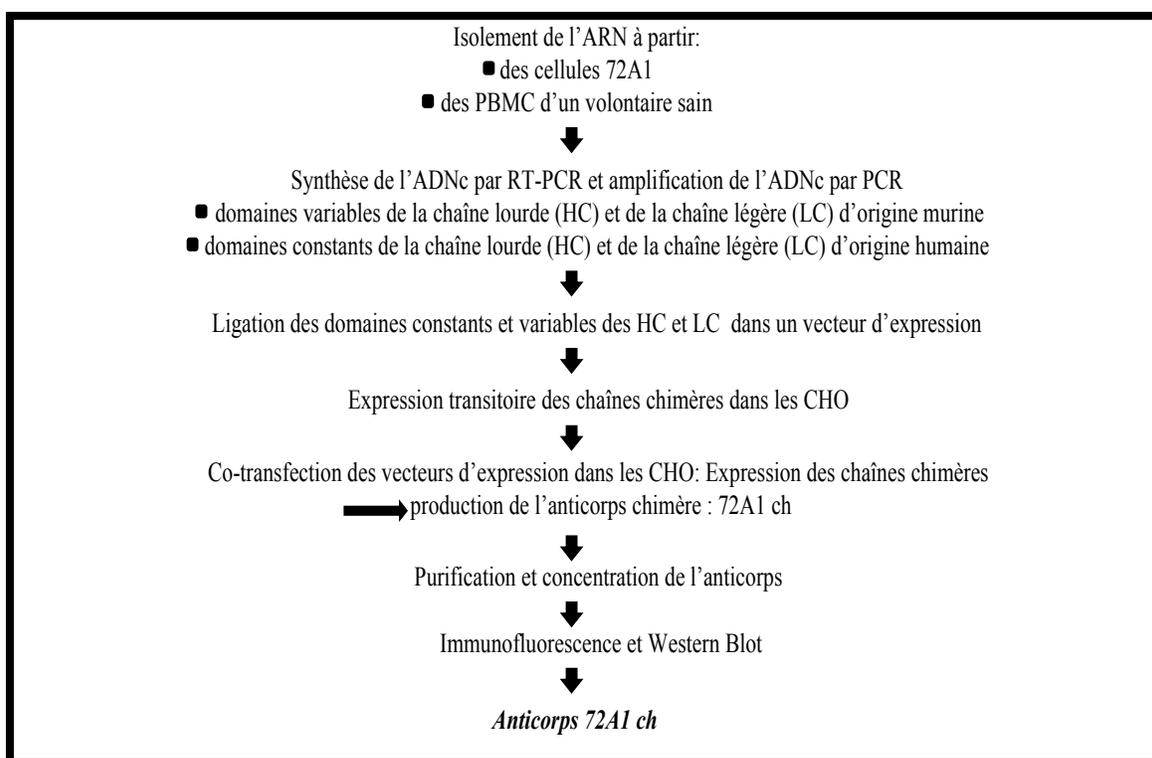
ainsi qu'une réponse du type HAMA (pour « *Human Anti-Mouse Antibody* ») suite à l'injection d'une dose à des adultes volontaires, a permis de procéder à une étude pilote sur quatre patients ayant reçu une transplantation d'organe. Les résultats ont démontré que le 72A1 permet une protection de courte durée contre l'acquisition de l'infection par le VEB pendant la période post-greffe. En outre, bien que les patients soient soumis à un régime immunosuppresseur, ils ont tous développé une réponse HAMA. Ceci dit, l'utilisation du 72A1 dans sa forme native serait à éviter et substitué de préférence par un anticorps humanisé (161).

### **1.5.3 Anticorps chimère murin-humain 72A1 ch**

L'élaboration de l'anticorps monoclonal chimère 72A1 ch neutralisant dirigé contre la gp350 du VEB a été exécutée antérieurement par d'autres membres du laboratoire du Dre Alfieri (V. Leblond, J. Hu et J. Tanner). La construction de l'anticorps d'intérêt a été réalisée par la chimérisation de l'anticorps murin, le 72A1. Cette dernière se distingue des autres méthodes d'humanisation des anticorps par sa simplicité. Quant à la réponse HACA (pour « *Human Anti-Chimeric Antibody* »), dirigée contre la partie murine de l'anticorps, elle ne semble pas constituer un facteur limitant pour l'utilisation de la chimère pour des essais précliniques *in vivo* à court terme et comme traitement prophylactique à long terme. En effet, soumis à un régime immunosuppresseur intense, les patients séronégatifs pour le VEB et susceptibles de recevoir des doses régulières du 72A1 ch pendant la première année post-greffe, présentent un risque minime de développer une réponse humorale pouvant engendrer la dégradation de l'anticorps neutralisant. En outre, bien qu'il sera utilisé dans un contexte d'immunosuppression, le

72A1 ch permet l'élimination des cellules infectées par ADCC laquelle a été mise en évidence dans le cas de TCSH et TOS (162, 163, 164).

La construction de la chimère a été réalisée tel qu'il est décrit par la figure 6. Étant donné que les régions variables de l'anticorps chimère sont d'origine murine, notre laboratoire est en train d'effectuer une analyse structurale tridimensionnelle pour déterminer l'épitope mis en jeu lors de l'interaction avec le ligand, et l'affinité avec laquelle elle s'effectue.



**Figure 6 :** Schéma récapitulatif des étapes d'élaboration de l'anticorps chimère. Les domaines constants sont d'origine humaine et les domaines variables sont d'origine murine. Les plasmides contenant chacune la séquence d'ADN codant pour chacune des deux chaînes ont été co-transfectés dans les cellules CHO pour la production de la chimère. Une sélection des clones stables a été réalisée et l'anticorps a été produit puis purifié. CHO : Chinese Hamster Ovary; HC : chaîne lourde; LC : chaîne légère.

## 1.6 Le projet

Le présent projet pourrait avoir une retombée clinique très importante. En effet, il permettrait, à travers un diagnostic plus précis et un traitement pré-emptif, une meilleure gestion médicale des patients à risque de développer le SLP. Il propose l'étude des événements précoces suite à l'infection par le VEB qui sont impliqués dans le processus d'oncogenèse chez les patients immunodéprimés.

Une étude de plus près des événements qui se déroulent au tout début de l'infection des cellules B par le VEB, tant au niveau de la réplication virale par q-PCR qu'au niveau de l'expression des gènes lytiques précoces et tardifs par NASBA, a permis de confirmer l'HYPOTHÈSE 1 qui stipule que le cycle lytique du virus jouerait un rôle-clé dans la genèse des SLP en produisant des particules virales pouvant infecter les cellules B adjacentes. La détection de l'expression de l'ARN du gène BLLF-1 codant pour la glycoprotéine gp350 témoigne d'une infection productive par le VEB. Cet événement serait à l'origine d'un accroissement du transfert du virus aux cellules B adjacentes, donnant lieu ainsi à une amplification de la charge virale.

Ceci a permis de formuler l'HYPOTHÈSE 2 qui stipule que l'élaboration d'un anticorps chimère 72A1 ch (murin-humain) neutralisant dirigé contre la protéine gp350 située sur l'enveloppe virale permettrait la prévention des SLP chez les patients à risque au moment de la greffe. De ceci émane le deuxième objectif du présent projet qui vise à produire et à démontrer l'activité biologique *in vitro* de l'anticorps chimère préalablement élaboré dans

notre laboratoire. La production de la chimère a été faite par co-expression des régions constantes humaines et variables murines dans les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) suivie de la purification moyennant la protéine A sépharose 4B. La purification de l'anticorps a constitué une étape limitante dans le processus de production étant donné la présence de sérum bovin dans le milieu de culture. Dans un premier temps, la vérification de la présence des chaînes lourde et légère s'est faite sur gel de polyacrylamide SDS-page 10%. En outre, des essais de neutralisation du VEB par le 72A1 ch ont été réalisés. Les résultats des essais de neutralisation fournissent la preuve que l'anticorps chimère produit contre la gp350 est capable de neutraliser le virus et par conséquent de bloquer l'expression de l'ARN lytique précoce et tardif, la réplication de virus et la transmission de ce dernier aux cellules B naïves.



**CHAPITRE DEUXIÈME**

**MATÉRIELS ET MÉTHODES**

## 2.1 Les lignées cellulaires utilisées

Plusieurs lignées cellulaires ont été utilisées pour ce projet (tableau V). La suspension cellulaire a été maintenue dans le milieu approprié et diluée (1:10) à tous les 3 ou 4 jours. Tous les milieux de culture provenaient de la compagnie Invitrogen (Burlington, Ontario, Canada) et contenaient L-glutamine ainsi que 10% de sérum fœtal de veau (SFV) (Wisent, St-Bruno, Québec, Canada). Les lignées cellulaires ont été obtenues de la compagnie ATCC (Manassa, Virginie, États-Unis). En outre, afin d'éviter la contamination bactérienne des lignées cellulaires, tous les milieux de culture ont été additionnés d'un mélange d'antibiotiques, constitué de pénicilline et de streptomycine (Invitrogen) à des concentrations finales respectives de 100 UI/ml et 100 µg/ml. Les cellules ont été conservées dans un incubateur maintenu à une concentration de 5% en CO<sub>2</sub> et à 37°C.

**Tableau V.** Lignées cellulaires utilisées, origines, propriétés et milieu de culture approprié

<b>Lignée</b>	<b>Description</b>	<b>Milieu de culture</b>	<b>Références</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 spécifique à la gp350 capable de neutraliser le VEB.	RPMI 1640	Hoffman et <i>al.</i> , 1980 (159).
CHO-K1	Lignée ovarienne de hamster chinois.	F-12 Kaighn	Puck et <i>al.</i> , 1960 (165).
B95-8	Lignée transformée B dérivée du sang périphérique de singe ouistiti (marmouset) suite à l'infection <i>in vitro</i> par le VEB provenant de la salive d'un cas de mononucléose infectieuse. Cette lignée produit une souche transformante de VEB.	RPMI 1640	Miller et <i>al.</i> , 1973 (166).
Raji	Lignée lymphomateuse B provenant d'un patient africain ayant un lymphome de Burkitt VEB-positif.	RPMI 1640	Theofilopoulos et <i>al.</i> , 1976 (167).
BJAB	Lignée lymphomateuse B provenant d'un lymphome de Burkitt VEB-négatif.	RPMI 1640	Harada et <i>al.</i> , 1987 (168).
P3HR-1	Lignée lymphomateuse B provenant d'un lymphome de Burkitt. Le virus issu de cette lignée a une capacité lytique plutôt que transformante.	RPMI 1640	Hinuma et <i>al.</i> , 1967 (169).

## **2.2 Les cellules primaires utilisées**

L'étude des événements précoces qui surviennent suite à l'infection par le VEB a nécessité l'utilisation de cellules mononucléées du sang de cordon ombilical (CMSCs) humain ainsi que celles du sang périphérique (PBMCs). Un consentement, à caractère libre et éclairé, a été fourni par tous les donneurs, soit les femmes enceintes pour le sang de cordon et le personnel du laboratoire pour le sang périphérique. De plus, le projet a été étudié et approuvé par le Comité d'éthique à la recherche du Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine.

## **2.3 Isolement et infection des cellules mononucléées**

Un volume approximatif de 20 ml de sang de cordon, obtenu de chacun de 3 donneurs pour le sang de cordon et de 3 donneurs pour le sang périphérique, a été utilisé. Brièvement, les cellules mononucléées ont été isolées sur gradient de Ficoll-paque (GE Healthcare, Québec, Canada) tel que décrit ailleurs (92). Les cellules contenues dans le culot ont été lavées 2 fois avec du RPMI à 1% de SFV et préparées pour l'infection. La même procédure a été réalisée pour le sang périphérique.

### **2.3.1 Production et concentration de la souche virale B95-8 et P3HR-1**

Les lignées productrices de virus, B95-8 ou P3HR-1, ont été maintenues en culture dans du RPMI contenant 10% SFV jusqu'à l'obtention de 500 ml de suspension cellulaire ayant une concentration de  $2 \times 10^5$  cellules/ml. Les cellules ont été récupérées et resuspendues dans du RPMI contenant 2% SFV pour être maintenues, par la suite, en

culture pendant 10 à 14 jours. Ceci a pour but de laisser vieillir les cellules et ainsi induire le cycle lytique. Au bout de 10 jours d'incubation, les cellules préalablement induites ont été récoltées aux fins d'analyses par immunofluorescence indirecte contre les antigènes de la capsid virale (VCA pour «*Viral Capsid Antigeny*») pour évaluer l'efficacité de l'induction.

### **2.3.1.1 Immunofluorescence**

#### **2.3.1.1.1 Immunofluorescence indirecte**

La procédure d'immunofluorescence a été utilisée pour évaluer l'efficacité de l'induction et, également, pour déterminer le titre de la préparation virale concentrée de la souche P3HR-1. Les cellules, B95-8 préalablement induites ou Raji mises en infection en présence de la souche P3HR-1, ont été lavées trois fois avec du PBS, séchées à l'air puis fixées sur des lames (à raison d'environ  $5 \times 10^4$  cellules/puits) dans l'acétone pendant 10 minutes à  $-20$  °C. Les cellules non induites ou non infectées avaient subi à leur tour les mêmes étapes, préalables au marquage, pour servir de contrôle négatif. La procédure d'immunofluorescence a été réalisée comme suit. Un sérum humain à haut titre d'anticorps contre les protéines du cycle lytique a été dilué (1 :100) dans du PBS puis distribué sur les différents puits à raison de 40  $\mu$ l. Les lames ont été ensuite incubées pendant 60 minutes à la température ambiante. Un anticorps anti-IgG humain couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), le FITC AffiniPure fragment F(ab')<sub>2</sub> de l'IgG anti-humain préparé chez la chèvre (Jackson ImmunoResearch Laboratory, West Grove, Pennsylvanie, États-Unis), a été utilisé à une dilution de 1:200 dans une seconde incubation de 30 minutes. Les lames ont été 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).

### **2.3.1.1.2 Immunofluorescence anti-complément**

Des cellules BJAB ont été utilisées pour déterminer le titre de la préparation virale de la souche B95-8. Les frottis préparés tel que décrit dans la section précédente ont été incubés en présence d'un sérum humain à haut titre d'anticorps contre les antigènes nucléaires latents EBNA dilué (1:10) dans du PBS puis distribué à raison de 40 µl/puits. Après une incubation de 60 minutes à la température ambiante, un deuxième sérum humain contenant les protéines appartenant au complexe du complément a été utilisé à une dilution de 1:10. Il est à noter que le sérum servant de source de complément doit obligatoirement avoir été manipulé à 4°C lors de la séparation, et congelé en aliquots à -80°C. Suite à une deuxième incubation pendant 1 heure, un anticorps anti-complément couplé au FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratory) a été utilisé à une dilution de 1:200 dans une troisième incubation de 30 minutes. Les lames ont été observées à l'aide d'un microscope UV et des images ont été prises grâce à la caméra SPOT RT Slider.

### **2.3.1.2 Concentration du virus B95-8 et P3HR-1**

L'utilisation du virus B95-8 pour l'étude des événements précoces post-infection ainsi que du virus P3HR-1 pour les essais de neutralisation nécessite leur concentration. Brièvement, le milieu extracellulaire de culture de B95-8 ou de P3HR-1 a été filtré à travers un filtre de 0.45 µm (Millipore, Billerica, Massachusetts, États-Unis) et a été centrifugé pendant 2 heures à 20000 rpm dans un rotor JA20 à angle fixe (Beckman

Coulter, Californie, États-Unis). Le culot, contenant du virus concentré, a été resuspendu dans du milieu de manière à avoir un virus concentré 200 fois, aliquoté et conservé à -80°C jusqu'à utilisation (170).

### 2.3.1.3 Titration du virus B95-8 et P3HR-1

En raison de l'absence de système cellulaire dans lequel le virus est exclusivement lytique, la titration de la souche virale B95-8 a été faite via la détection, par immunofluorescence anti-complément, des antigènes nucléaires spécifiques tels que les EBNA exprimés suite à l'infection des cellules BJAB. Quant à la titration de la souche virale P3HR-1, elle a été faite via à la détection des antigènes précoces (EA), par immunofluorescence indirecte, exprimés suite à l'infection des cellules Raji. La procédure de titration a été réalisée comme suit. Les cellules BJAB ou Raji ont été centrifugées puis resuspendues dans 0.1 ml d'une dilution de la préparation virale (1:1, 1:2; 1:4; 1:10) à raison de  $2 \times 10^5$  cellules par dilution. Après une heure d'incubation à 37°C, sous agitation, les cellules ont été lavées avec du RPMI. Le culot cellulaire a été resuspendu dans 1 ml de RPMI et les cellules infectées ont, finalement, été incubées pendant 48 à 72 heures à 37°C. Des frottis ont été réalisés tel que décrit ci-dessus pour des fins d'immunofluorescence indirecte et anti-complément (170). Le titre du virus/ml est calculé selon la formule suivante :

$$\text{MOI en UFP/ml} = \left( \frac{\% \text{ de cellules EBNA-positives ou } \% \text{ de cellules EA-positives} \times \text{nombre de cellules totales mises en infection}}{100} \right) * 100 * \text{facteur de dilution}$$

### **2.3.2 Infection des cellules mononucléées**

Un culot cellulaire contenant  $2 \times 10^6$  CMSCs primaires fraîchement isolées a été resuspendu dans 200  $\mu$ l de la préparation concentrée du virus B95-8 avec une multiplicité d'infection (MOI) de 0.5 particules/cellule B et incubé pendant 2 heures à température pièce. Après avoir enlevé la suspension virale par lavage, les cellules infectées ont été resuspendues dans du RPMI frais contenant 10% SFV et ont été incubées à 37°C pendant une période allant de 24 heures à 96 heures post-infection. Dans le but de mimer l'environnement *in vivo* dans lequel s'effectue la transmission de l'infection d'une cellule à une autre, les CMSCs infectées ont été diluées avec des CMSCs non infectées au 1:10 ou au 1:50. La même expérience a été refaite en présence de l'*acide phosphono-acétique* (PAA), ajouté à une concentration de 50  $\mu$ g/ml aux cellules préalablement à l'incubation à 37°C dans le but d'inhiber le cycle lytique. Les CMSCs non infectées ont été utilisées comme contrôle négatif. La même expérience a été réalisée pour les cellules mononucléées du sang périphérique adulte sauf que le PAA a été substitué par un anticorps neutralisant notamment le 72A1 murin à une concentration de 10  $\mu$ g/ul.

## **2.4 Méthodes de manipulation des acides nucléiques**

### **2.4.1 Extraction d'ADN total**

L'isolement de l'ADN total (viral et cellulaire) a été accompli comme suit : L'ADN a été extrait à partir des cellules infectées à l'aide du QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN, Mississauga, Ontario, Canada) selon le protocole fourni avec le produit en incluant les modifications suivantes : l'incubation à 56°C a été prolongée de cinq minutes et l'élution

a été faite en cinq minutes. L'ADN total a été récupéré pour des fins d'analyse par la q-PCR (Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel).

#### **2.4.2 Amplification et quantification de l'ADN viral par q-PCR**

La qPCR en temps réel est une des techniques à la base de la quantification de l'ADN viral. De plus, elle permet de quantifier les copies du gène cellulaire unique, le  $\beta 2m$ . Ainsi, les résultats sont exprimés en nombre de copies du génome EBV/cellule. La réaction qPCR a été accomplie moyennant le 2X Brilliant Multiplex QPCR Master Mix (Qiagen) sur 5  $\mu$ l d'ADN total. Dans notre cas, une trousse comportant un mélange de deux amorces complémentaires à la région BamR du génome viral et de deux amorces complémentaires au gène cellulaire  $\beta 2m$ , a été utilisé à la concentration finale de 300 nM et 150 nM, respectivement. De plus, un pool équimolaire (100  $\mu$ M) de sondes marquées au FAM pour le VEB et au Hex pour la  $\beta 2m$  a été utilisé. La réaction a été réalisée dans un appareil Stratagene MX3000P (SABiosciences, Maryland, États-Unis) et incluait un « hot start » de 10 minutes à 95°C, et 50 cycles comme suit : 95°C – 30 secondes, 58°C – 30 secondes et 72°C – 45 secondes, pour 3 lectures. La courbe standard de l'ADN a été réalisée moyennant différentes dilutions de l'ADN extrait des cellules Namalwa contenant 2 copies du génome VEB/cellule.

#### **2.4.3 Extraction de l'ARN total**

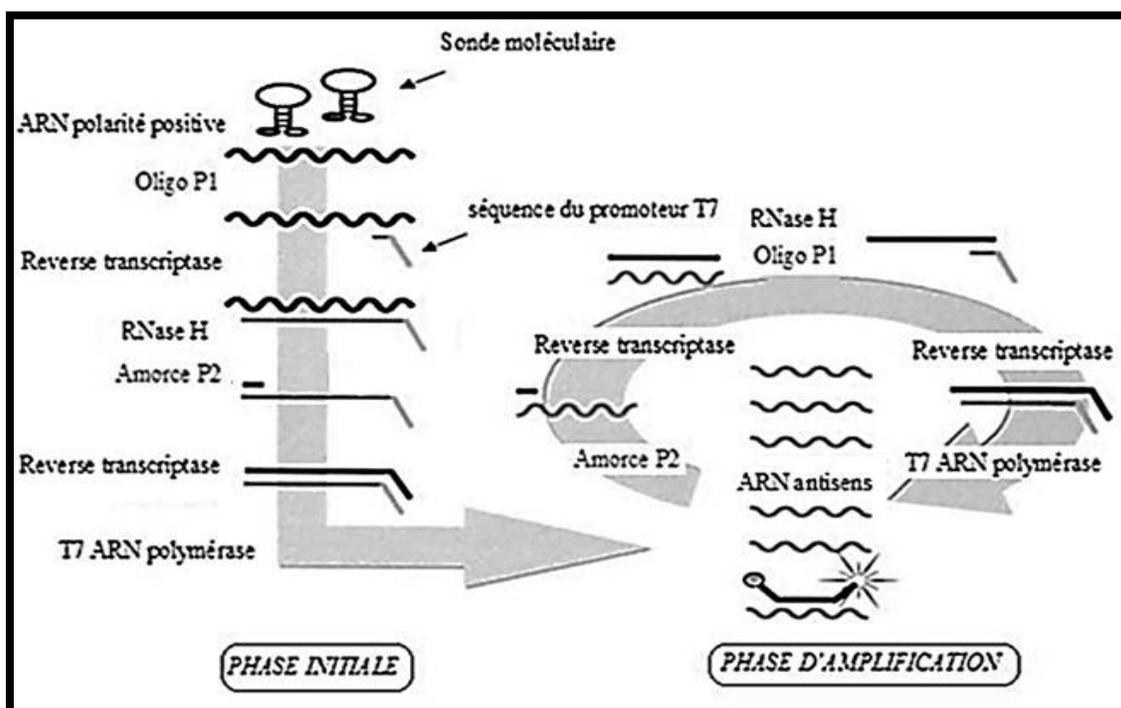
L'ARN total a été isolé des cellules infectées à l'aide de la trousse Nuclisens Magnetic Extraction Reagents (Biomérieux, Québec, Canada) selon la méthode développée par Boom et *al.* (171). La méthode d'extraction est basée sur la capacité des acides nucléiques de se lier aux billes de silice, en présence de concentrations élevées

d'isothiocyanate guanidine (GuSCN). Ce dernier est doté de propriétés dénaturantes qui permettent d'une part la lyse des cellules, par conséquent la libération de l'ARN, et d'autre part l'inactivation des nucléases, en particulier les RNases. La procédure d'extraction a été réalisée comme suit. Le complexe acide nucléique/billes de silice formé dans le tampon de lyse, a été récupéré par centrifugation. Des lavages ont été, par la suite, réalisés moyennant un système semi-automatique, le Nuclisens Extractor (Biomérieux, Québec, Canada). L'ARN a été finalement élué sous l'effet de l'action combinée du tampon d'éluion à faible teneur en sel et de l'incubation à 60°C sous agitation.

#### **2.4.4 Quantification de l'ARN viral par NASBA**

La NASBA (pour «*Nucleic Acid Sequence Based Amplification*») est une réaction d'amplification semi-quantitative, continue et isotherme offrant une alternative simple et rapide pour l'amplification de l'ARN. C'est un procédé faisant intervenir trois enzymes : la reverse transcriptase (RT) du virus aviaire myeloblastique (AMV), la RNase H et l'ARN polymérase T7 ADN dépendante (T7 DdRp pour «*T7 DNA dependent RNA polymerase*»). L'amorce P1 utilisée, outre le fait qu'elle soit complémentaire à l'ARN, contient au niveau de son extrémité 5' une séquence correspondant au promoteur de l'ARN polymérase. Après une brève incubation à 65°C assurant la dénaturation de la cible, l'amorce P1 s'hybride à l'ARN à 41°C servant de matrice pour l'AMV RT pour la synthèse du cDNA. Simultanément, l'ARN de l'hybride ARN/cDNA est dégradé par RNase H. Ceci va permettre la fixation de l'amorce P2, son élongation et la production de la séquence double brin du promoteur T7. A ce moment, l'ARN polymérase T7 assure la production de plusieurs copies d'ARN de polarité négative qui caractérise la transition de

la phase initiale à la phase cyclique d'amplification (figure 7). Dans notre cas, les amorces nous ont été fournies par la compagnie Biomérieux. La détection de l'amplification se fait en temps réel grâce à une molécule balise («*beacon*») couplée au niveau de son extrémité 5' à un fluorophore et à un *quencher* au niveau de son extrémité 3'. L'accroissement de la fluorescence émise, suite à la fixation de la sonde à la séquence cible, est détecté par un fluorimètre, le Nuclisens EasyQ Analyser (Biomérieux, Québec, Canada). L'analyse des données a été réalisée par le programme Nuclisens EasyQ Analyser.



**Figure 7 :** Représentation schématique de la réaction d'amplification NASBA. L'ARN est amplifié par 3 enzymes différentes en présence de deux amorces : l'oligo 1 et l'amorce P2. La détection de l'amplification se fait moyennant les sondes moléculaires ayant la même polarité que l'ARN de départ. (Adapté de Niesters, 2001 (172)).

## 2.5 Production de l'anticorps

La production de l'anticorps chimère a été réalisée dans les CHO («*Chinese Hamster Ovary*») par co-transfection des deux plasmides contenant l'ADN de la chaîne légère (LC) et de la chaîne lourde (HC). Une sélection des meilleurs clones du point de vue stabilité de production des deux chaînes chimères a été réalisée. Les clones cellulaires choisis ont été maintenus en culture dans du F12K contenant 10% SFV ainsi qu'un supplément de deux antibiotiques de sélection à savoir le G418 (Sigma) et la zéocine (Invitrogen), ajoutés à une concentration finale de 500 µg/ml et de 200 µg/ml, respectivement. La production de l'anticorps 72A1 murin a été assurée par la lignée cellulaire 72A1 maintenue en culture dans du RPMI avec 10% SFV. Dans ce cas aucun antibiotique de sélection n'a été ajouté au milieu de culture étant donné que la lignée 72A1 n'est autre qu'un hybridome.

### 2.5.1 Purification et concentration de l'anticorps

L'anticorps chimère, produit dans le milieu extracellulaire a été purifié par deux passages consécutifs à travers une pré-colonne de sephadex G-25 DNA Grade (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden) et une colonne de Protein-A Sepharose® 4B (Invitrogen). L'élution a été assurée par le tampon d'élution à pH 3 et a été immédiatement succédée par la neutralisation de l'éluat par l'addition de 0.1 M Tris-Cl pH 8. La concentration et la dialyse de l'anticorps ont été réalisées à l'aide d'un filtre microcon (Microcon Centrifugal Filter Devices YM-10, Millipore).

Quant à la purification de l'anticorps murin, une étape de calibration du pH à environ 9 préalable à l'étape de purification proprement dite est indispensable pour accroître l'affinité entre l'anticorps et la colonne. Pour ce faire, un mélange de NaCl et de Tris à des concentrations finales respectives de 3 M et de 0.05 M a été ajouté au surnageant de culture.

L'anticorps concentré (murin et chimère) est par la suite aliquoté et conservé à -20°C, après l'ajout de 50% de glycérol (Sigma).

## **2.6 Électrophorèse en gel de polyacrylamide**

La vérification de la présence des chaînes lourde et légère a été réalisée sur un gel 10% de polyacrylamide SDS-page en conditions dénaturantes par l'addition de dithiothréitol (DTT) dans le tampon de chargement. L'anticorps, préalablement purifié et concentré, a été mélangé à ce dernier et bouilli pendant dix minutes. L'échantillon a été, par la suite, incubé dans la glace pendant cinq minutes avant d'être séparé sur le gel 10% de polyacrylamide. La visualisation des bandes sur ce dernier a été réalisée, dans un premier temps, par une coloration avec une solution de bleu de coomassie à 0.25%. Après trente minutes, le gel a été décoloré dans une solution de méthanol et d'acide acétique. Une photo du gel a été prise à l'aide d'un appareil *multi-image light cabinet* (Alpha Innotech Corporation, États Unis).

## **2.7 Évaluation de la capacité de l'anticorps chimère à reconnaître la gp350 produite par les cellules B95-8**

La procédure d'immunofluorescence a été utilisée pour évaluer la capacité de l'anticorps chimère à reconnaître la gp350 produite par la lignée cellulaire B95-8 induite pendant trois

à quatre jours avec du TPA (*12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*) pour induire davantage le cycle lytique et ce à raison de 30 ng/ml pour  $4 \times 10^5$  cellules/ml. Succinctement, des frottis ont été réalisés et les cellules ont été incubées à la température ambiante avec 20  $\mu$ l de la préparation d'anticorps concentré. Les mêmes étapes, suivant le marquage primaire, que celles décrites dans la section 2.3.1.1, ont été réalisées. L'anticorps 72A1 murin a été utilisé comme contrôle positif. A cette fin, un anticorps anti-IgG murin couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), le FITC AffiniPure fragment F(ab')<sub>2</sub> de l'IgG anti-murin préparé chez la chèvre (Jackson ImmunoResearch Laboratory, West Grove, Pennsylvanie, États-Unis), a été utilisé à une dilution de 1:200 dans une seconde incubation de 30 minutes.

## **2.8 Production de l'anticorps en présence du SFV avec une quantité ultra faible en IgG**

La production de l'anticorps chimère et murin a été réalisé en suivant la procédure décrite dans la section 2.5 en introduisant un changement mineur au niveau de la composition du SFV (Invitrogen) qui cette fois contient une très faible quantité d'IgG (inférieur à 5  $\mu$ g/ml).

## **2.9 Évaluation de la pureté de la préparation d'anticorps chimère**

### **2.9.1 Dosage des protéines par la méthode Bradford**

La vérification de la pureté de l'anticorps chimère ainsi que celle de l'anticorps murin a été réalisée par un dosage de protéines avec le bleu de Coomassie (Sigma), composant intégral de la méthode de Bradford. La gamme étalon, établie par la protéine BSA (Sigma), ainsi que les différentes dilutions de l'échantillon d'intérêt, ont été réalisées

dans une plaque de 96 puits. La procédure suivie est celle décrite par le protocole fourni avec le produit. La lecture des plaques a été réalisée à la longueur d'onde de 595 nm avec le lecteur TECAN SPLC Rainbow (Tecan Group Ltd., Männedorf, Suisse).

### **2.9.2 ELISA**

L'estimation de la quantité d'IgG chimère par rapport à la quantité totale de protéines présentes dans la préparation concentrée d'anticorps a été réalisée par ELISA. Cette dernière a été accomplie comme suit. Les puits des plaques ont été couverts, pendant toute la nuit, avec un anticorps IgG anti-humain (Sigma). Après plusieurs lavages ainsi qu'une étape de blocage, durant 1 heure avec du DMEM (Invitrogen), les échantillons ont été répartis entre les différents puits à raison de 100 µl/puits. Enfin, l'incubation avec un anticorps IgG anti-humain couplé à la phosphatase alcaline (Sigma) suivie de l'ajout du substrat de cette dernière, à savoir le PNPP phosphatase alcaline (Sigma), permet la mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 405 nm. La lecture des plaques a été réalisée en utilisant le lecteur de plaque TECAN SPLC Rainbow. Des IgG humains provenant d'un volontaire humain ont été utilisés comme contrôle positif.

### **2.10 Essais de neutralisation**

La quantification de la capacité neutralisante, des deux anticorps murin et chimère, a été réalisée en évaluant la capacité d'inhibition de l'expression des antigènes précoces (EA pour «*early antigen*») induite suite à l'infection des cellules Raji par la souche virale P3HR-1. La méthode de neutralisation a été réalisée tel que décrite ailleurs (173). Brièvement, la préparation virale concentrée (MOI de 0.4 PFU/ml) a été incubée avec

différentes dilutions d'anticorps, avec une proportion de 1:1 (v/v), pendant une heure à 37° C sous agitation. Le complexe formé a été par la suite lavé puis incubé en présence de  $5 \times 10^4$  cellules Raji. Au terme d'une incubation qui a duré une heure, les cellules ont été resuspendues dans 200  $\mu$ l de milieu et incubées pendant 48 heures à 37°C. Des frottis ont été réalisés pour des fins de fluorescence, tel qu'il a été décrit dans la section 2.3.1.1. Une proportion des cellules Raji incubée en présence du virus seul ainsi qu'une autre incubée en présence de l'anticorps S12 anti-LMP1 ont été utilisées respectivement comme contrôle positif et négatif.

### **2.11 Titration de l'anticorps chimère**

La titration de l'anticorps chimère a été réalisée par immunofluorescence indirecte sur les frottis des cellules B95-8 préalablement induites. Ces dernières ont été incubées en présence de différentes dilutions de l'anticorps chimère. L'anticorps murin a été utilisé comme contrôle positif.

## **CHAPITRE TROISIÈME**

### **RÉSULTATS**

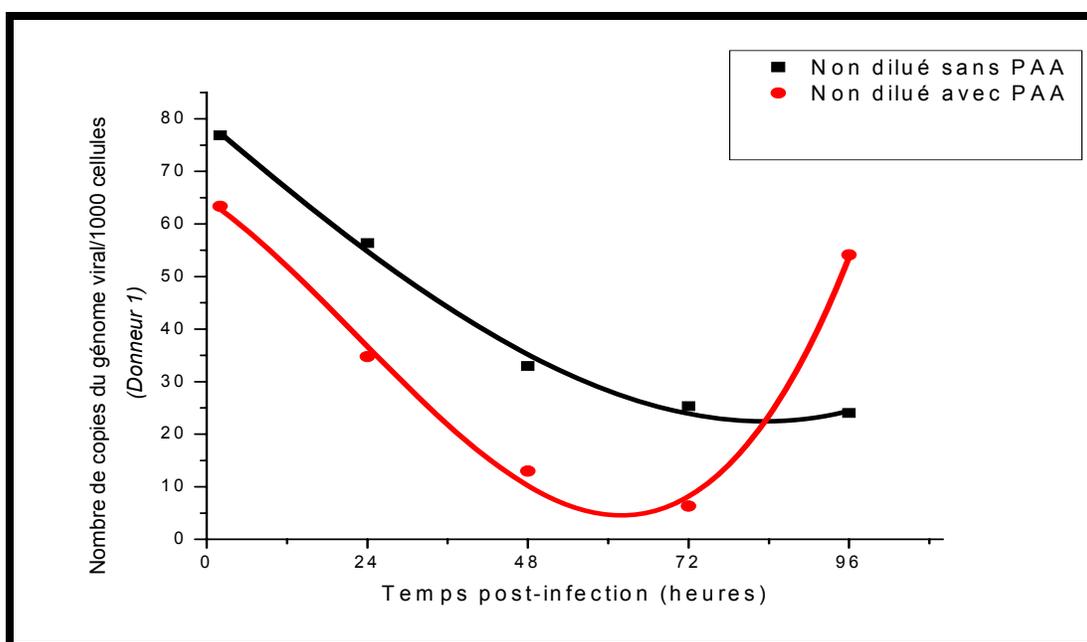
### 3.1 Évolution de la charge virale pendant l'infection aiguë

Dans le but de répondre à notre première hypothèse qui stipule que le cycle lytique du virus jouerait un rôle-clé dans la genèse des SLP en produisant des particules virales pouvant infecter les cellules B adjacentes et augmenter le nombre de cellules qui vont amorcer le processus d'oncogenèse chez les patients, un suivi de l'évolution de la charge virale par q-PCR a été réalisé.

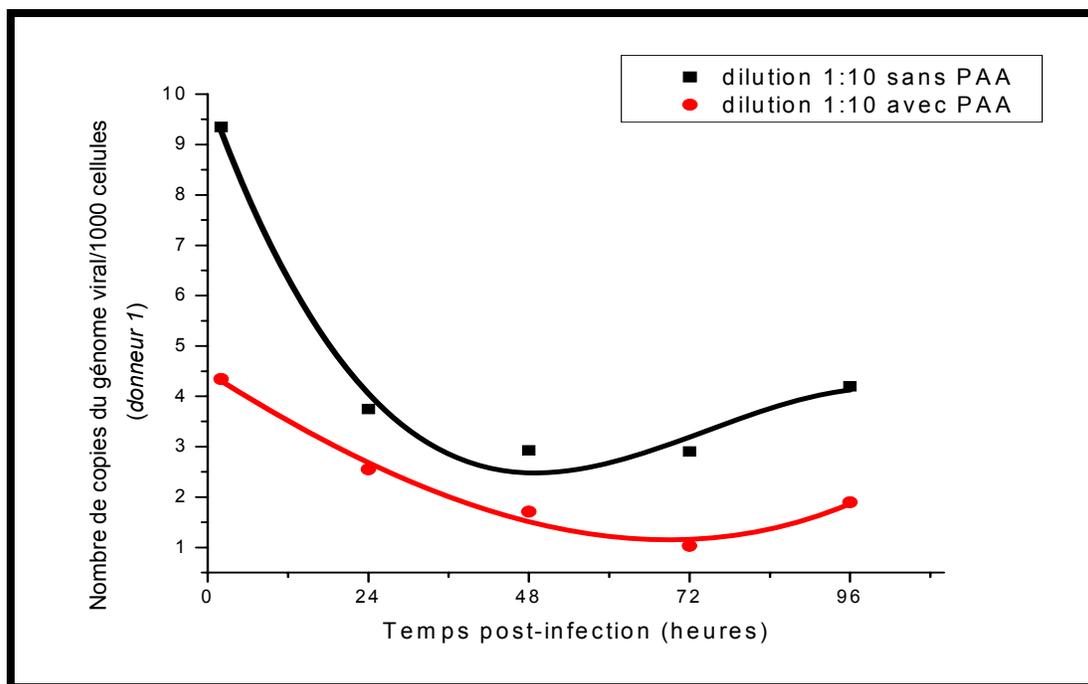
Les résultats de la q-PCR, effectuée sur les CMSCs mises en infection, entre 2 heures et 96 heures post-infection, intervalle pendant lequel l'infection est considérée aiguë (174), ont révélé la présence d'une réplication de l'ADN viral. En effet, la forme polynomiale de la courbe témoigne de l'augmentation du nombre de copies du génome viral à partir de 48h post-infection (figure 8), lequel se stabilise à partir de 72 heures post-infection en absence de PAA. Toutefois, pour pouvoir déterminer l'origine de cet accroissement, il faut tenir compte du fait que l'ADN du VEB existe en deux états, soit l'état latent, caractérisé par le génome sous la forme épisomale, soit l'état lytique, caractérisé par le génome sous la forme linéaire. Ceci étant dit, les résultats obtenus suggèrent les conclusions suivantes : l'augmentation notée est à l'origine de l'accumulation de la forme épisomale ou de la forme linéaire ou d'un mélange des deux formes de l'ADN viral. L'ajout de l'*acide phosphono-acétique* (PAA), inhibiteur spécifique de l'ADN polymérase virale des *herpèsviridae*, à la culture a entraîné une diminution de la charge virale notable à partir de 48h post-infection (figure 8a et 8b). Malgré que la baisse en ADN viral en présence de PAA soit suggestive d'un effet inhibiteur du PAA sur la réplication de l'ADN linéaire du virus, la différence entre les deux valeurs avec et sans PAA n'est pas suffisante pour permettre de tirer des conclusions déterminantes. La

dilution des cellules infectées (figure 8b) avait pour but de minimiser le bruit de fonds et de se rapprocher le plus possible des conditions réelles *in vivo*. La figure 8b montre une différence encore moins marquée entre les copies d'ADN viral à 48h et à 72h pour les deux conditions de culture (avec et sans PAA).

a)



b)



**Figure 8:** Cinétique d'évolution de la charge virale pendant l'infection aiguë des cellules mononuclées du sang de cordon (CMSCs). L'évolution de la charge virale pendant l'infection aiguë a été réalisée par PCR quantitative en temps réel. Deux séries d'expériences ont été accomplies en utilisant des cellules non diluées (a) et des cellules diluées de manière à avoir une cellule infectée/10 cellules non infectées (b). Les courbes en rouges désignent l'évolution de la charge virale en présence de PAA et celles en noir correspondent à l'évolution en absence de PAA. L'expérience a été réalisée avec 3 donneurs. Les résultats obtenus sont représentatifs de trois expériences. Les courbes ont été dessinées à l'aide du programme OriginPro 8.

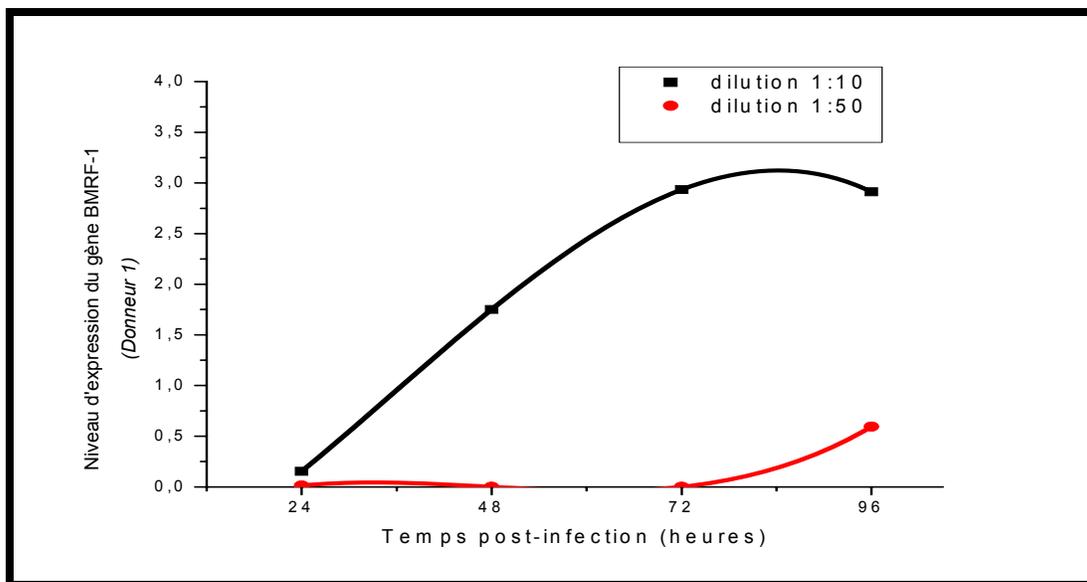
### 3.2 Évolution de l'expression des gènes lytiques pendant l'infection aiguë

Dans le but d'investiguer davantage les événements qui se déroulent au tout début de l'infection causée par le VEB, un suivi de l'expression de deux classes de gènes lytiques a été réalisé entre 24 heures et 96 heures post-infection par la technique NASBA. Toutefois, étant donné que l'infection des cellules mononuclées du sang de cordon n'a permis de détecter aucune expression des gènes lytiques, les cellules mononuclées du

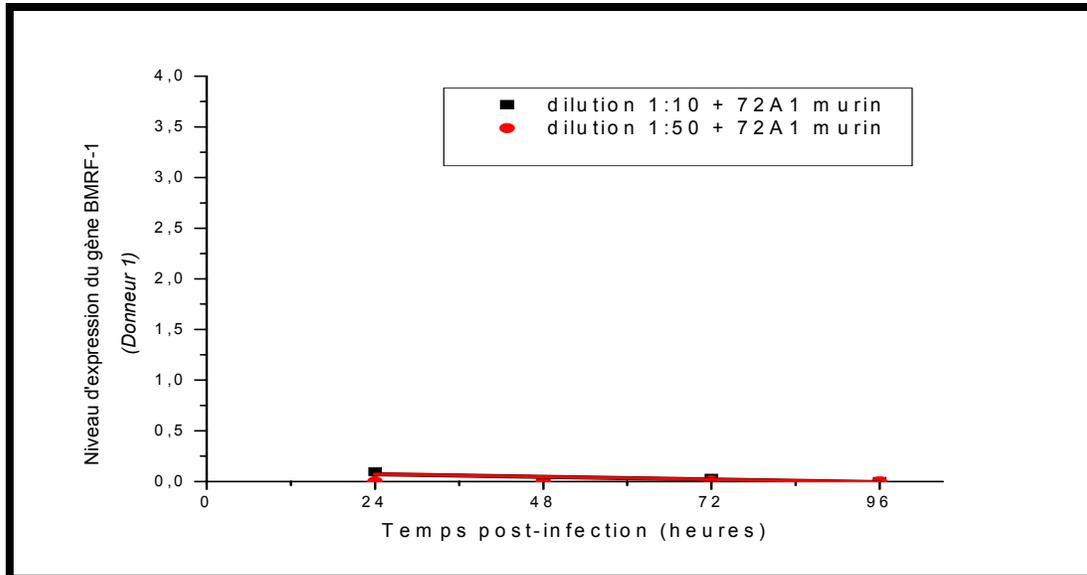
sang périphérique ont été utilisées à cette fin et ont permis de caractériser le patron d'expression des gènes d'intérêt pendant l'infection aiguë. Le premier gène candidat est un gène lytique précoce, notamment le BMRF-1, codant pour un facteur de processivité de l'ADN polymérase virale. Le second est un gène lytique tardif, le BLLF-1, codant pour la glycoprotéine majeure de l'enveloppe virale, la gp350, et témoignant de l'existence d'une infection lytique productive. Le suivi de la transcription des deux gènes lytiques pour différents donneurs (n=3) (figure 9) a révélé la présence de deux profils d'expression caractérisant chacune les deux classes de gènes. En effet, l'expression des gènes précoces est amorcée à partir de 24 heures post-infection (figure 9a) alors que celle des gènes tardifs est détectée à partir de 48h post-infection, atteint un pic à partir de 72h et diminue jusqu'à disparaître à 96h post-infection (figure 9c).

Pour avoir la preuve que cette évolution de l'expression est due bel et bien à une réplication productive du virus, la même expérience a été faite en ajoutant à la culture un anticorps anti-gp350 qui va neutraliser le virus et empêcher l'infection. Les résultats présentés dans les figures 9b et 9d ont révélé l'absence totale de l'expression des deux classes de gènes lytiques.

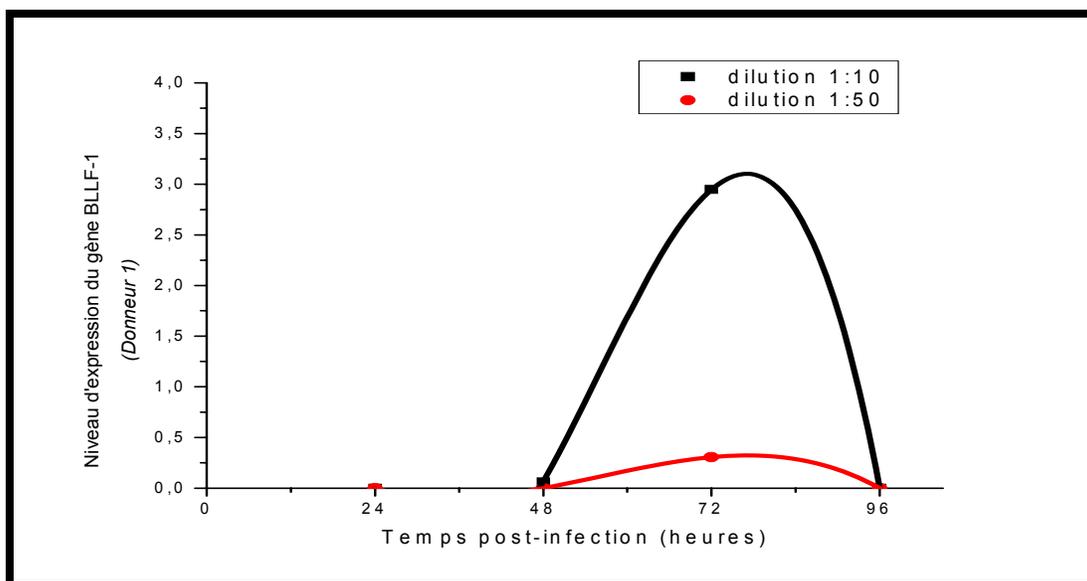
a)



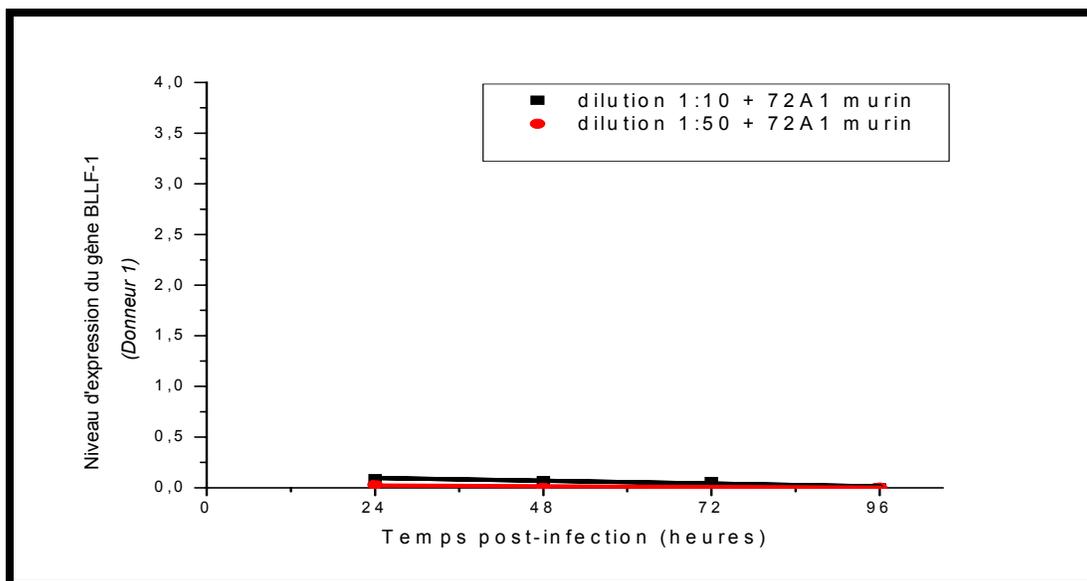
b)



c)



d)



**Figure 9:** Cinétique d'évolution de l'expression des gènes lytiques pendant l'infection aiguë des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs). L'évolution de l'expression pendant l'infection aiguë a été réalisée par NASBA. Deux séries

d'expériences ont été accomplies en utilisant des cellules infectées diluées de manière à avoir une cellule infectée/10 cellules non infectées, une cellule infectée/50 cellules non infectées. **(a), (c)** : Les courbes montrent respectivement l'évolution de l'expression du gène précoce BMRF-1 et du gène BLLF-1. **(b), (d)** : Les courbes montrent l'effet de l'anticorps neutralisant murin anti-gp350, le 72A1, sur l'expression des deux gènes lytiques. Les chiffres fournis représentent des niveaux d'expression relatifs déterminés par la méthode semi-quantitative NASBA. Chaque expérience a été réalisée avec 3 donneurs. Les résultats montrés ici sont représentatifs de trois expériences. (Ces données ont été fournies gracieusement par Madame Jing Hu). Les courbes ont été dessinées à l'aide du programme OriginPro 8.

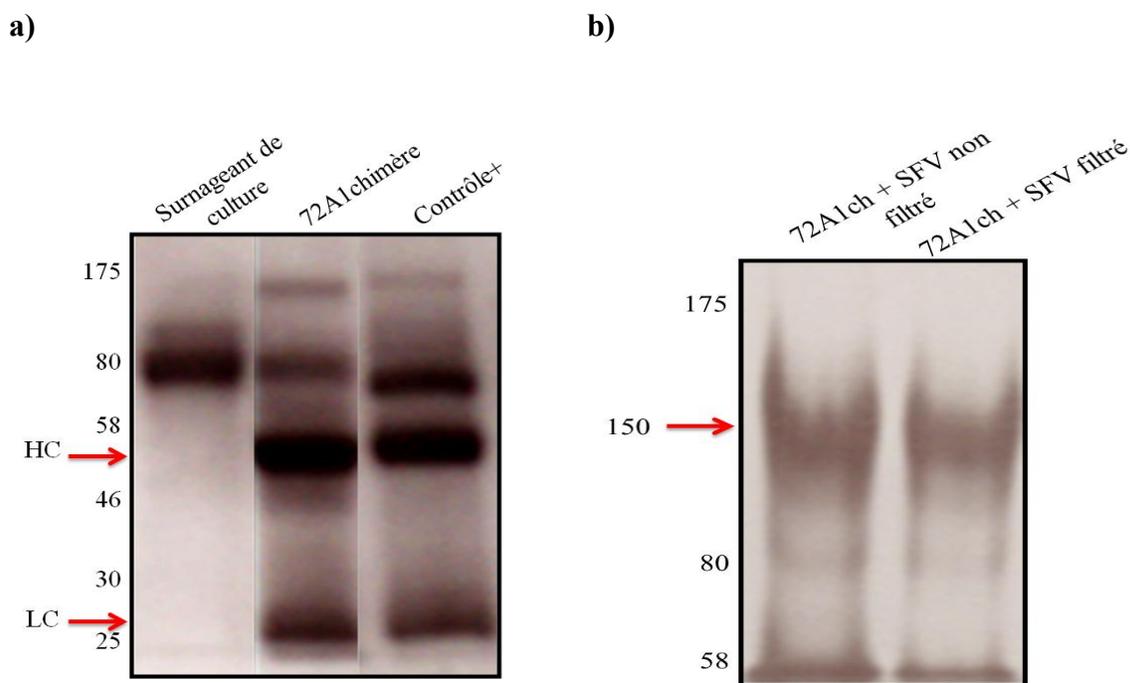
### **3.3 Caractérisation *in vitro* de l'anticorps chimère 72A1 ch**

#### **3.3.1 Expression de l'anticorps 72A1 ch**

Des clones de la lignée cellulaire CHO qui produisent les deux chaînes chimères lourdes et légères ont été sélectionnés dans le but d'assurer une production et une sécrétion stable de l'anticorps complet. La figure 10 présente les résultats des gels de polyacrylamide. Le premier, réalisé en conditions dénaturantes, montre deux bandes prononcées, dont une d'environ 25 kDa correspondant à la LC et l'autre de 50 kDa pour la HC (figure 10a). Ceci témoigne de l'expression intracellulaire de ces dernières et de leur combinaison pour générer un anticorps complet et fonctionnel. Le deuxième (figure 10b), effectué en condition non dénaturante, a permis d'analyser le surnageant des clones sélectionnés, après purification et concentration. En effet, il permet de confirmer les résultats exposés par le premier gel en montrant une bande à 150 kDa, ce qui correspondrait en réalité à deux LC et deux HC formant l'anticorps complet.

La quantité substantielle d'immunoglobuline présente dans le SFV (Wisent), utilisé à raison de 10% dans le milieu de culture des CHO, laisse place au doute quant à l'homogénéité ainsi que la pureté de l'anticorps purifié. L'anticorps a été par ailleurs

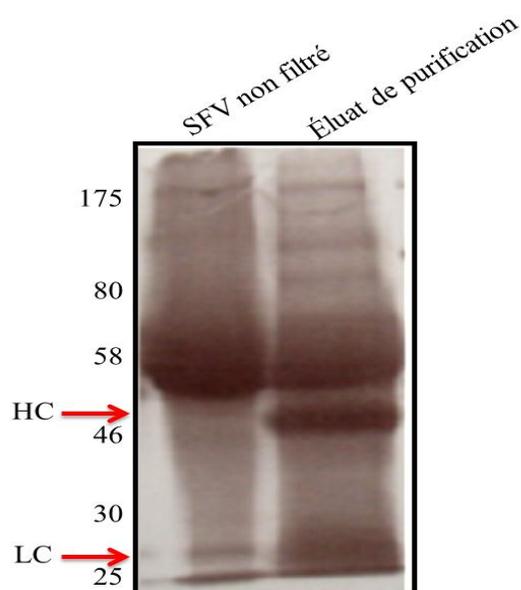
produit dans deux conditions en présence de SFV non filtré (Wisent) et de SFV préalablement filtré par la compagnie Wisent. L'utilisation du SFV filtré a pour but de minimiser la contamination de la préparation concentrée du 72A1 chimère par les IgG bovins présents dans le sérum. L'analyse du produit de purification en présence de SFV filtré et non filtré en conditions non dénaturantes (figure 10b) montre, pour la même quantité d'anticorps chargée dans le gel, une bande d'intensité moindre lorsque les IgG bovins sont quasi absents du sérum.



**Figure 10:** Gels de polyacrylamide en conditions dénaturantes et non dénaturantes montrant l'expression de l'anticorps chimère. **(a)** Expression des deux types de chaînes formant l'anticorps complet produit dans la lignée CHO, purifié avec la colonne de Protein-A Sepharose® 4B et chargé à raison de 10 µg par puits dans un gel de polyacrylamide 10 % en conditions dénaturantes. Le fluide extracellulaire des cellules CHO, correspondant au surnageant de culture sur la figure, a été récupéré et chargé directement dans le gel de polyacrylamide sans purification préalable. **(b)** Anticorps chimère, produits par les clones sélectionnés en présence de SFV non filtré et filtré,

analysé à raison de 10  $\mu\text{g}$  en conditions non dénaturantes sur un gel de polyacrylamide 6%. Les tailles des bandes indiquées sont exprimées en kDa. L'anticorps murin 72A1 a été utilisé comme contrôle positif.

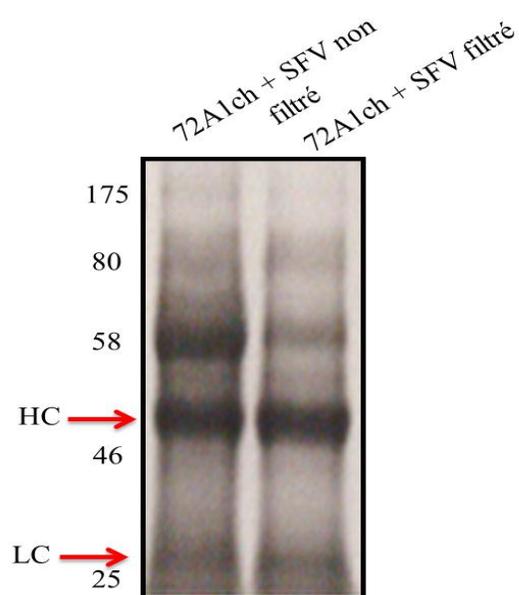
Dans le but d'avoir la confirmation de la présence d'IgG dans le SFV non filtré préalablement utilisé pour la culture des CHO, une analyse en conditions dénaturantes de l'éluat récupéré après purification du SFV par deux passages successifs à travers la colonne de Protein-A Sepharose® 4B, a été réalisée. Les résultats, présentés dans la figure 11, révèlent la présence de deux bandes correspondant aux chaînes lourde (50 kDa) et légère (25 kDa).



**Figure 11:** Gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes montrant la composition en immunoglobuline du SFV. Le puits de gauche correspond au SFV non purifié. Le puits de droite correspond à l'éluat récupéré suite à la purification du SFV purifié moyennant la colonne de Protein-A Sepharose® 4B et chargé sur un gel de polyacrylamide 10% en conditions dénaturantes. Les tailles des bandes indiquées sont exprimées en kDa.

Dans l'optique d'optimisation des conditions de production de notre chimère, un dosage des protéines totales présentes dans la préparation d'anticorps concentrée à partir d'un

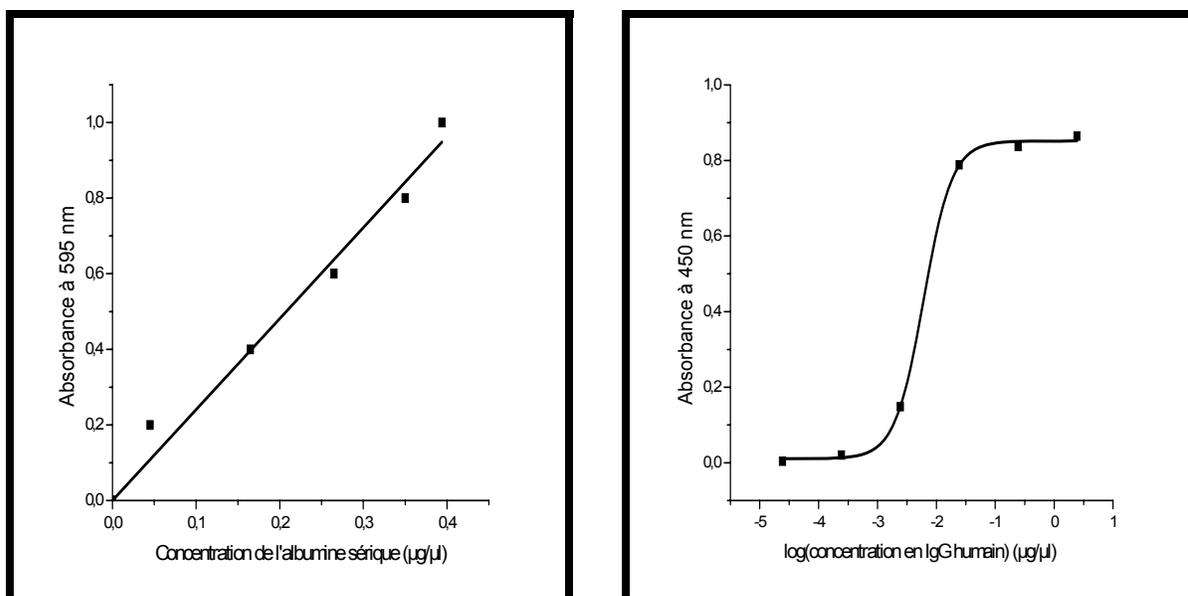
surnageant de culture contenant ou non du SFV filtré s'impose à ce stade de l'étude. Les résultats ont permis de révéler que la quantité d'IgG provenant du SFV représente environ 55% de la quantité totale d'IgG présente dans la préparation d'anticorps. Ceci laisse suggérer que les bandes observées sur le premier gel de polyacrylamide (figure 10a) étaient en réalité un mélange hétérogène formé par les LC et HC de l'anticorps chimère et des immunoglobulines du SFV. Suite à ces résultats, nous avons décidé qu'une production à plus grande échelle de l'anticorps chimère en présence de 10% SFV contenant des quantités ultra faibles en immunoglobuline (Wisent) serait plus fructueuse dans la mesure où la présence de contamination pourrait interférer avec les essais de caractérisation *in vitro* ultérieur. La figure 12 présente les résultats des gels de polyacrylamide en conditions dénaturantes réalisés pour l'anticorps produit dans les nouvelles conditions. En plus de l'homogénéité de la préparation, on note une diminution de l'intensité de la bande d'environ 60 kDa qui correspond à l'albumine.



**Figure 12:** Gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes montrant l'expression de l'anticorps chimère en présence de SFV ultra-faible en immunoglobulines. La colonne de gauche correspond aux HC et LC produites en présence de SFV non filtré. La colonne de droite correspond aux HC et LC propres à l'anticorps chimère. L'anticorps a été chargé à raison de 10  $\mu$ g dans un gel de polyacrylamide 10% en conditions dénaturantes. Les tailles des bandes indiquées sont exprimées en kDa.

### 3.3.2 Estimation de la quantité de 72A1 ch par ELISA

Le dosage de la quantité de protéines totales dans le produit de la purification ne permet pas de quantifier les immunoglobulines dans la mesure où les contaminations d'origine protéique sont omniprésentes même à très faible quantité. De ce fait, l'estimation de la quantité totale d'IgG présente dans la préparation concentrée d'anticorps a été réalisée par un ELISA indirect. A la dite quantification, s'ajoute une estimation de la pureté en termes de quantité relative d'IgG humain dans la préparation. Les résultats présentés dans la figure 13 ont permis d'estimer le taux de pureté à environ 78%. En effet, la quantité déterminée par la méthode Bradford est de  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  versus  $0.78 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  par ELISA. Le taux de pureté est spécifique à l'IgG d'intérêt étant donné que le SFV ajouté au milieu de culture est pratiquement exempt d'immunoglobuline.



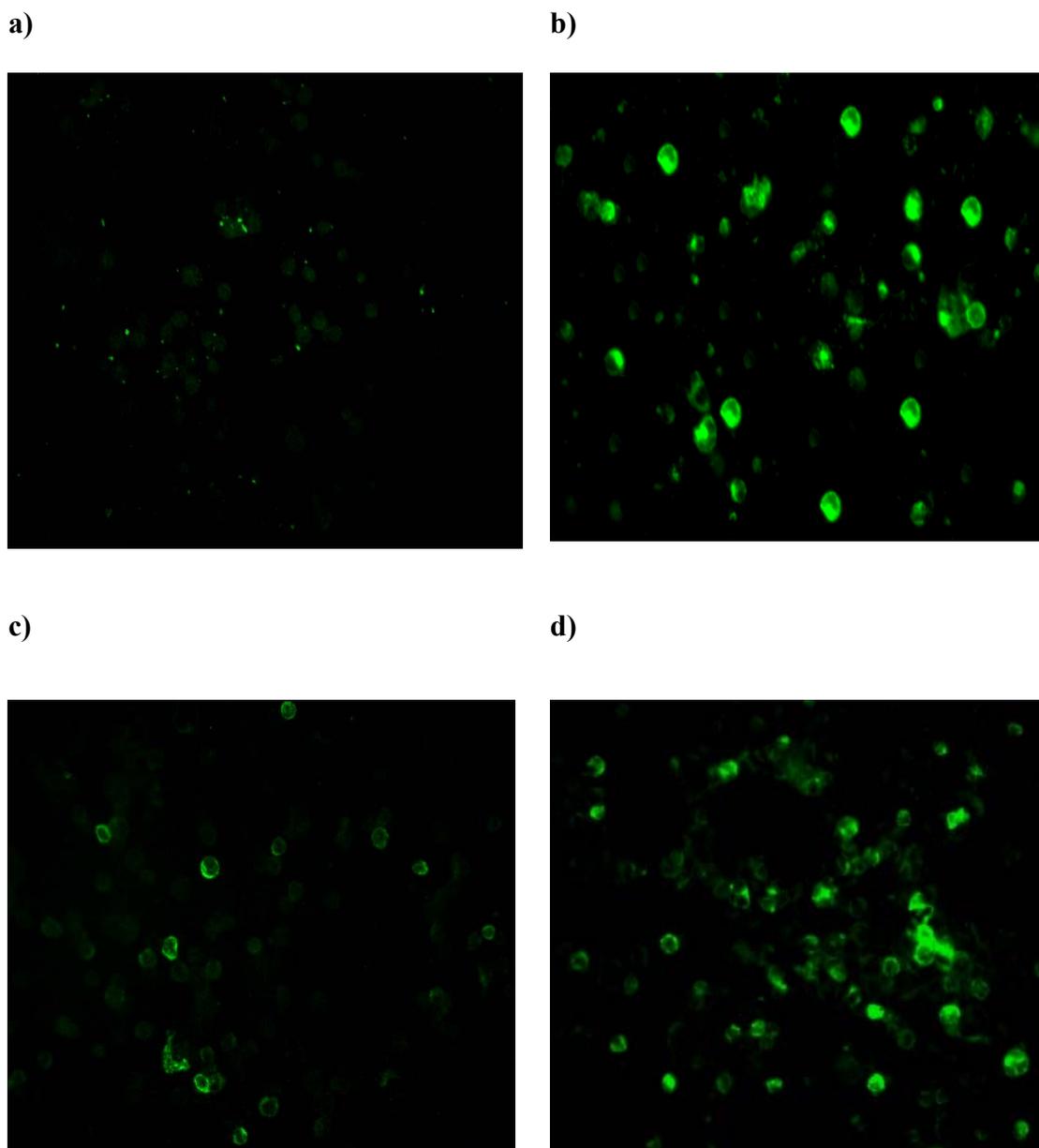
**Figure 13.** Quantification de l'anticorps chimère par ELISA et évaluation de sa pureté. **(gauche)** Courbe étalon pour la détermination de la quantité de protéines dans l'échantillon d'intérêt par la méthode Bradford. **(droite)** Courbe étalon montrant la quantité de IgG humain évaluée par ELISA. Les courbes ont été dessinées avec OriginPro 8.

### 3.3.3 Spécificité de reconnaissance de la gp350 par le 72A1 ch

Afin d'avoir la certitude que la chimère purifiée est capable de reconnaître et de lier *in vitro* sa cible, des essais d'immunofluorescence indirecte ont été réalisés sur les cellules B95-8 traitées avec le TPA pour induire davantage le cycle lytique. Deux préparations d'anticorps ont été utilisées à cette fin. Ces préparations ont constitué respectivement les produits de purification du surnageant avec SFV purifié et non purifié. La fluorescence, présentée dans la figure 14 sous forme d'anneau phosphorescent à la périphérie de la cellule, appuie la capacité de reconnaissance de la protéine cible, en l'occurrence la gp350, par l'anticorps d'intérêt ainsi que sa spécificité. D'après les résultats on remarque que, bien que cette dernière ait été vérifiée pour les deux préparations d'anticorps, la quasi-absence d'immunoglobuline dans le SFV permet de noter une augmentation du nombre de cellules fluorescentes d'environ 50%.

Une titration de l'anticorps chimère a été également réalisée à l'aide d'une immunofluorescence indirecte réalisée dans les mêmes conditions énumérées ci-dessus et en utilisant différentes dilutions du 72A1 ch. Pour les dilutions 1:2 (soit 7.5  $\mu\text{g}$ ), 1:4 (soit 3.75  $\mu\text{g}$ ) et 1:10 (soit 1.5  $\mu\text{g}$ ), le nombre de cellules fluorescentes, témoignant d'une liaison entre la chimère et la gp350, diminue proportionnellement au taux de dilution jusqu'à disparaître complètement lorsque l'anticorps est dilué au 1:20 (soit 0.75  $\mu\text{g}$ ).

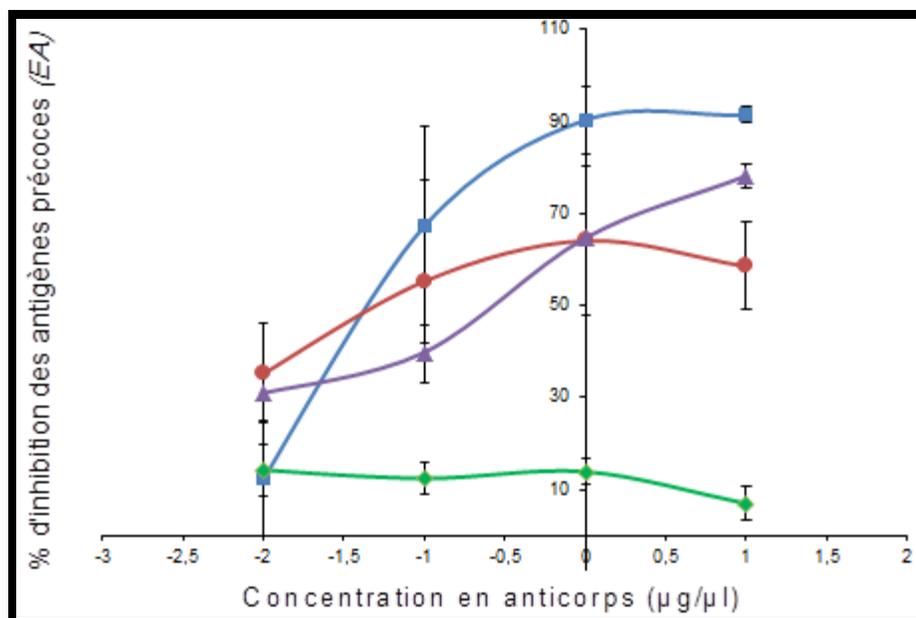
Dans ce cas, les cellules sont semblables au contrôle négatif.



**Figure 14.** Capacité de reconnaissance de la gp350 par le 72A1 ch révélée par immunofluorescence indirecte. **(a)** Cellules B95-8 non induites, avec le 72A1 ch. **(b)** Contrôle positif, cellules B95-8 induites, avec le 72A1 murin. **(c, d)** Fluorescence montrant la spécificité du 72A1 ch avec SFV non filtré (gauche) et du 72A1 ch avec SFV filtré (droite) vis-à-vis de la protéine cible. Le grossissement est de 200 fois.

### 3.3.4 Caractérisation *in vitro* de la capacité neutralisante du 72A1 ch

Des essais de neutralisation de la souche P3HR-1 par le 72A1 ch ont été réalisés par surinfection des cellules Raji. La souche virale P3HR-1 induit l'expression des gènes précoces EA (« *early antigens* ») lors de la surinfection de la lignée lymphomateuse Raji. Ainsi, cet essai fonctionnel permet de mesurer l'inhibition des protéines EA par immunofluorescence tel que décrit dans la section Matériels et Méthodes. Ces essais fonctionnels, tout comme les essais de spécificité, ont été réalisés pour le 72A1 ch produit dans les deux conditions : en présence de SFV filtré et non filtré. Les résultats des essais de neutralisation (figure 15) fournissent la preuve que le 72A1 ch est capable de reconnaître la gp350 et réussit à neutraliser l'infectivité du VEB. On remarque que pour une même quantité d'anticorps, notamment 10 µg, le pourcentage d'inhibition maximal est d'environ 60% en présence d'immunoglobulines d'origine bovine alors qu'il atteint environ 80% en leur absence. Par conséquent, la filtration du SFV a permis d'augmenter ce pourcentage, bien qu'il n'égalise pas celui atteint par notre sérum référence, le 72A1 murin, d'environ 20% (environ 60% en présence de SFV non filtré versus environ 80% en présence de SFV filtré).



**Figure 15.** Essais de neutralisation du VEB par le 72A1 chimère. (▲) 72A1 chimère avec SFV filtré, (●) 72A1 chimère avec SFV non filtré, (□) 72A1 murin (contrôle positif), (◆) S12 anti-LMP-1 (contrôle négatif). Chaque expérience a été réalisée 3 fois. Les courbes ont été dessinées avec OriginPro 8.

## **CHAPITRE QUATRIEME**

### **DISCUSSION**

#### 4.1 Infection aiguë par le VEB : preuve de l'existence d'un état viral lytique

Dans le but de fournir la preuve expérimentale de l'existence d'une phase lytique productive pendant l'infection aiguë des lymphocytes B primaires, une caractérisation de la dynamique de réplication de l'ADN viral du VEB au tout début de l'infection des lymphocytes B a été réalisée. Notre hypothèse fut que l'infection lytique, voire productive, aurait lieu au tout début (lors des premières 96 heures suite à l'infection *in vitro* de la cellule B). Les cellules mononucléées du sang de cordon (CMSCs) ont été utilisées à cette fin à cause de leur grande disponibilité aux chercheurs du Groupe de recherche en transplantation et immunologie du sang de cordon, et parce que le sang de cordon ombilical représente une nouvelle source de cellules souches hématopoïétiques surtout en greffe pédiatrique (38), (175). Selon certains auteurs, le degré de maturité et l'état d'activation immunitaire des CMSCs offrent un système facilement infectable par le VEB (139). Nos résultats ont montré une augmentation de la charge virale à partir de 48h post-infection et qui se stabilise à 96h post-infection (en absence de PAA). Afin de déterminer si l'augmentation est due à une réplication lytique ou latente du génome viral, la culture a été effectuée en présence de PAA à une concentration de 50µg/ml, dose minimale et nécessaire pour bloquer la production de nouveaux virions (176). Dans notre cas, la MOI déterminée par les essais de titration est de 0.5. Du point de vue du mécanisme d'action sur l'expression des différentes classes des gènes lytiques, il a été démontré que le PAA est inactif vis-à-vis (*i*) des antigènes pré-précoces, dont l'expression n'est pas dépendante des protéines virales de novo, (*ii*) des antigènes précoces, dont l'expression n'est pas affectée par les inhibiteurs de la synthèse de l'ADN viral (30). Toutefois, l'effet inhibiteur est exercé sur la réplication de l'ADN viral linéaire et sur les protéines tardives qui sont nécessaires pour la morphogenèse du virus ainsi que

sa libération (177). Nos résultats ont montré qu'une diminution de la charge virale est notée à partir de 48h post-infection qui s'accroît à 72h post-infection. Vu que la différence entre le nombre de copies du génome viral n'atteint pas 0.5 log, il est difficile de conclure avec certitude qu'il y a eu effectivement une inhibition d'ADN viral productif.

Une augmentation importante de la charge virale à 96h post-infection peut être expliquée de différentes façons. Une d'entre elles associe l'accroissement au cycle lytique tandis que l'autre stipule qu'à ce stade de l'infection, l'amplification latente prédomine.

La première considère qu'à partir de 96h post-infection, le PAA n'exerce plus son effet inhibiteur sur la réplication virale ce qui engendrerait une levée de la répression et une reprise du cycle lytique du VEB. Une recherche dans la littérature a permis d'appuyer cette supposition (178). En effet, le PAA est un acide fort formé de 3 groupements ionisables qui sont à l'origine de sa faible activité en culture cellulaire. La présence d'ions rend difficile le transport de ces molécules chargées à travers la membrane cellulaire (178). La deuxième explication suggère fortement que la répression du cycle lytique par le PAA favorise le cycle latent. La circularisation de l'ADN viral requiert 8h à 12h (174). On assiste à une initiation de l'expression des six EBNA ainsi que du LMP avant d'induire l'entrée de la cellule dans la phase S du cycle cellulaire. Au bout de 48h à 72h post-infection, les cellules accomplissent leur première mitose (28). A partir de ce moment, leur nombre double environ chaque 24h et chaque cellule produite contient cinq à dix génomes (sous la forme épisomale) (28). Cette explication semble être plausible étant donné que la chronologie de l'expression des gènes qui permettent l'amplification latente du génome viral concorde parfaitement avec l'évolution de la charge virale obtenue par PCR quantitative (28).

Enfin, toutes ces expériences ont été réalisées avec des cellules mononucléées du sang de cordon ombilical sans aucun enrichissement en cellules B. Ceci avait pour but de se rapprocher le plus possible de ce qui se passe *in vivo*. Toutefois, il serait intéressant de refaire les mêmes expériences en purifiant les lymphocytes B des cellules mononucléées totales pour avoir une réponse plus ciblée.

#### **4.2 Chronologie de l'expression des gènes lytiques**

Les résultats de la quantification de l'ADN viral n'ont pas été déterminants. Ainsi nous avons tenté de résoudre le problème sur l'existence, ou non, d'une phase lytique/productive au début de l'infection de la cellule B via une étude transcriptionnelle. Le suivi de la chronologie de l'expression des gènes lytiques a été réalisé en utilisant les cellules mononucléées de sang périphérique adulte à la place des cellules mononucléées du sang de cordon ombilical étant donné que pour ces dernières nous n'avons eu aucune expression des gènes lytiques détectée par la technique NASBA. Ces résultats sont en conflit avec ceux exposés par Ladell et *al.* qui démontrent que les CMSC infectées *in vitro* par le VEB révèlent un patron d'expression caractérisé par l'expression des gènes codants pour le trans-activateur, BZLF-1 et les glycoprotéines structurales, la gp85 et la gp350. La détection de ces dernières serait un indicateur non pas de l'initiation du cycle lytique mais en réalité une confirmation d'une infection productive (179). La différence au niveau des résultats peut être associée à la technique de détection mise en œuvre. En effet, contrairement à nous, la détection de l'expression des gènes a été réalisée par reverse transcriptase suivie d'une PCR quantitative en temps réel. Dans la présente étude, nous avons opté pour l'utilisation de la NASBA comme méthode de détection de la transcription des gènes candidats vue les multitudes avantages qu'elle présente. En effet,

l'incorporation d'une transcriptase reverse ARN dépendante dans la réaction d'amplification rend cette technique spécifique à l'amplification de l'ARN. De plus, c'est une réaction simple et rapide étant donné que chaque étape peut être amorcée dès que l'intermédiaire d'amplification devient disponible. En outre, la réaction s'effectue en une seule étape et, par ailleurs, permet d'éviter les contaminations avec de l'ADN génomique. Le suivi de l'expression des deux classes de gènes lytiques a permis de révéler que le gène précoce, soit BMRF-1, est exprimé à partir de 24h, alors le gène tardif, BLLF-1, est exprimé à partir de 48h post-infection, atteint un pic à partir de 72h, et diminue graduellement jusqu'à 96h post-infection. On remarque que le pic atteint par le BMRF-1 précède celui du BLLF-1 (figure 9) et témoigne d'une expression chronologique dans le temps des gènes d'intérêts une fois la cascade lytique est amorcée. Les résultats trouvés sont cohérents dans la mesure où l'expression des gènes tardifs (i.e. BLLF-1) est strictement dépendante de l'action des principaux acteurs de la machinerie de répllication de l'ADN viral (i.e. BMRF-1) (30). L'infection des PBMC en présence d'anticorps neutralisant, soit le 72A1 murin, nous a permis d'avoir la certitude que l'évolution observée est spécifique à l'expression des gènes candidats.

Vu que la technique qPCR, avec et sans PAA, n'a pas été déterminante pour distinguer l'infection latente de l'infection lytique, il faudrait considérer d'autres moyens pour faire cette distinction et ainsi seconder les résultats obtenus par NASBA. L'épisome EBV est formé par la fusion covalente des répétitions terminales aux bouts 5' et 3' du génome. Il n'y a pas de séquence unique formée lorsque ces bouts sont fusionnés. Ainsi, il n'est pas possible de distinguer et quantifier le génome linéaire par rapport au génome circulaire à l'aide d'une simple analyse PCR quantitative. Cependant, il y aurait moyen de développer une PCR reverse transcriptase quantitative en mettant en évidence les

transcrits LMP2a/b (180) car ceux-ci traversent le point de jonction des répétitions terminales, c'est-à-dire que le génome EBV doit se circulariser pour que le gène codant pour LMP2a/b puisse être exprimé. Donc cette méthode pourrait être utilisée pour documenter l'apparition de l'épisome lors de l'infection aiguë. La technique de PCR réverse transcriptase quantitative pourrait aussi être utilisée pour vérifier l'expression d'un gène du cycle lytique (ex : BMRF1) (181) et ainsi pouvoir suivre l'apparition du génome linéaire suite à l'infection aiguë.

La résolution de la question de la présence ou non d'une phase lytique productive pendant l'infection aiguë est de première importance vue l'impact clinique qu'elle aura sur la prévention de l'apparition de SLP chez les patients greffés. A ce jour et d'après notre connaissance, aucun consensus n'a été atteint à ce sujet. Les résultats présentant l'aboutissement de nos propres investigations ont renforcé notre conviction du rôle primordial joué par le cycle lytique dans le développement de SLP. On suppose que l'expression des gènes lytiques serait un moyen adopté par le virus pour élargir l'environnement infectieux via l'accroissement du nombre de cellules B infectées dans lesquelles le virus va par la suite établir la latence et amorcer le processus d'immortalisation.

Tandis que toute l'attention était dirigée vers le cycle latent du virus, on a assisté, ces dernières années, à une émergence d'une nouvelle vision qui supporte l'hypothèse de la présence d'une répllication virale productive pendant l'infection aiguë. Ces études ont pour but d'investiguer de plus près la présence, l'origine de cette répllication ainsi que les événements qui la déclenchent. Les avis sont encore controversés quant au moment de l'apparition de cette phase du cycle de vie du VEB. Certains laboratoires soutiennent nos résultats dans la mesure où ils démontrent que la phase productive est précoce, laquelle

est déclenchée dans certaines cellules. Notamment, Rickinson et *al.* ont démontré que les LCL peuvent être générées *in vitro* en deux étapes : la production du virus suivie par une immortalisation des cellules B normales *in vitro* (182) (183). Ces résultats furent appuyés par la suite par Lewin et *al.* (184). Récemment, une étude réalisée par Halder et *al.* a permis de renforcer les suggestions émises par les études précédentes. En effet, ils ont mis en évidence une importante expression de BZLF-1 à partir de 6 heures post-infection, ainsi qu'une expression de l'ADN polymérase BALF5 et de la protéine majeure de la capsid virale BcLF1. L'expression de ces gènes a été à l'origine de la production de nouveaux virions capables d'infecter des PBMC fraîchement isolés (185). La même étude a permis de démontrer que pendant les étapes précoces de l'infection, en plus des transcrits lytiques, on assiste à une expression bien qu'à des niveaux moindres, des transcrits latents tel que démontré précédemment par Alfieri et *al.* (174). Ce qui suggère la présence des deux états viraux avec une prédominance au tout début de l'infection du cycle lytique.

Des résultats publiés par d'autres équipes suggèrent la présence d'une phase répllicative productive mais tardive. Cette suggestion a été argumentée par Kalla et *al.* (163) en considérant le fait que dans le cas où l'expression de BZLF-1 dans les lymphocytes B supporte le cycle productif, ces derniers constitueraient une cible de choix du système immunitaire, qui en éliminant les cellules infectées compromettrait la capacité du VEB à établir la latence et par ailleurs son potentiel de survie dans la cellule hôte. Ils stipulent que la synthèse de virions est une fonction épigénétique de l'ADN du VEB. Selon cette étude, l'expression de BZLF-1 au début de l'infection serait à l'origine de l'initiation ainsi que du maintien de l'infection latente en absence de cycle productif. Selon ces auteurs, la méthylation graduelle de novo du génome virale permettrait à partir de 13

jours post-infection d'amorcer la production de virions qui s'étend jusqu'à 3 mois post-infection (186). Ces résultats ne font qu'appuyer ceux publiés par Sugden et *al.* (187). Une étude par Wen *et al.*, qui aussi postule un rôle de soutien de la latence par l'expression de BZLF-1, a démontré une absence totale et complète de l'expression de BMRF-1, à différents intervalles de temps allant de 2h à 48h post-infection, dans les lymphocytes B primaires, couplée à une expression de BZLF-1 au tout début de l'infection (188). L'explication la plus probable selon eux serait que, dotée d'une capacité lui permettant d'interagir avec la p53 (189), la protéine encodée par BZLF-1 permet de bloquer l'apoptose et par ailleurs d'assurer l'établissement de la latence.

Tous les travaux présentés ci-dessus, incluant les nôtres, analysent cette question *in vitro*. Bien qu'ils utilisent des lymphocytes B primaires en substitution des lignées cellulaires, les conditions de culture peuvent influencer, voire même orienter, l'interaction du VEB avec sa principale cible. Une revue de la littérature a permis de constater une certaine homogénéité dans les conclusions des études réalisées *in vivo* qui supportent l'importance de l'infection lytique productive dans la genèse des SLP. Alfieri et *al.* ont fourni une preuve indirecte qui démontre que l'infection par le VEB acquise par le sang doit passer par une phase lytique productive pour que le virus puisse ensuite se retrouver dans la salive du même patient suite à l'excrétion oropharyngée (190). Rea et *al.*, ont rapporté que 80% des tumeurs B qui apparaissent sous régime immunosuppresseur présentent le virus sous sa forme lytique (191). De plus, l'accroissement de la charge virale dans le plasma de patients greffés et présentant des SLP permet d'appuyer l'existence d'une phase répllicative productive post-greffe (72, 73, 74).

### 4.3 Anticorps 72A1 ch : défi thérapeutique en voie de concrétisation

La production du 72A1 ch a été réalisée en utilisant les cellules CHO étant donné leur très bonne caractérisation et leur capacité à mimer les événements post-traductionnels humains. L'analyse du produit d'éluion, récupéré suite à la purification du surnageant de culture moyennant la protéine A, sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes a révélé la présence de deux bandes correspondant précisément aux chaînes lourdes et légères. De plus, les résultats de l'immunofluorescence réalisée sur la lignée B95-8 préalablement induite par le TPA, ont démontré que l'anticorps 72A1 ch est capable de reconnaître et de d'interagir avec sa principale cible, le gp350. En outre, l'effet de l'anticorps d'intérêt sur le VEB ne se limite pas à la simple reconnaissance et interaction avec son épitope étant donné que les résultats des essais fonctionnels de neutralisation fournissent la preuve que le 72A1 ch est capable de reconnaître la gp350 qui sert de ligand spécifique du récepteur cellulaire CR2. Puisque l'attachement de l'anticorps chimère à son épitope spécifique sur la molécule gp350 bloque l'entrée virale ainsi que l'infectivité du VEB, l'anticorps est dit 'neutralisant'. Les résultats obtenus sont prometteurs et mettent en avant le grand potentiel dont bénéficie l'anticorps élaboré dans notre laboratoire.

Ces essais *in vitro* ont constitué un pré-requis pour démontrer, dans un premier lieu, l'activité biologique de l'anticorps chimère monoclonal anti-gp350 produit dans notre laboratoire et pour réaliser, dans un deuxième temps, une caractérisation *in vivo* à l'aide des essais précliniques chez la souris. Toutefois, plusieurs problèmes ont été rencontrés pendant la réalisation de cette étape du projet qui visait en réalité la mise au point des conditions optimales de production d'un anticorps pur, natif et surtout fonctionnel en quantité suffisante. L'étape clé dans la chaîne de production de l'anticorps qui n'est autre

que l'étape de la purification s'est révélée une étape délicate qui requiert une optimisation minutieuse. En effet, elle nécessite pendant sa mise au point de prendre en considération des conditions dans lesquelles l'anticorps a été produit. En effet, le milieu de culture utilisé pour la culture des cellules CHO contient un supplément de sérum bovin dont la composition exacte est inconnue. Cependant, en dépit de cette ambiguïté, il est évident que le sérum contienne une quantité substantielle d'IgG polyclonaux lesquels peuvent se mélanger et se confondre avec le pool d'anticorps monoclonal chimère d'intérêt lors de la purification (192). En effet, la méthode utilisée prend avantage de l'affinité entre ligands et les épitopes généraux présents au niveau des anticorps. La protéine A de streptocoques utilisée à cette fin contient plusieurs domaines spécifiques aux fragments Fc de l'immunoglobuline qui sont incapables de différencier les IgG en fonction de leur origine (bovine ou humaine) (193, 194).

De plus, un autre point peut être soulevé concernant la troisième bande présente dans tous les gels et qui correspond à la BSA. La présence de cette bande n'a pas constitué une surprise étant donné la structure de la protéine A qui permet de fixer la BSA pendant le processus de purification. Dans notre cas, la présence de contaminants a interféré avec le processus de purification (195). Par ailleurs, la fraction éluée était en réalité un mélange hétérogène d'immunoglobulines, ce qui ne faisait guère partie de nos principaux objectifs. L'incidence de cette interférence s'est manifestée à différents niveaux. Dans les conditions de culture utilisées, la variante des cellules CHO (CHO-K1) utilisée ne permet de produire des quantités importantes de l'anticorps chimère. Le fait que les IgG bovines entrent en compétition avec les IgG chimères pour la liaison avec la matrice (dans notre cas, la protéine A) rend davantage plus faible la quantité du 72A1 ch dans l'éluat, lequel a été utilisé pour des analyses subséquentes. Ces dernières incluaient les essais

d'immunofluorescence ainsi que les essais de neutralisation. Les résultats obtenus dans les deux cas étaient moindres que ceux notés pour le 72A1 murin utilisé comme contrôle positif bien que la région variable reconnaissant l'épitope est la même pour les deux anticorps. En effet, l'intensité de fluorescence était moindre et le pourcentage d'inhibition de l'infection atteignait un maximum de 60% comparé à environ 95% pour le 72A1 murin (figure 15). Ceci nous a mené, au début, à émettre l'hypothèse que la chimérisation pourrait avoir un effet sur la conformation du site de liaison de la gp350 qui par conséquent lie moins bien sa cible. Une analyse bioinformatique de la structure tridimensionnelle des composantes mises en jeu pendant l'interaction est en cours de réalisation. Entre temps, une réévaluation des conditions de culture nous a incité à refaire les mêmes expériences mais, dans ce cas, en utilisant un anticorps purifié à partir d'un surnageant de culture produit en présence de SFV ayant des teneurs ultra faibles d'immunoglobulines (inférieur à 5 µg/ml). On a opté pour cette alternative compte tenu du fait que l'élaboration d'un milieu de culture exempt de sérum dont la composition chimique est bien définie requiert beaucoup de temps (196). Ces nouvelles conditions de culture ont permis d'améliorer grandement l'intensité de la fluorescence ainsi que la capacité de neutralisation de l'infection perçue à travers l'accroissement de l'inhibition de l'expression des antigènes précoces qui est passée de 60% à 80% (figure 15). Toutefois, bien qu'il soit augmenté, le taux d'inhibition n'égalise pas celui obtenu pour notre référence, le 72A1 murin. On soupçonne que pendant les essais de neutralisation on assiste à l'intervention d'un mécanisme qui rend moins efficace les anticorps chimères. En effet, les cellules utilisées pour les essais de neutralisation sont les Raji qui expriment

à leur surface des récepteurs pour la région Fc des immunoglobulines G humaines (167), permettant éventuellement une entrée potentielle du virus via son attachement aux molécules d'anticorps.

Étant donné qu'à ce stade de l'étude les résultats de caractérisation *in vitro* semblent être prometteurs, une étude de la capacité de notre chimère à reconnaître *in vivo* chez la souris sa cible, la gp350, et à prévenir l'apparition de SLP s'impose. Pour ce faire, des souris femelles BALB/C âgées de 4 à 6 semaines seront utilisées. Le protocole animal consiste en une injection intra-péritonéale dans les souris de cellules tumorales dérivées de la lignée P3HR-1. Après 24h, les souris recevront une injection par voie péritonéale d'une seule dose de l'anticorps d'intérêt dépendamment du groupe traité. Dans un premier temps, les essais précliniques auront pour principal objectif de vérifier la capacité de la chimère à reconnaître *in vivo* sa cible, la gp350. Par ailleurs une incubation de 6h serait suffisante pour observer cet effet. Les souris seront euthanasiées au CO<sub>2</sub> et les cellules prélevées seront soumises à une analyse par cytométrie en flux. Une étude de caractérisation similaire a été réalisée par Haque et *al.* (158) pour le 72A1 murin. Les essais ont été effectués dans un premier temps chez les souris SCID et ont abouti à des résultats prometteurs dans la mesure où aucune des douze souris n'a développé de tumeurs comparées au groupe contrôle dans lequel huit souris sur douze ont présenté des tumeurs causées par le virus. Ces expériences ont donné suite à un essai pilote réalisé sur des adultes en santé, puis sur 4 enfants séronégatifs recevant une greffe du foie provenant de donneurs séropositifs pour le VEB. Bien qu'aucun enfant n'a développé de SLP, une forte réponse HAMA a été notée (158). De ce fait s'impose le besoin de passer par l'étape de chimérisation de l'anticorps avant de pouvoir l'utiliser chez l'humain.

#### **4.4. Conclusions et Perspectives**

Le présent projet visait, dans un premier temps, à fournir la preuve de l'existence d'une phase lytique productive pendant l'infection VEB aiguë, qui jouerait un rôle primordial dans le développement des SLP en engendrant une concentration élevée de cellules B infectées par les virions néo-produits. Notre étude des événements qui se déroulent au tout début de l'infection par le VEB tant au niveau de la réplication de l'ADN viral par PCR quantitatif et, de façon plus convaincante, au niveau de l'expression d'un gène lytique précoce, BMRF-1, et d'un gène lytique tardif, BLLF-1, a permis de confirmer l'existence d'une réplication productive pendant l'infection aiguë.

Les résultats obtenus justifient l'intérêt de notre laboratoire à poursuivre le développement d'un anticorps chimère anti-gp350, avec capacité de neutralisation, comme traitement prophylactique permettant de prévenir la genèse du syndrome lymphoprolifératif causé par le VEB chez les patients greffés à risque. En présence d'une néo-infection par le VEB ou une réactivation du virus post-greffe, l'anticorps agirait en diminuant considérablement la quantité de cellules infectées qui pourraient s'engager dans le processus d'oncogenèse.

Les premières analyses de caractérisation *in vitro* effectués avec l'anticorps chimère incluant les essais de neutralisation ainsi que de spécificité vis à vis de la glycoprotéine cible, la gp350, ont constitué une partie majeure de ce mémoire et se sont avérées prometteuses. Ultérieurement, l'anticorps ferait l'objet d'une caractérisation fonctionnelle

par l'analyse de cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCC). Des essais de caractérisation *in vivo*, incluant la biodistribution de l'anticorps, sa toxicité, ainsi que sa capacité de reconnaissance de la gp350 chez la souris, permettraient de déterminer sa demi-vie dans le sang de l'animal, sa toxicité, ainsi que sa capacité à reconnaître et à fixer sa principale cible.

Finalement, la réalisation des essais cliniques de phase I chez l'humain est conditionnée par les résultats du test ultime de caractérisation qui permettrait d'évaluer la capacité de l'anticorps chimère à prévenir le développement de tumeurs chez la souris immunodéprimée SCID ayant préalablement reçus une injection de cellules immortalisées par le VEB. Ces essais permettraient de confirmer la validité du point de vue utilisation clinique de la nouvelle alternative thérapeutique qu'on propose.

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. Thompson MP & Kurzrock R (2004) Epstein-Barr virus and cancer. *Clin Cancer Res* 10(3):803-821.
2. Swaminathan S (2003) Molecular biology of Epstein-Barr virus and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Semin Hematol* 40(2):107-115.
3. Epstein MA, Achong BG, & Barr YM (1964) Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* 1(7335):702-703.
4. Epstein MA & Barr YM (1964) Cultivation in vitro of human lymphoblasts from Burkitt's Malignant Lymphoma. *Lancet* 1(7327):252-253.
5. Burkitt D & O'Connor GT (1961) Malignant lymphoma in African children. I. A clinical syndrome. *Cancer* 14:258-269.
6. Jones JF, *et al.* (1988) T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infections. *N Engl J Med* 318(12):733-741.
7. Rezk SA & Weiss LM (2007) Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders. *Human pathology* 38(9):1293-1304.
8. Kutok JL & Wang F (2006) Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol* 1:375-404.
9. Chang CM, Yu KJ, Mbulaiteye SM, Hildesheim A, & Bhatia K (2009) The extent of genetic diversity of Epstein-Barr virus and its geographic and disease patterns: a need for reappraisal. *Virus Res* 143(2):209-221.
10. Bray F, *et al.* (2008) Age-incidence curves of nasopharyngeal carcinoma worldwide: bimodality in low-risk populations and aetiological implications. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17(9):2356-2365.
11. Chang ET & Adami HO (2006) The enigmatic epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15(10):1765-1777.
12. Orem J, Mbidde EK, Lambert B, de Sanjose S, & Weiderpass E (2007) Burkitt's lymphoma in Africa, a review of the epidemiology and etiology. *Afr Health Sci* 7(3):166-175.
13. Mbulaiteye SM, Biggar RJ, Bhatia K, Linet MS, & Devesa SS (2009) Sporadic childhood Burkitt lymphoma incidence in the United States during 1992-2005. *Pediatr Blood Cancer* 53(3):366-370.
14. Dinand V & Arya LS (2006) Epidemiology of childhood Hodgkins disease: is it different in developing countries? (Translated from eng) *Indian Pediatr* 43(2):141-147.
15. Hardie DR (2010) Human gamma-herpesviruses: a review of 2 divergent paths to oncogenesis. *Transfus Apher Sci* 42(2):177-183.
16. Torkildsen O, Nyland H, Myrnel H, & Myhr KM (2008) Epstein-Barr virus reactivation and multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 15(1):106-108.
17. Lerner AM, Beqaj SH, Deeter RG, & Fitzgerald JT (2007) Valacyclovir treatment in Epstein-Barr virus subset chronic fatigue syndrome: thirty-six months follow-up. *In vivo (Athens, Greece)* 21(5):707-713.
18. Harley JB, Harley IT, Guthridge JM, & James JA (2006) The curiously suspicious: a role for Epstein-Barr virus in lupus. *Lupus* 15(11):768-777.
19. Rickinson A (2002) Epstein-Barr virus. *Virus Res* 82(1-2):109-113.
20. Henle G, Henle W, & Diehl V (1968) Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 59(1):94-101.
21. Shannon-Lowe CD, Neuhierl B, Baldwin G, Rickinson AB, & Delecluse HJ (2006) Resting B cells as a transfer vehicle for Epstein-Barr virus infection of epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(18):7065-7070.
22. Fingerroth JD, *et al.* (1984) Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(14):4510-4514.

23. Thorley-Lawson DA & Geilinger K (1980) Monoclonal antibodies against the major glycoprotein (gp350/220) of Epstein-Barr virus neutralize infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(9):5307-5311.
24. Nemerow GR, Mold C, Schwend VK, Tollefson V, & Cooper NR (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(5):1416-1420.
25. Borza CM & Hutt-Fletcher LM (2002) Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nat Med* 8(6):594-599.
26. Hutt-Fletcher LM (2007) Epstein-Barr virus entry. *J Virol* 81(15):7825-7832.
27. Thorley-Lawson DA & Gross A (2004) Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *The New England journal of medicine* 350(13):1328-1337.
28. Li QX, *et al.* (1992) Epstein-Barr virus infection and replication in a human epithelial cell system. *Nature* 356(6367):347-350.
29. Preiksaitis JK (2004) New developments in the diagnosis and management of posttransplantation lymphoproliferative disorders in solid organ transplant recipients. *Clin Infect Dis* 39(7):1016-1023.
30. Hislop AD, Taylor GS, Sauce D, & Rickinson AB (2007) Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annu Rev Immunol* 25:587-617.
31. Callan MFC (2004) The immune response to Epstein-Barr virus. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 6(10):937-945.
32. Paludan C, *et al.* (2005) Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science* 307(5709):593-596.
33. Lee DY & Sugden B (2008) The latent membrane protein 1 oncogene modifies B-cell physiology by regulating autophagy. *Oncogene* 27(20):2833-2842.
34. Lam N, Sandberg ML, & Sugden B (2004) High physiological levels of LMP1 result in phosphorylation of eIF2 alpha in Epstein-Barr virus-infected cells. *J Virol* 78(4):1657-1664.
35. Lim WH, Russ GR, & Coates PT (2006) Review of Epstein-Barr virus and post-transplant lymphoproliferative disorder post-solid organ transplantation. *Nephrology (Carlton)* 11(4):355-366.
36. Leblond V, *et al.* (1995) Lymphoproliferative disorders after organ transplantation: a report of 24 cases observed in a single center. *J Clin Oncol* 13(4):961-968.
37. Lim WH, Russ GR, & Coates PT (2006) Review of Epstein-Barr virus and post-transplant lymphoproliferative disorder post-solid organ transplantation. *Nephrology (Carlton)* 11(4):355-366.
38. Gong JZ, *et al.* (2006) Posttransplant lymphoproliferative disorder after umbilical cord blood transplantation in children. *Am J Surg Pathol* 30(3):328-336.
39. Green M (2001) Management of Epstein-Barr virus-induced post-transplant lymphoproliferative disease in recipients of solid organ transplantation. *Am J Transplant* 1(2):103-108.
40. Gulley ML & Tang W (2008) Laboratory assays for Epstein-Barr virus-related disease. *J Mol Diagn* 10(4):279-292.
41. Khedmat H & Taheri S (2009) Early onset post transplantation lymphoproliferative disorders: analysis of international data from 5 studies. *Ann Transplant* 14(3):74-77.
42. Khedmat H & Taheri S (2009) Late onset post transplantation lymphoproliferative disorders: analysis of international data from 5 studies. *Ann Transplant* 14(4):80-85.

43. Takakuwa T, *et al.* (2008) Cell origin of pyothorax-associated lymphoma: a lymphoma strongly associated with Epstein-Barr virus infection. *Leukemia* 22(3):620-627.
44. Gulley ML & Tang W (2010) Using Epstein-Barr viral load assays to diagnose, monitor, and prevent posttransplant lymphoproliferative disorder. *Clin Microbiol Rev* 23(2):350-366.
45. Matsukura T, *et al.* (2002) Significance of serial real-time PCR monitoring of EBV genome load in living donor liver transplantation. *Clin Transplant* 16(2):107-112.
46. Opelz G & Dohler B (2004) Lymphomas after solid organ transplantation: a collaborative transplant study report. *Am J Transplant* 4(2):222-230.
47. Smith TF, *et al.* (2007) Quantitative real-time polymerase chain reaction for evaluating DNAemia due to cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, and BK virus in solid-organ transplant recipients. *Clin Infect Dis* 45(8):1056-1061.
48. Kimura H, Ito Y, Suzuki R, & Nishiyama Y (2008) Measuring Epstein-Barr virus (EBV) load: the significance and application for each EBV-associated disease. *Rev Med Virol* 18(5):305-319.
49. Young LS & Rickinson AB (2004) Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 4(10):757-768.
50. Humme S, *et al.* (2003) The EBV nuclear antigen 1 (EBNA1) enhances B cell immortalization several thousandfold. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(19):10989-10994.
51. Voo KS, *et al.* (2004) Evidence for the presentation of major histocompatibility complex class I-restricted Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 peptides to CD8+ T lymphocytes. *J Exp Med* 199(4):459-470.
52. Lee SP, *et al.* (2004) CD8 T cell recognition of endogenously expressed Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *J Exp Med* 199(10):1409-1420.
53. Tellam J, *et al.* (2004) Endogenous presentation of CD8+ T cell epitopes from Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 1. *J Exp Med* 199(10):1421-1431.
54. Gahn TA & Sugden B (1995) An EBNA-1-dependent enhancer acts from a distance of 10 kilobase pairs to increase expression of the Epstein-Barr virus LMP gene. *J Virol* 69(4):2633-2636.
55. Saridakis V, *et al.* (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(1):25-36.
56. Grossman SR, Johannsen E, Tong X, Yalamanchili R, & Kieff E (1994) The Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivator is directed to response elements by the J kappa recombination signal binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(16):7568-7572.
57. Chen A, Divisconte M, Jiang X, Quink C, & Wang F (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(7):4506-4509.
58. Tomkinson B, Robertson E, & Kieff E (1993) Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* 67(4):2014-2025.
59. Radkov SA, *et al.* (1999) Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C interacts with histone deacetylase to repress transcription. *J Virol* 73(7):5688-5697.
60. Harada S & Kieff E (1997) Epstein-Barr virus nuclear protein LP stimulates EBNA-2 acidic domain-mediated transcriptional activation. *J Virol* 71(9):6611-6618.
61. Li HP & Chang YS (2003) Epstein-Barr virus latent membrane protein 1: structure and functions. *J Biomed Sci* 10(5):490-504.

62. Izumi KM & Kieff ED (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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(23):12592-12597.
63. Eliopoulos AG & Young LS (1998) Activation of the cJun N-terminal kinase (JNK) pathway by the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1). *Oncogene* 16(13):1731-1742.
64. Gires O, *et al.* (1997) Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *The EMBO journal* 16(20):6131-6140.
65. Dharnidharka VR & Araya CE (2009) Post-transplant lymphoproliferative disease. *Pediatr Nephrol* 24(4):731-736.
66. Guasparri I, Bubman D, & Cesarman E (2008) EBV LMP2A affects LMP1-mediated NF-kappaB signaling and survival of lymphoma cells by regulating TRAF2 expression. *Blood* 111(7):3813-3820.
67. Merchant M, *et al.* (2001) The effects of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A on B cell function. *Int Rev Immunol* 20(6):805-835.
68. Cohen JI (2000) Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med* 343(7):481-492.
69. Montone KT, *et al.* (1996) Identification of Epstein-Barr virus lytic activity in post-transplantation lymphoproliferative disease. *Mod Pathol* 9(6):621-630.
70. Hornef MW, *et al.* (1995) Coincidence of Epstein-Barr virus reactivation, cytomegalovirus infection, and rejection episodes in renal transplant recipients. *Transplantation* 60(5):474-480.
71. Rea D, *et al.* (1994) Patterns of Epstein-Barr virus latent and replicative gene expression in Epstein-Barr virus B cell lymphoproliferative disorders after organ transplantation. *Transplantation* 58(3):317-324.
72. Wood VH, *et al.* (2007) Epstein-Barr virus-encoded EBNA1 regulates cellular gene transcription and modulates the STAT1 and TGFbeta signaling pathways. *Oncogene* 26(28):4135-4147.
73. Lei KI, Chan LY, Chan WY, Johnson PJ, & Lo YM (2000) Quantitative analysis of circulating cell-free Epstein-Barr virus (EBV) DNA levels in patients with EBV-associated lymphoid malignancies. *Br J Haematol* 111(1):239-246.
74. Limaye AP, Huang ML, Atienza EE, Ferrenberg JM, & Corey L (1999) Detection of Epstein-Barr virus DNA in sera from transplant recipients with lymphoproliferative disorders. *J Clin Microbiol* 37(4):1113-1116.
75. Sherritt MA, *et al.* (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(9):1556-1560.
76. Rowe M, *et al.* (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(1):147-158.
77. Veronese ML, *et al.* (1994) Properties of tumors arising in SCID mice injected with PBMC from EBV-positive donors. *Leukemia* 8 Suppl 1:S214-217.
78. Hong GK, *et al.* (2005) Epstein-Barr virus lytic infection contributes to lymphoproliferative disease in a SCID mouse model. *J Virol* 79(22):13993-14003.
79. Rochford R & Mosier DE (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(1):150-155.

80. Steven NM, *et al.* (1997) Immediate early and early lytic cycle proteins are frequent targets of the Epstein-Barr virus-induced cytotoxic T cell response. *J Exp Med* 185(9):1605-1617.
81. Mogensen TH & Paludan SR (2001) Molecular pathways in virus-induced cytokine production. *Microbiol Mol Biol Rev* 65(1):131-150.
82. Prang NS, *et al.* (1997) Lytic replication of Epstein-Barr virus in the peripheral blood: analysis of viral gene expression in B lymphocytes during infectious mononucleosis and in the normal carrier state. *Blood* 89(5):1665-1677.
83. Pallesen G, Sandvej K, Hamilton-Dutoit SJ, Rowe M, & Young LS (1991) Activation of Epstein-Barr virus replication in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Blood* 78(5):1162-1165.
84. Hsu M, *et al.* (2008) Epstein-Barr virus lytic transactivator Zta enhances chemotactic activity through induction of interleukin-8 in nasopharyngeal carcinoma cells. *J Virol* 82(7):3679-3688.
85. Mahot S, Sergeant A, Drouet E, & Gruffat H (2003) A novel function for the Epstein-Barr virus transcription factor EB1/Zta: induction of transcription of the hIL-10 gene. *J Gen Virol* 84(Pt 4):965-974.
86. Stuart AD, Stewart JP, Arrand JR, & Mackett M (1995) The Epstein-Barr virus encoded cytokine viral interleukin-10 enhances transformation of human B lymphocytes. *Oncogene* 11(9):1711-1719.
87. Tosato G, Tanner J, Jones KD, Revel M, & Pike SE (1990) Identification of interleukin-6 as an autocrine growth factor for Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *J Virol* 64(6):3033-3041.
88. Tsai SC, *et al.* (2009) EBV Zta protein induces the expression of interleukin-13, promoting the proliferation of EBV-infected B cells and lymphoblastoid cell lines. *Blood* 114(1):109-118.
89. Hong GK, *et al.* (2005) Epstein-Barr virus lytic infection is required for efficient production of the angiogenesis factor vascular endothelial growth factor in lymphoblastoid cell lines. *J Virol* 79(22):13984-13992.
90. Mauser A, Holley-Guthrie E, Simpson D, Kaufmann W, & Kenney S (2002) The Epstein-Barr virus immediate-early protein BZLF1 induces both a G(2) and a mitotic block. *J Virol* 76(19):10030-10037.
91. Henderson S, *et al.* (1993) Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(18):8479-8483.
92. Savoie A, Perpete C, Carpentier L, Joncas J, & Alfieri C (1994) Direct correlation between the load of Epstein-Barr virus-infected lymphocytes in the peripheral blood of pediatric transplant patients and risk of lymphoproliferative disease. *Blood* 83(9):2715-2722.
93. Riddler SA, Breinig MC, & McKnight JL (1994) Increased levels of circulating Epstein-Barr virus (EBV)-infected lymphocytes and decreased EBV nuclear antigen antibody responses are associated with the development of posttransplant lymphoproliferative disease in solid-organ transplant recipients. *Blood* 84(3):972-984.
94. Green M, *et al.* (1998) Serial measurement of Epstein-Barr viral load in peripheral blood in pediatric liver transplant recipients during treatment for posttransplant lymphoproliferative disease. *Transplantation* 66(12):1641-1644.
95. Hoshino Y, *et al.* (2001) Prospective monitoring of the Epstein-Barr virus DNA by a real-time quantitative polymerase chain reaction after allogenic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 115(1):105-111.

96. Yang J, *et al.* (2000) Characterization of Epstein-Barr virus-infected B cells in patients with posttransplantation lymphoproliferative disease: disappearance after rituximab therapy does not predict clinical response. *Blood* 96(13):4055-4063.
97. Cesaro S, *et al.* (2005) The real-time polymerase chain reaction-guided modulation of immunosuppression enables the pre-emptive management of Epstein-Barr virus reactivation after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 128(2):224-233.
98. Holmes RD, *et al.* (2002) Response of elevated Epstein-Barr virus DNA levels to therapeutic changes in pediatric liver transplant patients: 56-month follow up and outcome. *Transplantation* 74(3):367-372.
99. Preiksaitis JK, *et al.* (2009) Interlaboratory comparison of Epstein-Barr virus viral load assays. *Am J Transplant* 9(2):269-279.
100. Rooney CM, *et al.* (1995) Early identification of Epstein-Barr virus-associated post-transplantation lymphoproliferative disease. *Br J Haematol* 89(1):98-103.
101. van Esser JW, *et al.* (2001) Epstein-Barr virus (EBV) reactivation is a frequent event after allogeneic stem cell transplantation (SCT) and quantitatively predicts EBV-lymphoproliferative disease following T-cell-depleted SCT. *Blood* 98(4):972-978.
102. Wagner HJ, *et al.* (2001) Patients at risk for development of posttransplant lymphoproliferative disorder: plasma versus peripheral blood mononuclear cells as material for quantification of Epstein-Barr viral load by using real-time quantitative polymerase chain reaction. *Transplantation* 72(6):1012-1019.
103. Aalto SM, *et al.* (2007) Epstein-Barr viral load and disease prediction in a large cohort of allogeneic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 45(10):1305-1309.
104. Stevens SJ, *et al.* (2001) Frequent monitoring of Epstein-Barr virus DNA load in unfractionated whole blood is essential for early detection of posttransplant lymphoproliferative disease in high-risk patients. *Blood* 97(5):1165-1171.
105. Wadowsky RM, Laus S, Green M, Webber SA, & Rowe D (2003) Measurement of Epstein-Barr virus DNA loads in whole blood and plasma by TaqMan PCR and in peripheral blood lymphocytes by competitive PCR. *J Clin Microbiol* 41(11):5245-5249.
106. Bakker NA, *et al.* (2008) Quantification of Epstein-Barr virus-DNA load in lung transplant recipients: a comparison of plasma versus whole blood. *J Heart Lung Transplant* 27(1):7-10.
107. Rowe DT, Webber S, Schauer EM, Reyes J, & Green M (2001) Epstein-Barr virus load monitoring: its role in the prevention and management of post-transplant lymphoproliferative disease. *Transpl Infect Dis* 3(2):79-87.
108. Wagner HJ, *et al.* (2002) Longitudinal analysis of Epstein-Barr viral load in plasma and peripheral blood mononuclear cells of transplanted patients by real-time polymerase chain reaction. *Transplantation* 74(5):656-664.
109. Schubert S, *et al.* (2009) Diagnosis and treatment of post-transplantation lymphoproliferative disorder in pediatric heart transplant patients. *Pediatr Transplant* 13(1):54-62.
110. Middeldorp JM, Brink AA, van den Brule AJ, & Meijer CJ (2003) Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders. *Crit Rev Oncol Hematol* 45(1):1-36.
111. Carpentier L, Tapiero B, Alvarez F, Viau C, & Alfieri C (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(12):1853-1864.

112. Heslop HE, *et al.* (2010) Long-term outcome of EBV-specific T-cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients. *Blood* 115(5):925-935.
113. Heslop HE, Savoldo B, & Rooney CM (2004) Cellular therapy of Epstein-Barr-virus-associated post-transplant lymphoproliferative disease. *Best Pract Res Clin Haematol* 17(3):401-413.
114. Smith CA, *et al.* (1995) Production of genetically modified Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T cells for adoptive transfer to patients at high risk of EBV-associated lymphoproliferative disease. *J Hematother* 4(2):73-79.
115. Swinnen LJ (2006) Immune-cell treatment of Epstein-Barr-virus-associated lymphoproliferative disorders. *Best Pract Res Clin Haematol* 19(4):839-847.
116. Savoldo B, *et al.* (2002) Autologous Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T cells for the treatment of persistent active EBV infection. *Blood* 100(12):4059-4066.
117. Comoli P, *et al.* (2002) Infusion of autologous Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T cells for prevention of EBV-related lymphoproliferative disorder in solid organ transplant recipients with evidence of active virus replication. *Blood* 99(7):2592-2598.
118. Haque T, *et al.* (1998) Reconstitution of EBV-specific T cell immunity in solid organ transplant recipients. *J Immunol* 160(12):6204-6209.
119. Davis JE & Moss DJ (2004) Treatment options for post-transplant lymphoproliferative disorder and other Epstein-Barr virus-associated malignancies. *Tissue Antigens* 63(4):285-292.
120. Khanna R, *et al.* (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(18):10391-10396.
121. Dharnidharka VR & Araya CE (2007) Post-transplant lymphoproliferative disease. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* [Epub ahead of print].
122. Wilkie GM, *et al.* (2004) Establishment and characterization of a bank of cytotoxic T lymphocytes for immunotherapy of Epstein-Barr virus-associated diseases. *J Immunother* 27(4):309-316.
123. Haque T, *et al.* (2007) Allogeneic cytotoxic T-cell therapy for EBV-positive posttransplantation lymphoproliferative disease: results of a phase 2 multicenter clinical trial. *Blood* 110(4):1123-1131.
124. Reff ME, *et al.* (1994) Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 83(2):435-445.
125. Bello C & Sotomayor EM (2007) Monoclonal antibodies for B-cell lymphomas: rituximab and beyond. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*:233-242.
126. Field AK, *et al.* (1983) 9-([2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy]methyl)guanine: a selective inhibitor of herpes group virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(13):4139-4143.
127. McDiarmid SV, *et al.* (1998) Prevention and preemptive therapy of posttransplant lymphoproliferative disease in pediatric liver recipients. *Transplantation* 66(12):1604-1611.
128. Malouf MA, *et al.* (2002) Anti-viral prophylaxis reduces the incidence of lymphoproliferative disease in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 21(5):547-554.
129. Darenkov IA, *et al.* (1997) Reduced incidence of Epstein-Barr virus-associated posttransplant lymphoproliferative disorder using preemptive antiviral therapy. *Transplantation* 64(6):848-852.

130. Green M, Kaufmann M, Wilson J, & Reyes J (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(6):1344-1349.
131. Keever-Taylor CA, et al. (2003) Suppression of EBV release from irradiated B lymphoblastoid cell-lines: superior activity of ganciclovir compared with acyclovir. *Cytotherapy* 5(4):323-335.
132. Aris RM, et al. (1996) Post-transplantation lymphoproliferative disorder in the Epstein-Barr virus-naive lung transplant recipient. *Am J Respir Crit Care Med* 154(6 Pt 1):1712-1717.
133. Kuo PC, Dafoe DC, Alfrey EJ, Sibley RK, & Scandling JD (1995) Posttransplant lymphoproliferative disorders and Epstein-Barr virus prophylaxis. *Transplantation* 59(1):135-138.
134. Nowalk AJ & Green M (2010) Epstein-Barr virus-associated posttransplant lymphoproliferative disorder: Strategies for prevention and cure. *Liver Transpl* 16(S2):S54-S59.
135. Humar A, et al. (2006) A randomized trial of ganciclovir versus ganciclovir plus immune globulin for prophylaxis against Epstein-Barr virus related posttransplant lymphoproliferative disorder. *Transplantation* 81(6):856-861.
136. DiNardo CD & Tsai DE (2010) Treatment advances in posttransplant lymphoproliferative disease. *Curr Opin Hematol* 17(4):368-374.
137. Perrine SP, et al. (2007) A phase 1/2 trial of arginine butyrate and ganciclovir in patients with Epstein-Barr virus-associated lymphoid malignancies. *Blood* 109(6):2571-2578.
138. Green M, Reyes J, Webber S, & Rowe D (2001) The role of antiviral and immunoglobulin therapy in the prevention of Epstein-Barr virus infection and post-transplant lymphoproliferative disease following solid organ transplantation. *Transpl Infect Dis* 3(2):97-103.
139. Law M & Hangartner L (2008) Antibodies against viruses: passive and active immunization. *Curr Opin Immunol* 20(4):486-492.
140. Burton DR (2002) Antibodies, viruses and vaccines. *Nat Rev Immunol* 2(9):706-713.
141. Spear PG & Longnecker R (2003) Herpesvirus entry: an update. *J Virol* 77(19):10179-10185.
142. Kirschner AN, Omerovic J, Popov B, Longnecker R, & Jardetzky TS (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(19):9444-9454.
143. Peeters B, de Wind N, Broer R, Gielkens A, & Moormann R (1992) Glycoprotein H of pseudorabies virus is essential for entry and cell-to-cell spread of the virus. *J Virol* 66(6):3888-3892.
144. Liu DX, Gompels UA, Foa-Tomasi L, & Campadelli-Fiume G (1993) Human herpesvirus-6 glycoprotein H and L homologs are components of the gp100 complex and the gH external domain is the target for neutralizing monoclonal antibodies. *Virology* 197(1):12-22.
145. Liu DX, Gompels UA, Nicholas J, & Lelliott C (1993) Identification and expression of the human herpesvirus 6 glycoprotein H and interaction with an accessory 40K glycoprotein. *J Gen Virol* 74 ( Pt 9):1847-1857.
146. Janz A, et al. (2000) Infectious Epstein-Barr virus lacking major glycoprotein BLLF1 (gp350/220) demonstrates the existence of additional viral ligands. *J Virol* 74(21):10142-10152.

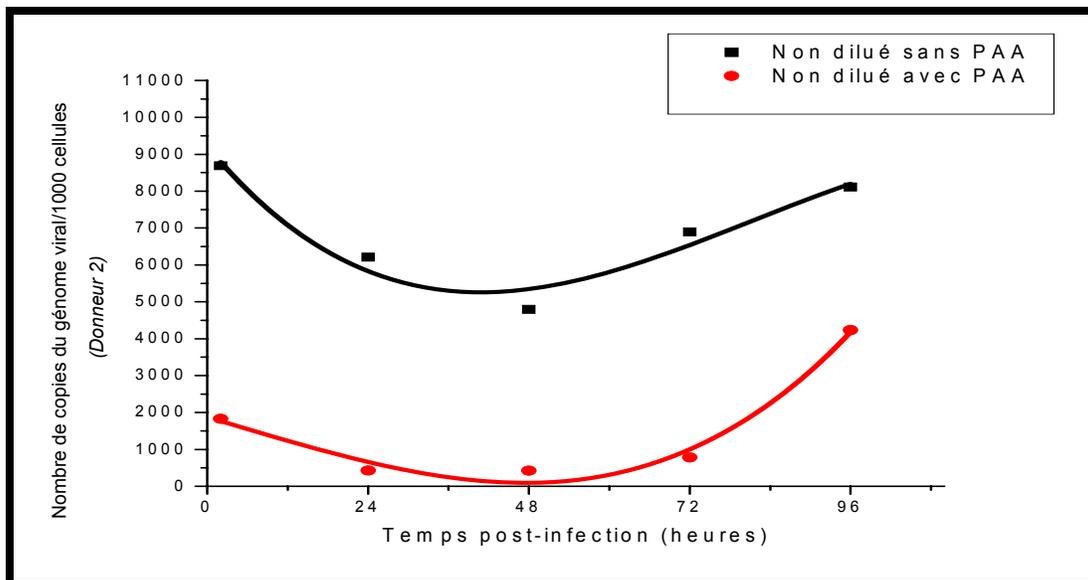
147. Beisel C, *et al.* (1985) Two major outer envelope glycoproteins of Epstein-Barr virus are encoded by the same gene. *J Virol* 54(3):665-674.
148. Tanner J, Whang Y, Sample J, Sears A, & Kieff E (1988) Soluble gp350/220 and deletion mutant glycoproteins block Epstein-Barr virus adsorption to lymphocytes. *J Virol* 62(12):4452-4464.
149. Szakonyi G, *et al.* (2006) Structure of the Epstein-Barr virus major envelope glycoprotein. *Nature Structural and Molecular Biology* 13(11):996-1001.
150. Wei X, *et al.* (2003) Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 422(6929):307-312.
151. Szakonyi G, *et al.* (2006) Structure of the Epstein-Barr virus major envelope glycoprotein. *Nat Struct Mol Biol* 13(11):996-1001.
152. Johannsen E, *et al.* (2004) Proteins of purified Epstein-Barr virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(46):16286-16291.
153. Nemerow GR, Houghten RA, Moore MD, & Cooper NR (1989) Identification of an epitope in the major envelope protein of Epstein-Barr virus that mediates viral binding to the B lymphocyte EBV receptor (CR2). *Cell* 56(3):369-377.
154. Urquiza M, Lopez R, Patino H, Rosas JE, & Patarroyo ME (2005) Identification of three gp350/220 regions involved in Epstein-Barr virus invasion of host cells. *J Biol Chem* 280(42):35598-35605.
155. Kawaguchi A, *et al.* (2009) The evolution of Epstein-Barr virus inferred from the conservation and mutation of the virus glycoprotein gp350/220 gene. *Virus Genes* 38(2):215-223.
156. Young KA, Chen XS, Holers VM, & Hannan JP (2007) Isolating the Epstein-Barr virus gp350/220 binding site on complement receptor type 2 (CR2/CD21). *J Biol Chem* 282(50):36614-36625.
157. Khyatti M, Patel PC, Stefanescu I, & Menezes J (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(2):996-1001.
158. Haque T, *et al.* (2006) A mouse monoclonal antibody against Epstein-Barr virus envelope glycoprotein 350 prevents infection both in vitro and in vivo. *J Infect Dis* 194(5):584-587.
159. Hoffman GJ, Lazarowitz SG, & Hayward SD (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(5):2979-2983.
160. Cannon MJ, Pisa P, Fox RI, & Cooper NR (1990) Epstein-Barr virus induces aggressive lymphoproliferative disorders of human B cell origin in SCID/hu chimeric mice. *J Clin Invest* 85(4):1333-1337.
161. Abedi MR, *et al.* (1997) Preventive effect of IgG from EBV-seropositive donors on the development of human lympho-proliferative disease in SCID mice. *Int J Cancer* 71(4):624-629.
162. Lang P, *et al.* (2004) Chimeric CD19 antibody mediates cytotoxic activity against leukemic blasts with effector cells from pediatric patients who received T-cell-depleted allografts. *Blood* 103(10):3982-3985.
163. Miltenburg AM, *et al.* (1989) Induction of antibody-dependent cellular cytotoxicity against endothelial cells by renal transplantation. *Transplantation* 48(4):681-688.
164. Ericson SG, *et al.* (1995) Anti-body-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) function of peripheral blood polymorphonuclear neutrophils (PMN) after autologous bone marrow transplantation (ABMT). *Bone Marrow Transplant* 16(6):787-791.

165. Puck TT, Cieciura SJ, & Robinson A (1958) Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med* 108(6):945-956.
166. Miller G & Lipman M (1973) Release of infectious Epstein-Barr virus by transformed marmoset leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70(1):190-194.
167. Theofilopoulos AN, Wilson CB, & Dixon FJ (1976) The Raji cell radioimmune assay for detecting immune complexes in human sera. *J Clin Invest* 57(1):169-182.
168. Harada H, *et al.* (1987) Development of cell systems to study viral gene transcription at the initial phase of Epstein-Barr virus infection. *Virus Genes* 1(1):73-82.
169. Hinuma Y, *et al.* (1967) Immunofluorescence and herpes-type virus particles in the P3HR-1 Burkitt lymphoma cell line. *J Virol* 1(5):1045-1051.
170. Menezes J, Leibold W, & Klein G (1975) Biological differences between Epstein-Barr virus (EBV) strains with regard to lymphocyte transforming ability, superinfection and antigen induction. *Exp Cell Res* 92(2):478-484.
171. Boom R, *et al.* (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28(3):495-503.
172. Niesters HG (2001) Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. *Methods* 25(4):419-429.
173. Sairenji T, *et al.* (1988) Inhibition of Epstein-Barr virus (EBV) release from P3HR-1 and B95-8 cell lines by monoclonal antibodies to EBV membrane antigen gp350/220. *J Virol* 62(8):2614-2621.
174. Alfieri C, Birkenbach M, & Kieff E (1991) Early events in Epstein-Barr virus infection of human B lymphocytes. *Virology* 181(2):595-608.
175. Cheng FW, *et al.* (2009) Post-transplant EBV-related lymphoproliferative disorder complicating umbilical cord blood transplantation in patients of adrenoleukodystrophy. *Pediatr Blood Cancer* 53(7):1329-1331.
176. Summers WC & Klein G (1976) Inhibition of Epstein-Barr virus DNA synthesis and late gene expression by phosphonoacetic acid. *J Virol* 18(1):151-155.
177. Yuan J, Cahir-McFarland E, Zhao B, & Kieff E (2006) Virus and cell RNAs expressed during Epstein-Barr virus replication. *J Virol* 80(5):2548-2565.
178. Leibson PJ, Hunter-Laszlo M, & Hayward AR (1986) Inhibition of herpes simplex virus type 1 replication in fibroblast cultures by human blood mononuclear cells. *J Virol* 57(3):976-982.
179. Ladell K, *et al.* (2007) Immune activation suppresses initiation of lytic Epstein-Barr virus infection. *Cell Microbiol* 9(8):2055-2069.
180. Chen F, Hu LF, Ernberg I, Klein G, & Winberg G (1995) Coupled transcription of Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP)-1 and LMP-2B genes in nasopharyngeal carcinomas. *J Gen Virol* 76 ( Pt 1):131-138.
181. Nonkwelo C, Skinner J, Bell A, Rickinson A, & Sample J (1996) Transcription start sites downstream of the Epstein-Barr virus (EBV) Fp promoter in early-passage Burkitt lymphoma cells define a fourth promoter for expression of the EBV EBNA-1 protein. *J Virol* 70(1):623-627.
182. Rickinson AB, Jarvis JE, Crawford DH, & Epstein MA (1974) Observations on the type of infection by Epstein-Barr virus in peripheral lymphoid cells of patients with infectious mononucleosis. *Int J Cancer* 14(6):704-715.
183. Rickinson AB, Finerty S, & Epstein MA (1977) Comparative studies on adult donor lymphocytes infected by EB virus in vivo or in vitro: origin of transformed cells arising in co-cultures with foetal lymphocytes. *Int J Cancer* 19(6):775-782.

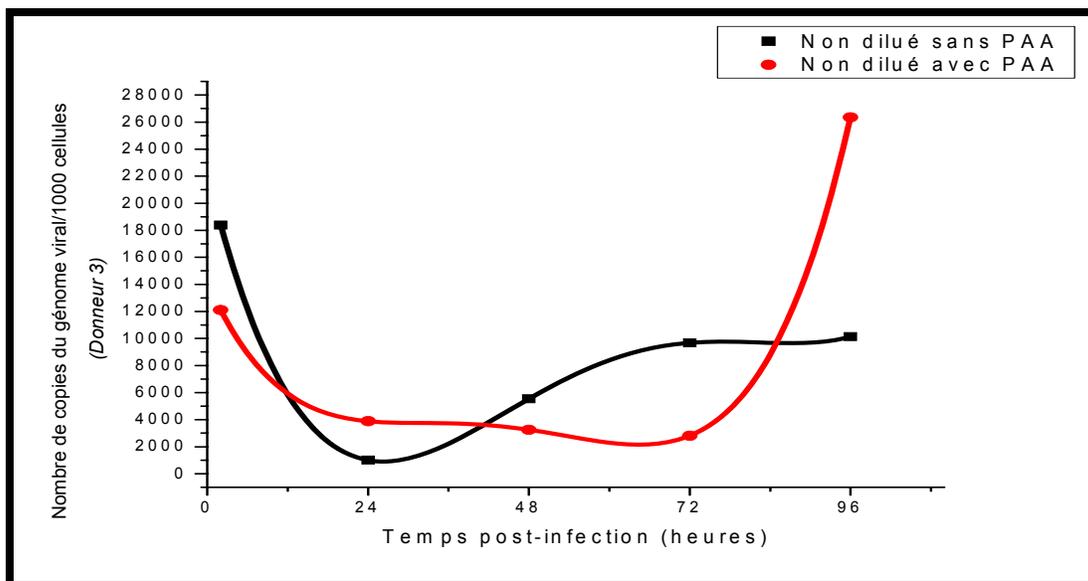
184. Lewin N, *et al.* (1987) Characterization of EBV-carrying B-cell populations in healthy seropositive individuals with regard to density, release of transforming virus and spontaneous outgrowth. *Int J Cancer* 39(4):472-476.
185. Halder S, *et al.* (2009) Early events associated with infection of Epstein-Barr virus infection of primary B-cells. *PLoS One* 4(9):e7214.
186. Kalla M, Schmeinck A, Bergbauer M, Pich D, & Hammerschmidt W (2010) AP-1 homolog BZLF1 of Epstein-Barr virus has two essential functions dependent on the epigenetic state of the viral genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(2):850-855.
187. Sugden B, Yates J, & Mark W (1984) Transforming functions associated with Epstein-Barr virus. *J Invest Dermatol* 83(1 Suppl):82s-87s.
188. Wen W, *et al.* (2007) Epstein-Barr virus BZLF1 gene, a switch from latency to lytic infection, is expressed as an immediate-early gene after primary infection of B lymphocytes. *J Virol* 81(2):1037-1042.
189. Zhang Q, Gutsch D, & Kenney S (1994) Functional and physical interaction between p53 and BZLF1: implications for Epstein-Barr virus latency. *Mol Cell Biol* 14(3):1929-1938.
190. Alfieri C, *et al.* (1996) Epstein-Barr virus transmission from a blood donor to an organ transplant recipient with recovery of the same virus strain from the recipient's blood and oropharynx. *Blood* 87(2):812-817.
191. Tanner JE & Alfieri C (2001) The Epstein-Barr virus and post-transplant lymphoproliferative disease: interplay of immunosuppression, EBV, and the immune system in disease pathogenesis. *Transpl Infect Dis* 3(2):60-69.
192. Rasmussen LK, Larsen YB, & Hojrup P (2005) Characterization of different cell culture media for expression of recombinant antibodies in mammalian cells: Presence of contaminating bovine antibodies. *Protein Expr Purif* 41(2):373-377.
193. Ehrlich GK & Bailon P (2001) Identification of model peptides as affinity ligands for the purification of humanized monoclonal antibodies by means of phage display. *J Biochem Biophys Methods* 49(1-3):443-454.
194. Jacobs JM, *et al.* (2003) QSYP peptide sequence is selected from phage display libraries by bovine IgG contaminants in monoclonal antibody preparations. *Biotechniques* 34(1):132-134, 137-141.
195. Schroder M, Matischak K, & Friedl P (2004) Serum- and protein-free media formulations for the Chinese hamster ovary cell line DUKXB11. *J Biotechnol* 108(3):279-292.
196. Kim SH & Lee GM (2009) Development of serum-free medium supplemented with hydrolysates for the production of therapeutic antibodies in CHO cell cultures using design of experiments. *Appl Microbiol Biotechnol* 83(4):639-648.

## **ANNEXES**

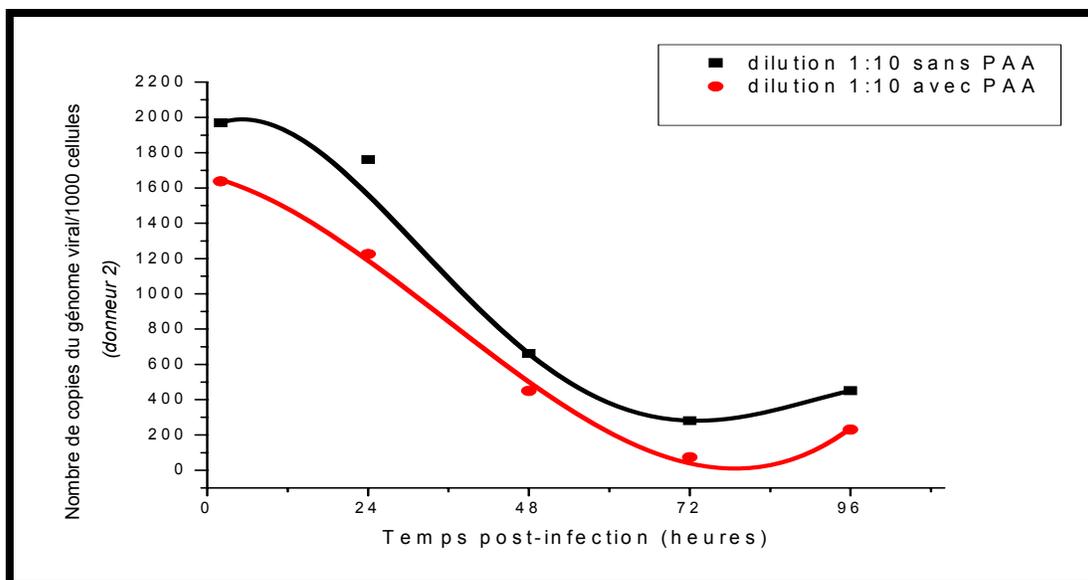
### Annexe I : Résultats de la q-PCR pour les donneurs 2 et 3



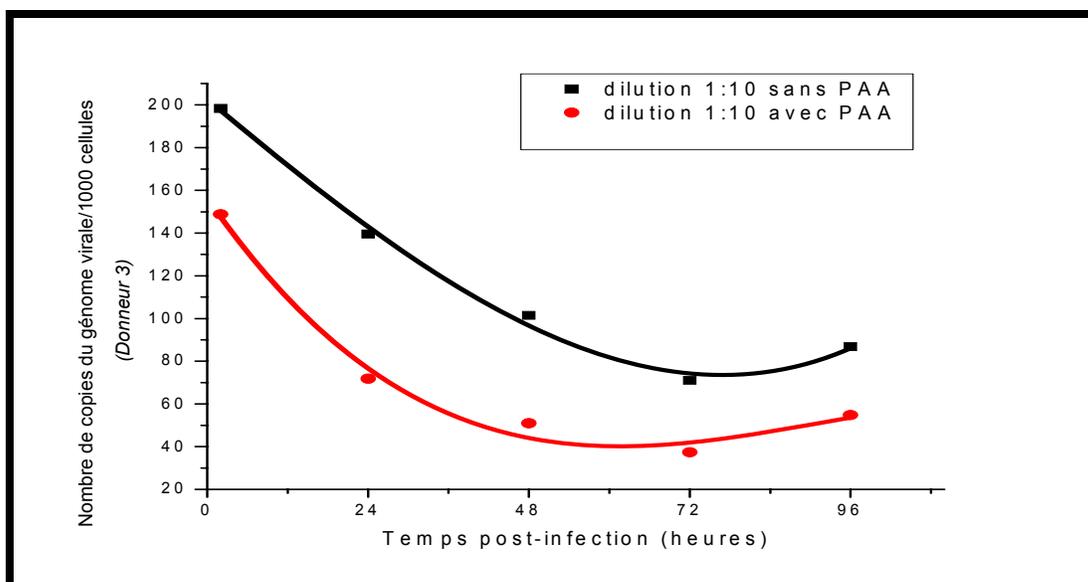
**Figure 16 :** Cinétique d'évolution de la charge virale pendant l'infection aiguë des cellules mononuclées du sang de cordon (CMSCs) non diluées du donneur 2.



**Figure 17 :** Cinétique d'évolution de la charge virale pendant l'infection aiguë des cellules mononuclées du sang de cordon (CMSCs) non diluées du donneur 3.

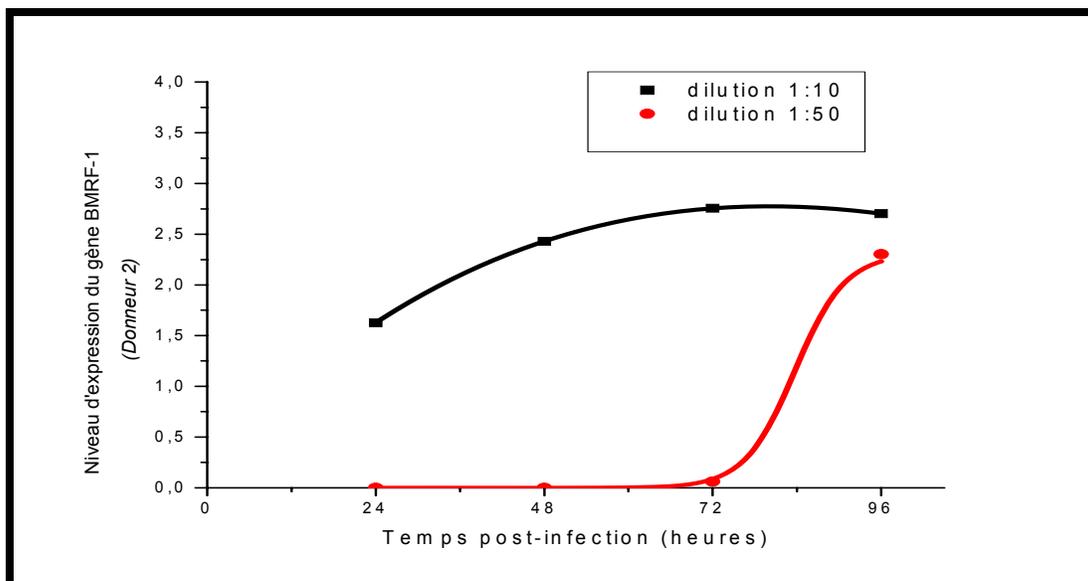


**Figure 18:** Cinétique d'évolution de la charge virale pendant l'infection aiguë des cellules mononuclées du sang de cordon (CMSCs) diluées du donneur 2.

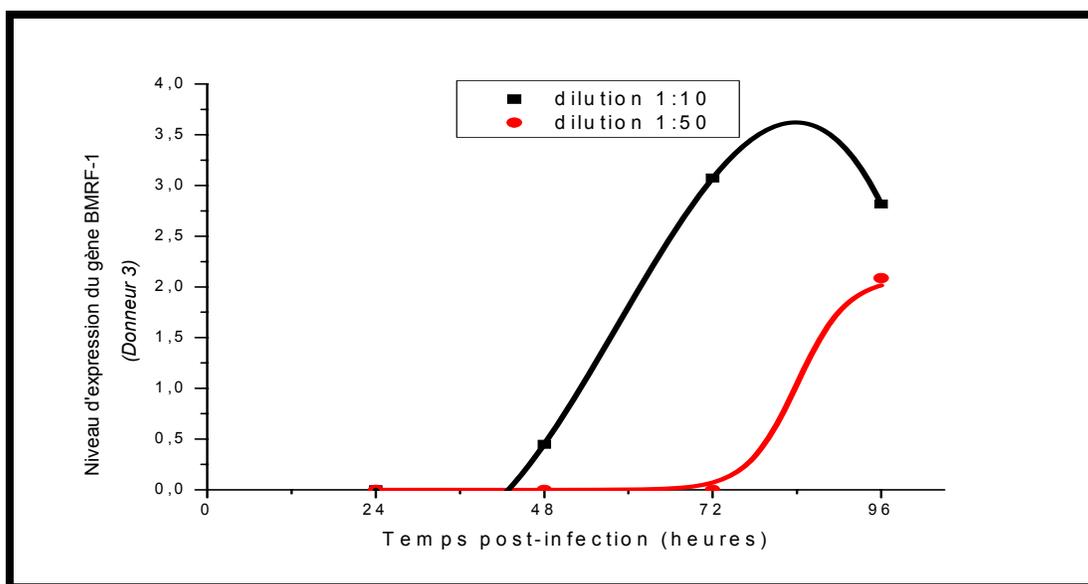


**Figure 19:** Cinétique d'évolution de la charge virale pendant l'infection aiguë des cellules mononuclées du sang de cordon (CMSCs) diluées du donneur 3.

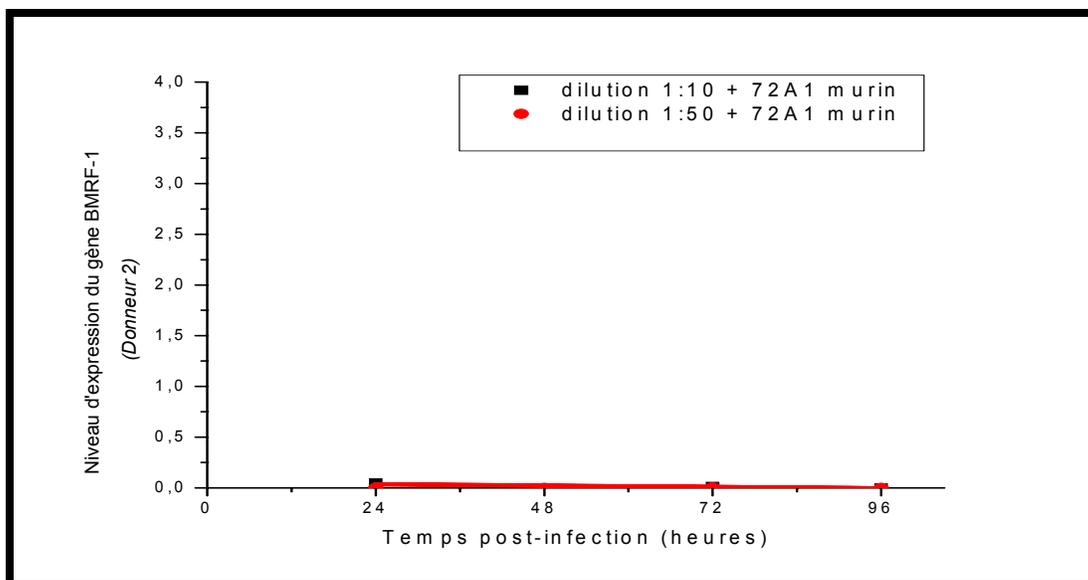
## Annexe II : Résultats de la NASBA pour les donneurs 2 et 3



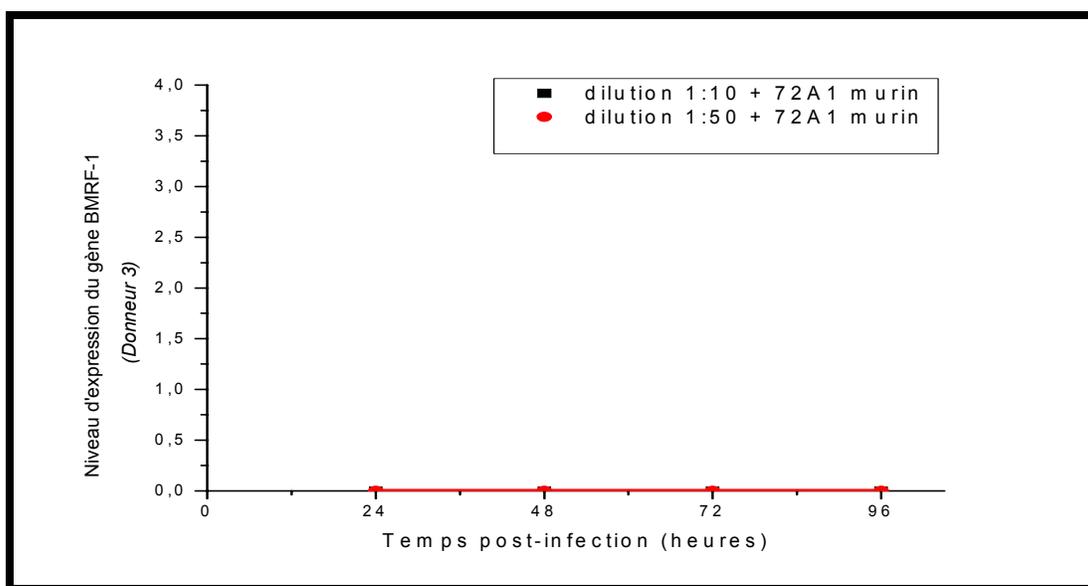
**Figure 20 :** Cinétique d'évolution de l'expression du gène lytique BMRF-1 pendant l'infection aiguë des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) du donneur 2.



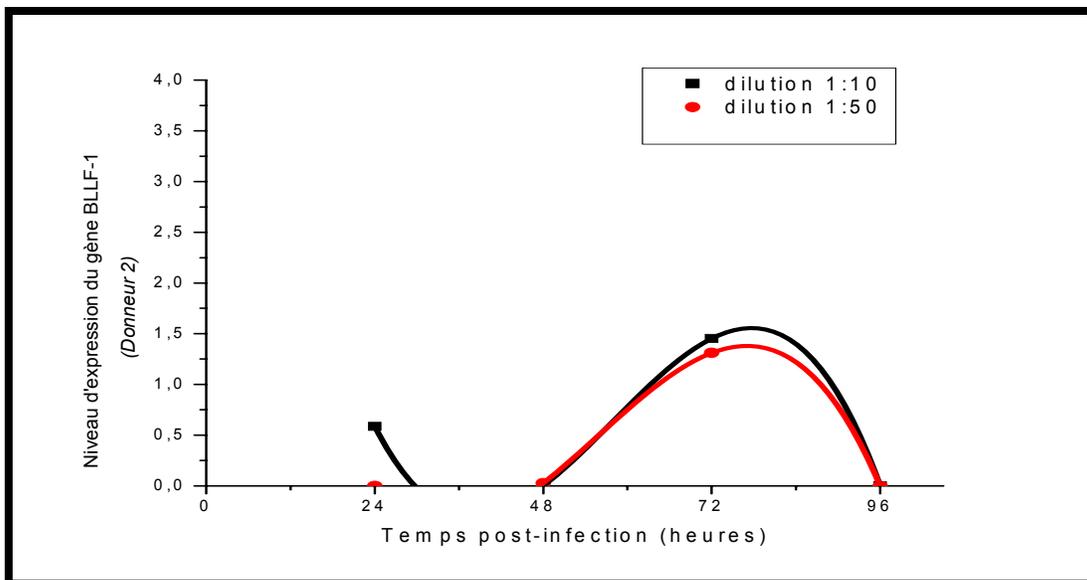
**Figure 21 :** Cinétique d'évolution de l'expression du gène lytique BMRF-1 pendant l'infection aiguë des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) du donneur 3.



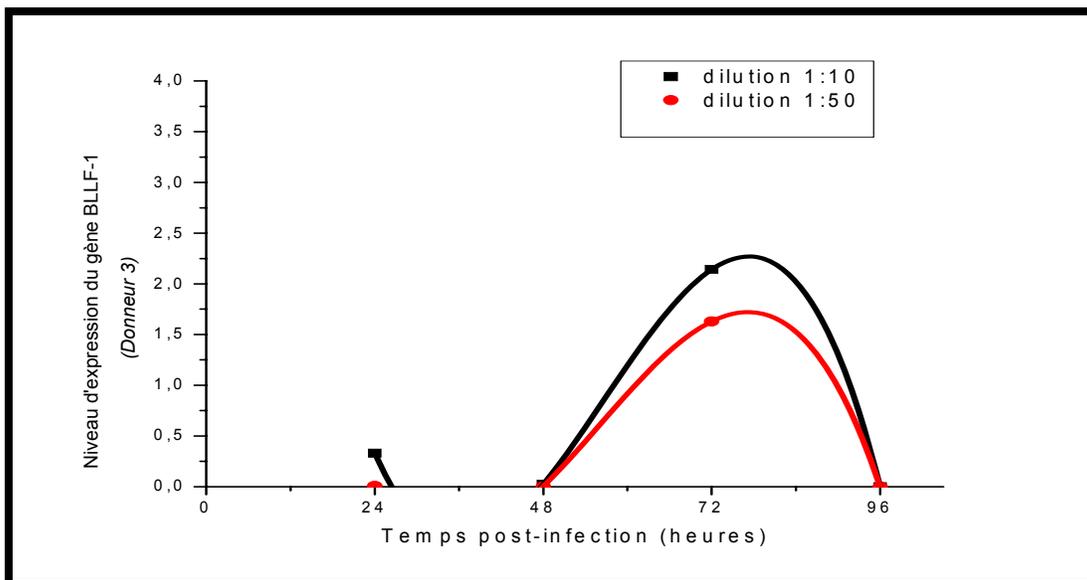
**Figure 22 :** Cinétique d'évolution de l'expression du gène lytique BMRF-1 pendant l'infection aiguë des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) du donneur 2 en présence d'anticorps neutralisant.



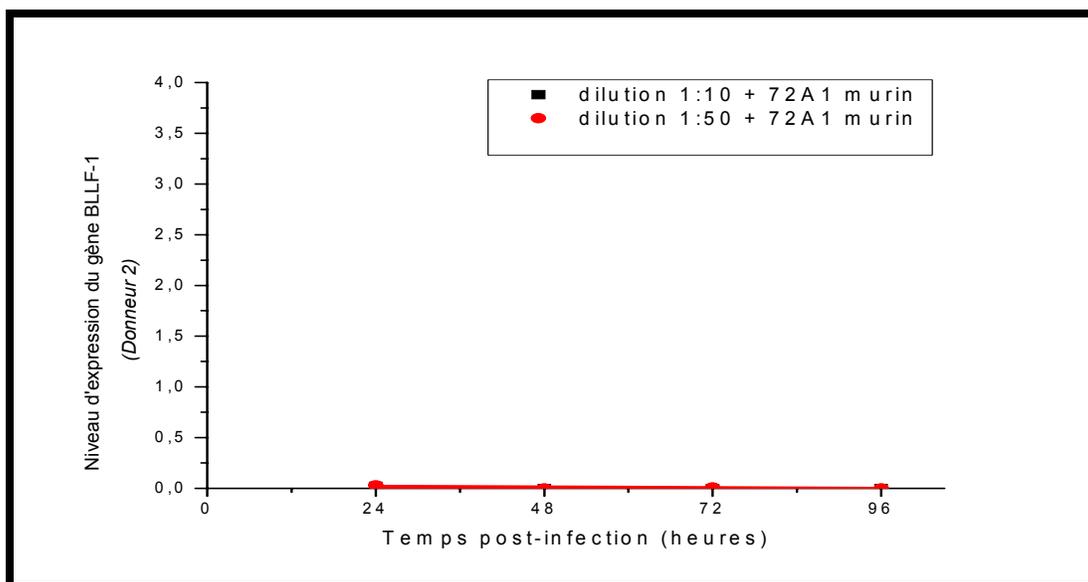
**Figure 23 :** Cinétique d'évolution de l'expression du gène lytique BMRF-1 pendant l'infection aiguë des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) du donneur 3 en présence d'anticorps neutralisant.



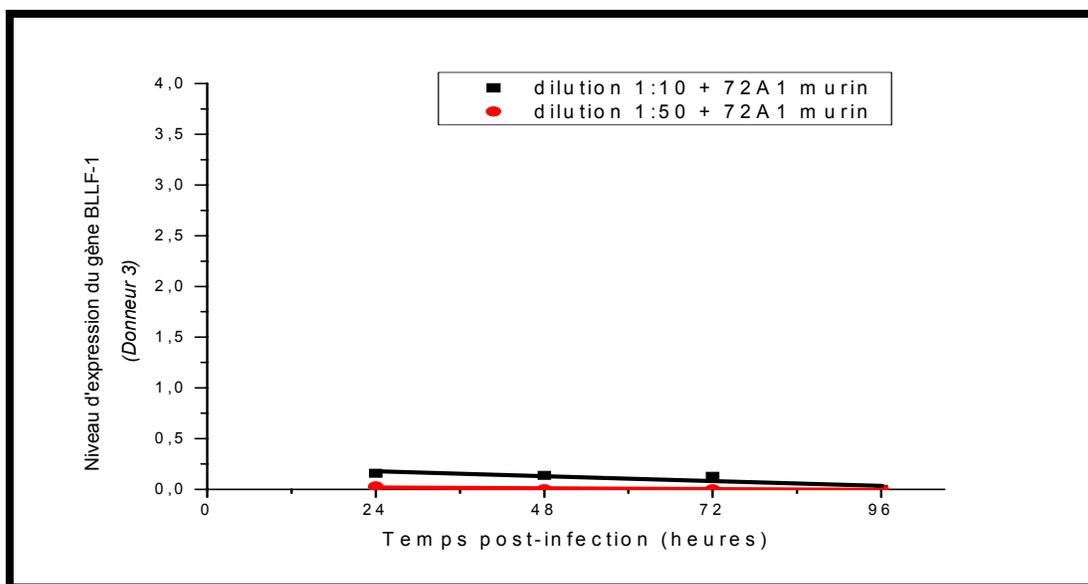
**Figure 24 :** Cinétique d'évolution de l'expression du gène lytique BLLF-1 pendant l'infection aiguë des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) du donneur 2.



**Figure 25 :** Cinétique d'évolution de l'expression du gène lytique BLLF-1 pendant l'infection aiguë des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) du donneur 3.



**Figure 26 :** Cinétique d'évolution de l'expression du gène lytique BLLF-1 pendant l'infection aiguë des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) du donneur 2 en présence d'anticorps neutralisant.



**Figure 27:** Cinétique d'évolution de l'expression du gène lytique BLLF-1 pendant l'infection aiguë des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) du donneur 3 en présence d'anticorps neutralisant.