



**HAL**  
open science

# Evaluation par PCR de l'activité antivirale des inhibiteurs de l'ADN polymérase du Virus d'Epstein-Barr

Mirvat Ballout

► **To cite this version:**

Mirvat Ballout. Evaluation par PCR de l'activité antivirale des inhibiteurs de l'ADN polymérase du Virus d'Epstein-Barr. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT: . tel-00011616

**HAL Id: tel-00011616**

**<https://theses.hal.science/tel-00011616>**

Submitted on 15 Feb 2006

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

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

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE**

**Année : 2005**

**N° D'ORDRE**

**THESE**

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

(EDCSV ; Option : Biologie Cellulaire)

**Evaluation par PCR de l'activité antivirale des  
inhibiteurs de l'ADN polymérase du Virus  
d'Epstein-Barr**

Présentée par

**Mirvat Ballout**

Soutenue publiquement le 15 décembre 2005

Directeur de thèse : Professeur Jean-Marie Seigneurin  
Co-directeur de thèse : Docteur Patrice Morand

**Professeur Jean-Marie HURAUX (Paris), rapporteur**

**Professeur Hélène PEIGUE-LAFEUILLE (Clermont-Ferrand), rapporteur**

**Professeur Max MAURIN (Grenoble), examinateur**

**Professeur Jean-Marie SEIGNEURIN (Grenoble), examinateur**



## *Remerciements*

*Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Mr le Professeur Jean-Marie Seigneurin qui m'a accueillie dans son laboratoire et encadrée dans son équipe. Je tiens à lui exprimer ma gratitude pour son soutien et son encouragement et la confiance qu'il m'a accordée tout au long de ce travail.*

*Je remercie vivement Mr le Docteur Patrice Morand pour son aide et son encadrement. Je lui adresse ma profonde reconnaissance pour son écoute, son soutien et pour tous les conseils qu'il m'a apportés.*

*Je remercie vivement Mme le Professeur Hélène Peigue-Lafeuille et Mr le professeur Jean-Marie Huraux de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail et d'apporter toutes leurs connaissances et leur expérience sur les herpesvirus.*

*Je remercie très sincèrement Mr le Professeur Max Maurin de m'avoir fait l'honneur de présider cette thèse.*

*Je remercie vivement Mme le Dr Raphaële Germi pour sa disponibilité, son aide et son encadrement qui m'a beaucoup apporté.*

*Je remercie très chaleureusement Odile Genoulaz qui a participé à ce travail, pour sa grande compétence technique et son aide précieuse.*

*Je remercie très chaleureusement tous les membres du laboratoire de Virologie de l'hôpital Michallon de Grenoble, en particulier Monique Baccard pour son soutien, son écoute et sa gentillesse. Marie-Josette Bourgeat et Geneviève Gui pour leur aide pour les cultures cellulaires. J'exprime toute ma sympathie et mes remerciements pour Samira, Christine, Sylvie, Marion, Virginie, Bénédicte, Anne, Julien, Gérard et Toufik. Je remercie les secrétaires Christiane, Gisèle et Claire pour leur soutien et leur bonne humeur ainsi qu'à tout le reste du personnel du laboratoire pour leur gentillesse, leur soutien à mon égard et pour les moments agréables passés à leur côté.*

*Une partie de ce travail a été réalisée au laboratoire d'immunologie cellulaire (Centre de transfusion sanguine de Grenoble). Je remercie vivement Mme le Docteur Marie-Christine Jacob et Mme le Docteur Martine Pernollet de m'avoir accueillie dans leurs équipes et de m'avoir apporté leur connaissance dans la cytométrie en flux. Je remercie Mme Sylvie Glaizal et Mme Agnès Colomer pour leur assistance technique et leur gentillesse.*

*A mon père, tu es toujours auprès de nous et dans notre cœur.*

*A ma mère, à qui je dois tout. Je te promets nous allons rattraper tout le temps que j'ai passé loin de toi.*

*A ma sœur Moutia, grâce à ton amour, ton soutien et tes encouragements j'ai pu aller jusqu'au bout.*

*A ma sœur Widade, ton amour était pour moi un vrai motif pour travailler. Merci.*

*A mon frère Jihad, à May et leurs enfants. Je vous remercie pour tout ce que vous avez fait pour moi.*

*A ma sœur Ferial, à Toufik et leurs enfants. Enfin, nous allons pouvoir réaliser nos projets.*

*A Danielle Renversez, je te remercie du fond du cœur pour ton soutien dans les moments difficiles. Les bons moments que nous avons passés ensemble resteront gravés à jamais dans ma mémoire.*

*A Françoise et Jean-Paul Missud. Votre accueil chaleureux et exceptionnel m'a beaucoup touché. Je vous remercie énormément.*

*A Ali Ibrahim. Je te remercie pour ton aide et ton soutien.*

*A mes amies et amis avec lesquels j'ai partagé les bons et mauvais moments. Pardonnez moi de ne pas vous citer toutes et tous.*

*A mon père*

*A ma mère*

*A Moutia et Widade*

*Ce travail vous est dédié avec tout mon amour.*





## **Abréviations**

6-Fam : 6-carboxyfluorescéine

7-AAD : 7-Amino-actinomycine

ACV : [9-(2-hydroxyethoxyméthyl)guanine] (aciclovir)

BDCRB : (2-bromo-5,6-dichloro-1-(beta-D-ribofuranosyl)benzimidazole)

BVDU : (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine (brivudine)

b.w : body weight

CAEBV : chronic Active EBV Infection

CFS : chronic fatigue syndrome

CTL : les cellules T cytotoxiques

DMSO : diméthyle sulfoxyde

EA : Early Antigen

EBERs : Epstein-Barr Encoded small RNAs

EBNAs : protéines nucléaires

EBV : Epstein-Barr virus

EGCG : (-)-Epigallocatechin gallate

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Et-PFA : éthyle PFA

FITC : isothiocyanate de fluorescéine

FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer

FSC : Forward Scatter

GCV : [9-(1,3-dihydroxy-2-propoxyméthyl)guanine] (ganciclovir)

Gp : Glycoprotéine

HAART : highly active antiretroviral therapy

HCMV : Human Cytomegalovirus

HHV-4 : herpesvirus humain de type 4

hPBGD : porphobilinogène désaminase

HPMPC : (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylethoxypropyl)cytosine (cidofovir)

HPMPCpp : cidofovir diphosphate

HSV : Herpes Simplex Virus

IEA : Immediate Early Antigen

IF : immunofluorescence

IR (Internal Repeats) : répétitions internes  
KDa : kilodalton  
LCL : lignées lymphoblastoïdes  
LCR : liquide céphalo-rachidien  
LC-Red 640 : LightCycler-Red-640-N-hydroxy-succinimide ester  
LC-Red 705 : LightCycler-Red-705-Phosphoramitide  
LED : Light-Emitting Diode  
LMNH : Lymphomes Malins Non-Hodgkiniens  
LMPs : protéines membranaires  
ND : non donné  
NDP : nucleoside diphosphate  
NK : Natural Killer  
NPC : carcinome Indifférencié du Nasopharynx  
OHL : leucoplasie orale chevelue  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
ORF : Open Reading Frame  
Ori-Lyt : origine de réplication lytique  
Ori-P : origine de réplication plasmidique  
PAA : Phosphonoacetic Acid  
Pb : paires de bases  
PBS : tampon phosphate  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
PCV : [9-(4-hydroxy-3-hydroxyméthylbut-1-yl)guanine (penciclovir)  
PEL : primary effusion lymphoma  
PK : Protein Kinase  
PMA : Phorbol 12-myristate, 13-acetate  
PMEA : [(phosphonylméthoxy)éthyl]adénine (adéfovir)  
PMEApp : adéfovir diphosphate  
PNMP : pyrimidine nucleoside monophosphate  
PPi : Pyrophosphate  
PTLD : Post Transplant Lymphoproliferative Disease  
RT-PCR : reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction  
SH2D1A : SH2 domain protein 1A  
SI : indice de sélectivité

SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise  
SLAM : signaling lymphocyte activation molecule  
S-oligos : oligodésoxynucléotides  
SSC : Side Scatter  
Tamra : 6-carboxytetramethylrhodamine  
THC : delta-9 tetrahydrocannabinol  
TK : Thymidine Kinase  
TPA : 1, 2 tetradecanoylphorbol 13-acetate  
TR (Terminal Repeats) : répétitions terminales  
TSA : trichostatin A  
UL (Unique Long) : unique long  
US (Unique Short) : unique court  
VCA : Viral Capsid Antigen  
VIH : virus de l'immunodéficience humaine  
VZV : Varicella Zoster Virus  
WB : Western Blot  
XLP : syndrome lymphoprolifératif lié au chromosome X

# Sommaire

Mis en forme

<b>Principaux aspects biologiques de l'infection par le virus d'Epstein-Barr .....</b>	<b>15</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>16</b>
<b>I. Découverte de l'EBV et de son rôle.....</b>	<b>17</b>
<b>II. Propriétés du virus .....</b>	<b>17</b>
1. Classification et structure .....	17
2. Le génome de l'EBV .....	18
3. Gènes et protéines de l'EBV .....	20
a. Protéines de la latence .....	20
b. Protéines du cycle productif lytique.....	21
4. Réplication productive et cycle lytique .....	22
5. Immortalisation, transformation et lignées lymphoïdes .....	24
<b>III. Les modes de transmission de l'EBV .....</b>	<b>25</b>
<b>IV. Les cellules cibles de l'EBV .....</b>	<b>26</b>
<b>V. La persistance de l'EBV.....</b>	<b>28</b>
<b>VI. Les maladies causées par l'EBV .....</b>	<b>30</b>
1. La mononucléose infectieuse .....	30
2. Le syndrome lymphoprolifératif lié au chromosome X (XLP) ou syndrome de Purtilo .....	31
3. L'infection chronique active à EBV (CAEBV) .....	32
4. La leucoplasie orale chevelue (OHL).....	32
<b>VII. Les maladies associées à l'EBV .....</b>	<b>33</b>
1. Le lymphome de Burkitt (LB).....	33
2. Les syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation (PTLD) .....	34
3. Les Lymphomes Malins Non-Hodgkiniens (LMNH) des patients VIH-positifs .	34
4. Le Carcinome Indifférencié du Nasopharynx (NPC).....	35
5. La Maladie de Hodgkin (MH).....	36
6. Autres tumeurs associées à l'EBV .....	37
<b>L'évaluation <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> des antiviraux contre le virus d'Epstein-Barr .....</b>	<b>38</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>39</b>

<b>I. Métabolisme intracellulaire et mécanisme d'action des antiviraux .....</b>	<b>41</b>
1. Les analogues des nucléosides .....	41
2. Les analogues des nucléotides.....	42
3. Les analogues du pyrophosphate.....	43
<b>II. Méthodes d'évaluation de l'activité des antiviraux .....</b>	<b>47</b>
1. Les systèmes cellulaires .....	47
2. Les technologies pour évaluer la diminution de la réplication virale. ....	54
a. Détection ou quantification de l'ADN viral .....	54
b. Détection ou quantification des transcrits et antigènes viraux .....	55
c. Evaluation de l'activité transformante du virus .....	56
d. Evaluation de l'activité enzymatique des protéines virales. ....	57
<b>III. Résultats d'évaluation de l'activité des antiviraux <i>in vitro</i> ..</b>	<b>60</b>
1. Les analogues des nucléosides .....	60
2. Les analogues nucléotidiques.....	66
3. Les <i>CycloSal</i> -nucléosides monophosphates.....	68
4. Les analogues du pyrophosphate.....	70
5. Les autres groupes antiviraux.....	71
a. Les molécules à activité antivirale .....	72
b. Les molécules à double activité antivirale et anticancéreuse.....	75
<b>IV. Evaluation <i>in vivo</i> de l'activité des antiviraux contre l'EBV90</b>	
<b>Rappel sur les techniques utilisées dans notre étude expérimentale.....</b>	<b>98</b>
<b>Le système du LightCycler .....</b>	<b>99</b>
<b>Description du système LightCycler (Roche).....</b>	<b>99</b>
1. Le thermocycleur.....	100
a. Le carrousel .....	100
b. La chambre thermique.....	101
2. L'unité optique .....	101
3. Les formats de fluorescence.....	102
a. Sondes d'hybridation.....	102
b. SYBR Green I .....	104
c. Sondes d'hydrolyse (technologie TaqMan) .....	106
d. Mesure de la fluorescence .....	108
4. Analyse des données .....	108
5. Les avantages du système du LightCycler .....	108
<b>La cytométrie en flux .....</b>	<b>110</b>
<b>I. Principe.....</b>	<b>110</b>

1. Quel type de particules ? .....	110
2. Les propriétés mesurées .....	110
3. Dispersion de la lumière (Light Scattering) .....	111
4. Qu'est ce que le FSC et le SSC ? .....	111
5. Les différentes parties du cytomètre .....	112
a. Le système fluïdique .....	112
b. Le système optique .....	113
c. Le système électronique .....	114
6. Application de la cytométrie en flux : étude de la viabilité cellulaire et de l'apoptose .....	114
a. Détection des cellules viables .....	114
b. Détection des cellules apoptotiques .....	114
c. Rôle de l'annexine-V .....	115
d. Double marquage annexine V-PE / 7-AAD .....	115
<b>Etude expérimentale .....</b>	<b>117</b>
<b>But du travail.....</b>	<b>118</b>
<b>I. Matériels et Méthodes .....</b>	<b>119</b>
1. Les composés antiviraux .....	119
2. Lignées cellulaires .....	119
3. Culture cellulaire .....	119
4. Etude de l'effet des antiviraux sur la viabilité cellulaire et l'apoptose .....	120
a. Traitement des cellules .....	120
b. Mesure de la viabilité et de l'apoptose par cytométrie en flux .....	120
5. Etude de l'effet des antiviraux sur la croissance cellulaire .....	121
6. Etude de l'effet des antiviraux sur la réplication de l'ADN viral .....	121
a. Essai d'inhibition du virus .....	121
b. Extraction de l'ADN .....	124
c. PCR en temps réel pour quantifier l'ADN EBV .....	124
7. Calcul d'EC <sub>50</sub> .....	126
8. Etude de l'effet des antiviraux sur la réplication de l'ADN cellulaire .....	126
a. PCR en temps réel pour quantifier l'ADN cellulaire .....	126
9. Etude de l'effet des antiviraux sur la transcription virale ( ARNm gp350/220) .....	127
a. Essai d'inhibition du virus .....	127
b. Extraction de l'ARN total .....	128
c. RT-PCR en temps réel pour quantifier l'ARNm gp350/220 de l'EBV .....	128
10. Etude de l'effet des antiviraux sur la transcription cellulaire ( ARNm hPBGD) .....	130
a. RT-PCR en temps réel pour quantifier l'ARN cellulaire .....	130
11. Analyse des données fluorométriques .....	131
12. Analyse statistique des résultats .....	131
13. Expression des résultats .....	131
<b>II. Résultats .....</b>	<b>132</b>
1. Effets des drogues antivirales sur la viabilité cellulaire .....	132
2. Effets des drogues antivirales sur l'induction de l'apoptose .....	136
3. Effets des drogues antivirales sur la croissance cellulaire .....	137
4. Effets des drogues antivirales sur la réplication de l'ADN EBV .....	139

5. Effets des drogues antivirales sur la réplication de l'ADN cellulaire ..... 144
6. Effet des drogues antivirales sur l'expression de l'ARNm de la gp350/220 ..... 145
7. Effets des drogues antivirales sur l'expression de l'ARN cellulaire ..... 150

**Discussion et perspectives ..... 151**

**Bibliographie ..... 158**

**Articles publiés ou soumis ..... 180**

Article n° 1. .... 181

Article n° 2. .... 182

Annexe : Article n° 3. .... 183

**Résumé/Summary**

**Principaux aspects biologiques de l'infection par le virus  
d'Epstein-Barr**



## Introduction

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) infecte la grande majorité de la population mondiale, souvent sous la forme d'une infection asymptomatique chez l'enfant. Chez l'adolescent et l'adulte jeune, cette primo-infection s'accompagne fréquemment d'un ensemble de signes cliniques que l'on regroupe sous le terme de mononucléose infectieuse (MNI). Le virus persiste ensuite dans l'organisme pendant toute la vie, à l'état latent dans des lymphocytes B, mais aussi sous forme de particules virales infectieuses excrétées au niveau de l'oropharynx et dans la salive. Cette réactivation virale, intermittente chez le sujet immunocompétent, est accrue grandement lors des états d'immunodépression.

L'EBV possède la propriété remarquable d'induire la prolifération continue des lymphocytes B infectés. Les principaux signes cliniques de la MNI sont provoqués par l'intense réaction immunitaire dirigée contre cette lymphoprolifération B EBV-induite. En revanche, chez l'immunodéprimé, cette prolifération peut aboutir à un lymphome malin. Par ailleurs, le virus est impliqué dans la pathogénie de plusieurs cancers aux dépens des lymphocytes ou des cellules épithéliales, comme le lymphome de Burkitt, le carcinome du nasopharynx, ou le lymphome de Hodgkin.

## **I. Découverte de l'EBV et de son rôle**

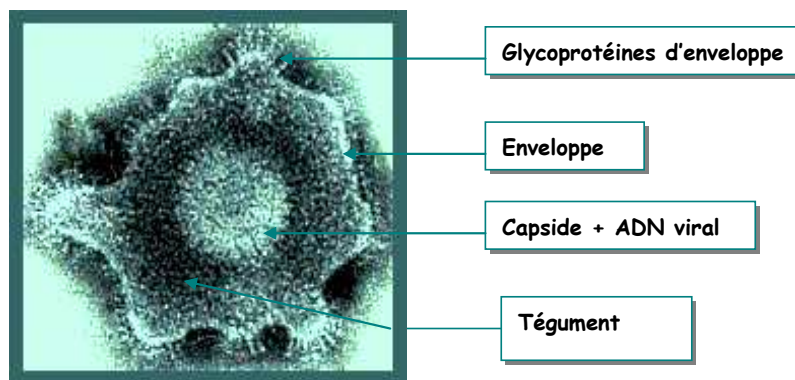
Dans les années 1950, un chirurgien anglais Denis Burkitt, décrit des cas de lymphomes à localisation maxillaire chez les enfants d'Afrique de l'Est. Il remarque que ce type de lymphome est plus fréquent dans les régions d'Afrique équatoriale où sévit le paludisme. Devant ces données épidémiologiques et cliniques, D. Burkitt suggère que l'étiologie de ces lymphomes est infectieuse. Il envisage même le rôle d'un virus. A la suite d'une conférence donnée par D. Burkitt à l'université de Bristol, Tony Epstein et son étudiante Yvonne Barr s'intéressent à l'hypothèse de l'étiologie infectieuse du lymphome, et proposent une collaboration pour obtenir des biopsies tumorales. L'équipe d'Epstein réussit à mettre en culture les cellules tumorales dérivées du lymphome, et en 1964, Epstein, Achong et Barr découvrent en microscopie électronique des particules virales dans ces lignées cellulaires (40). Ces virus, morphologiquement similaires aux herpesvirus connus à cette époque, étaient complètement différents du point de vue biologique et antigénique. Le premier gammaherpesvirus humain, l'EBV, fut ainsi découvert dans des tumeurs de lymphome de Burkitt africain.

## **II. Propriétés du virus**

### **1. Classification et structure**

L'EBV, ou herpesvirus humain de type 4 (HHV-4), appartient donc à la famille des *Herpesviridae*. La particule virale (figure 1) a une forme plus ou moins sphérique et une taille de 120-200 nm. Elle est constituée de différentes parties qui sont :

- une nucléocapside constituée du génome viral linéaire et d'une capsidie icosaédrique formée de 162 unités structurales ou capsomères. Les protéines majeures de la capsidie ont 160, 47, et 28 kDa.
- un tégument qui se trouve entre la nucléocapsidie et l'enveloppe. La protéine de 152 kDa est majoritaire dans le tégument.
- une enveloppe externe avec des spicules de glycoprotéines. La gp350/220 est la protéine la plus abondante dans l'enveloppe.

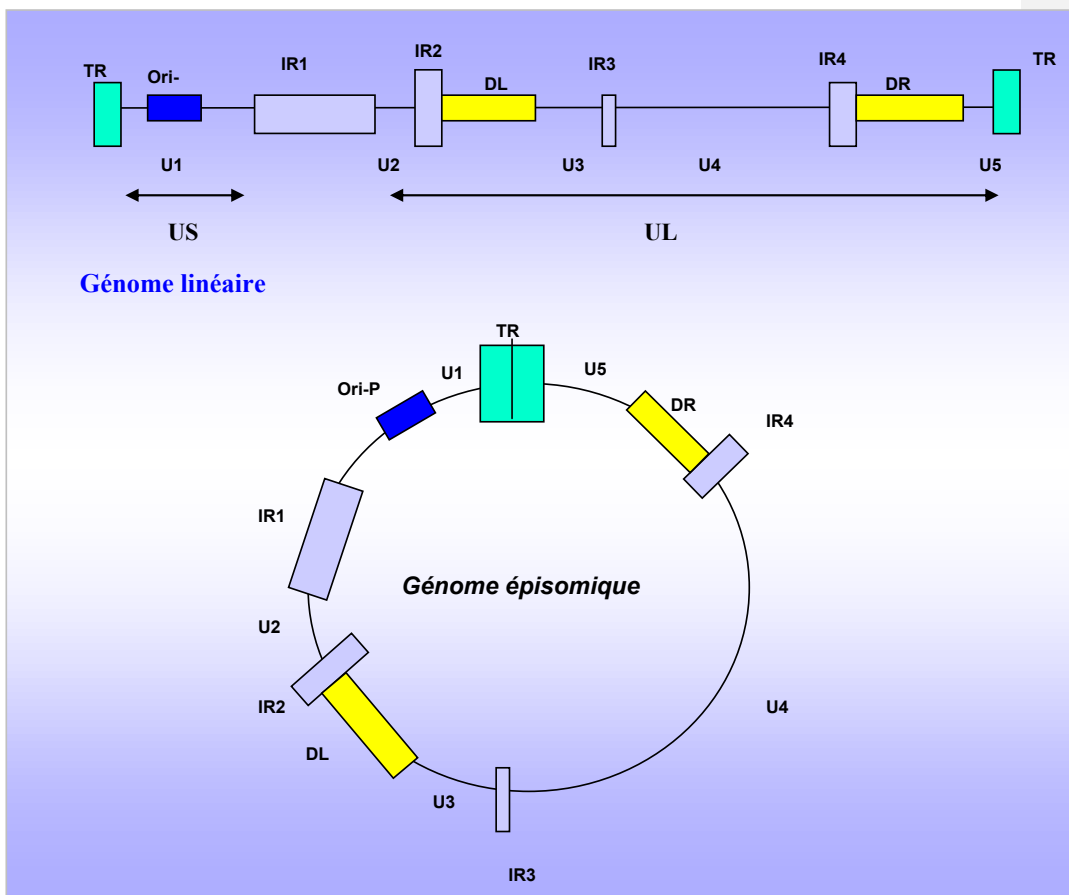


**Figure 1 : Structure du virus EBV en microscopie électronique (coloration négative)**

## **2. Le génome de l'EBV**

L'EBV est le premier herpesvirus dont le génome a été complètement séquencé en 1984 (12). Son génome, une molécule d'ADN double-brin d'un peu plus de 172 000 paires de bases (pb), a une capacité de codage pour 100 à 150 protéines. Il est divisé en plusieurs domaines uniques, séparés par des répétitions internes (IR pour Internal Repeats) (IR1-IR4), la séquence IR1 de 3000 pb divise le génome en un domaine unique long (UL pour Unique Long) et un

domaine unique court (US pour Unique Short). Chaque extrémité comporte des répétitions terminales (TR pour Terminal Repeats) de 538 pb, qui permettent la circularisation du génome sous forme circulaire dans certaines circonstances lors de la réplication de l'ADN. A l'intérieur du virion, la molécule d'ADN se présente toujours sous forme linéaire (figure 2).



**Figure 2 : Représentation schématique du génome EBV**

L'analyse de la séquence entière de la souche prototype EBV B95-8 (virus produit par la lignée lymphoïde B95-8) a permis l'identification d'une centaine de cadres de lecture ouverts (*open reading frame ORF*). Les *ORFs* de l'EBV sont répertoriés d'après les fragments de

restriction obtenus avec l'enzyme *Bam*H1. Les gènes EBV sont nommés selon le fragment de restriction *Bam*H1 dans lequel ils se trouvaient, l'orientation de leur transcription (*leftward* ou *rightward*), et la phase de lecture (*frame*) parmi les trois possibles pour chaque orientation ; par exemple : *Bam*H1 *N leftward frame 1* s'écrit BNLF1.

### **3. Gènes et protéines de l'EBV**

L'EBV code d'une part des protéines associées à la latence virale et d'autre part des protéines responsables de la production des nouveaux virions et du cycle lytique.

#### **a. Protéines de la latence**

L'EBV établit une infection latente dans les lymphocytes B qu'il infecte, par l'expression d'un nombre restreint de gènes viraux. Ces protéines virales associées à la latence ainsi que leurs fonctions actuellement connues sont répertoriées dans le tableau 1. Elles comprennent 6 protéines nucléaires (EBNAs) et 3 protéines membranaires (LMPs) ; de plus 2 gènes sont transcrits en grande quantité, (*Epstein-Barr Encoded small RNAs*, ou EBERs), mais non traduits en protéines. L'analyse des gènes mutés ou délétés a montré que certaines de ces protéines sont indispensables à la transformation cellulaire (ou immortalisation), en particulier EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3C et LMP-1. C'est dans ces protéines de latence que l'on a pu mettre en évidence une certaine diversité génétique au sein des différentes souches virales isolées. Le gène EBNA-2, puis les gènes EBNA-3 et les EBERs montrent un polymorphisme qui permet de classer les isolats en 2 types viraux : EBV-1 et EBV-2 (anciennement EBNA-2A et EBNA-2B).

**Tableau 1 : Nomenclature des protéines de latence de l'EBV et leurs principales fonctions**

<b>Protéines virales</b>	<b>Latence</b>	<b>Localisation</b>	<b>Fonctions principales</b>
EBNA1	I, II, III	Nucléaire	Maintien du génome viral sous forme épisomale
EBNA2	III	Nucléaire	Immortalisation des LB, activateur de transcription cellulaire et virale
EBNA3A (ou EBNA3)	III	Nucléaire	Répresseur de l'action d'EBNA2, se lie à RBP-Jkappa, participe à l'immortalisation des LB
EBNA3B (ou EBNA4)	III	Nucléaire	Inconnue, se lie à RBP-Jkappa
EBNA3C (ou EBNA6)	III	Nucléaire	Répresseur de l'action d'EBNA2, action sur le cycle cellulaire, se lie à RBP-Jkappa, participe à l'immortalisation
EBNALP (ou EBNA5)	III	Nucléaire	Cofacteur de EBNA2, interagit avec p53 et Rb
LMP1	II, III	Membranaire	Oncogène majeur Transducteur de signaux via TRAF vers NF-KB et JNK, induit bcl2
LMP2A	II, III	Membranaire	Prévient la réactivation virale
LMP2B	II, III	Membranaire	Inconnue

**b. Protéines du cycle productif lytique**

La fabrication d'une particule virale nécessite la synthèse de protéines dites tardives (protéines de structure), précédée obligatoirement par celle de protéines dites précoces et de protéines très précoces (ou « précoces immédiates »). Ces phases d'expression forment une cascade, même si elles peuvent se chevaucher en partie (tableau 2).

**Tableau 2 : Exemples de protéines du cycle lytique et leurs fonctions ou caractères**

<b>Les protéines du cycle lytique</b>	<b>Fonction ou caractère de la protéine</b>
<b>Les protéines précoces</b>	
BSMLF1 et BMRF1	Transactiver l'expression d'autres gènes EBV précoces
BALF2	Protéine majeure de liaison à l'ADN
BHRF1 EA-R nuclear antigen	Composant du complexe antigène précoce
BALF5	ADN polymérase ADN-dépendante
BORF2 et BaRF1	Ribonucléotide réductase
BXLF1	Thymidine kinase
BGLF5	Exonucléase alcaline ou ADNase
BKRF3	Uracile ADN-glycosidase
BGLF4	Protéine kinase Sérine/thréonine
BRRF1, BKRF4 et autres	n'ont pas de fonction connue
<b>Quelques protéines tardives</b>	
BNRF1	Protéine du tégument
BXRF1	Protéine de fusion
BILF2	glycoprotéine
BLLF1	gp350/220
BALF4	glycoprotéine B
BXLF2	glycoprotéine H
ILF2	gp55/80
BDLF3	gp42

#### **4. Réplication productive et cycle lytique**

Le cycle de multiplication de l'EBV dans la cellule suit le schéma classique qui comporte les étapes d'attachement et de pénétration, puis la synthèse des macromolécules (acides nucléiques et protéines), enfin l'assemblage des nucléocapsides, l'enveloppement et la libération des virions infectieux. Toutes ces étapes n'ont pu être étudiées *in vitro* que dans le système cellulaire des lymphocytes B.

La particule virale s'attache spécifiquement à la surface de la cellule grâce à l'interaction entre la gp350/220 de l'enveloppe virale et la molécule CD21 présente sur la membrane plasmique cellulaire. Ce récepteur CD21 (ou CR2), un récepteur physiologique du

complément, fait partie de la superfamille des immunoglobulines et est exprimé sur les lymphocytes B matures. La fixation du virus sur CD21 induit les signaux initiaux d'activation des cellules. Une fois attachée, l'enveloppe virale fusionne avec la membrane cellulaire et la pénétration requiert l'interaction du complexe gp85-gp42. L'EBV peut utiliser comme corécepteurs les molécules HLA-DR, -DP ou -DQ (57). La nucléocapside, libérée dans le cytoplasme, migre en direction des pores nucléaires et se désintègre progressivement pour laisser la molécule d'ADN viral seule entrer dans le noyau.

Les synthèses aboutissant ensuite à la fabrication de nouveaux virions ne se produisent que dans un petit nombre de lymphocytes B. Les gènes « très précoces » du génome viral sont transcrits, notamment les facteurs de transcription nucléaires (BZLF1 - ou ZEBRA - et BRLF1), ce qui conduit à l'activation de l'expression des gènes précoces. Les produits de ces derniers, comme l'ADN-polymérase virale et d'autres enzymes responsables de la synthèse de l'ADN, répliquent l'ADN à partir de l'origine de répllication « lytique » (ou Ori-Lyt). C'est à partir de ces nouvelles molécules linéaires de génome EBV que les gènes tardifs sont transcrits : les protéines synthétisées sont celles de la capsidie et des glycoprotéines de l'enveloppe. La molécule de génome est incorporée à l'intérieur d'une capsidie presque terminée pour constituer la nucléocapsidie. Cet assemblage a lieu dans le noyau cellulaire et nécessite une protéase codée par le virus. Les nucléocapsides rencontrent, au cours de leur migration en direction de la surface de la cellule, les membranes nucléaires et/ou intracytoplasmiques dans lesquelles elles bourgeonnent. L'acquisition définitive de l'enveloppe précède la libération du virion dans le milieu extracellulaire et la lyse de la cellule.



## **5. Immortalisation, transformation et lignées lymphoïdes**

Si le cycle productif que nous venons de voir est comparable à celui d'autres herpesvirus, l'immortalisation par l'EBV demeure une propriété remarquable et unique : c'est le plus puissant agent immortalisant les cellules de mammifères.

Dès une douzaine d'heures après la pénétration du virus dans le lymphocyte B, la protéine EBNA-2 est exprimée et active les gènes codant les LMPs ; la synthèse des marqueurs d'activation lymphocytaire CD21 et CD23 est induite. En 48 heures, l'expression de l'ensemble des gènes latents est achevée. La cellule progresse dans les phases G1, S et G2, et vers 72 heures entre en mitose. Pour que l'ADN viral soit constamment présent dans chaque cellule fille, il doit se répliquer de façon synchrone au dédoublement du génome cellulaire. C'est le rôle de la protéine EBNA-1 qui se lie à la seconde origine de réplication dite plasmidique (ou Ori-P) du génome EBV et l'active ; la stabilité du nombre de copies au cours des divisions cellulaires successives est donc assurée. Le génome viral se maintient en général sous forme extrachromosomique circulaire (= épisome) en plusieurs copies ; il peut parfois s'intégrer dans un chromosome cellulaire.

Ces lymphocytes B infectés prolifèrent indéfiniment et donnent naissance à une population « immortalisée » de cellules qu'on appelle lignée lymphoblastoïde (exemples de lignées dans le tableau 3).

On s'est beaucoup servi – et encore aujourd'hui – des lignées immortalisées pour étudier des caractères phénotypiques ou génotypiques particuliers que possèdent les lymphocytes B lors de certaines maladies. Dans ce cas, les lymphocytes du sang circulant du patient sont inoculés *in vitro* avec l'EBV produit par la lignée lymphoïde B95-8 : les cellules lymphoblastoïdes prolifèrent à l'infini et permettent de disposer de quantités très importantes de matériel cellulaire contenant l'anomalie à étudier. On peut faire produire également dans le milieu de culture des immunoglobulines humaines à spécificité anticorps définie.

**Tableau 3 : Quelques lignées lymphoïdes utilisées au laboratoire, en particulier pour le diagnostic sérologique par immunofluorescence**

Nom	Origine	Ag (ou virus) produits	Applications
B95-8	Lymphocytes de singe immortalisés par l'EBV de MNI	. Ag VCA dans les cellules . virions immortalisants dans le milieu de culture	. détection des Ac anti-VCA . établissement de nouvelles lignées lymphoblastoïdes
P3HR-1	lymphome de Burkitt	. Ag VCA dans les cellules . virions non immortalisants dans le milieu de culture	. détection des Ac anti-VCA
Raji	lymphome de Burkitt	. Ag EBNA dans les cellules . Ag EA après induction	. détection des Ac anti-EBNA . détection des Ac anti-EA
BJAB	lymphome de Burkitt probable	lignée EBV-négative	. contrôle pour réaction d'EBNA
Namalwa	lymphome de Burkitt	infection latente  2 copies de génome EBV par cellule	lignée la plus utilisée comme gamme  étalon pour la quantification génomique

### III. Les modes de transmission de l'EBV

Il est bien établi que la transmission de l'EBV se fait principalement par voie salivaire. Les autres modes de contamination sont moins connus. Dans une étude prospective effectuée dans un internat militaire sur une période de 2 ans, Hallee et al. (58) ont étudié le mode de transmission de l'EBV entre des sujets atteints de MNI et des sujets séronégatifs, en distinguant 2 groupes chez ces derniers : les sujets séronégatifs exposés considérés comme ceux partageant la même chambre, la même classe, la même cantine ou le même office religieux que les sujets MNI ; les sujets séronégatifs non exposés étant ceux n'ayant pas de contact rapproché avec les sujets MNI. Les résultats obtenus montrent qu'il n'y avait pas de différence significative entre les deux groupes. Cette étude confirme donc les investigations précédentes effectuées sur la transmission intra-familiale de l'EBV qui suggèrent que les sujets MNI sont très peu contagieux en dehors du contexte d'un contact intime (137).

L'EBV a été détecté dans les sécrétions génitales de sujets sains EBV-séropositifs (144) mais la transmission sexuelle de l'EBV reste controversée car difficile à démontrer. Van Baarle et al. (160) ont montré que l'EBV de type 2 détecté plus fréquemment chez les homosexuels est directement lié aux pratiques sexuelles de cette catégorie de la population. Plus récemment, Crawford et al. (27) ont tenté d'établir une relation entre le comportement sexuel de 1006 étudiants et la survenue de la MNI de manière rétrospective. Là aussi l'auteur n'a pas pu déterminer clairement si la transmission de l'EBV a lieu lors du baiser ou durant l'activité sexuelle ou les deux.

De rares cas de transmission de l'EBV par transfusion sanguine ont été rapportés (62, 156). La transmission de l'EBV lors des greffes d'organes ou de cellules de moelle osseuse n'est pas rare chez les enfants EBV-séronégatifs, car ils sont statistiquement plus souvent greffés avec des cellules d'un sujet séropositif.

La durée de contagion des patients MNI a été pendant longtemps méconnue. Dans une étude prospective récente l'équipe de virologie du CHU de Grenoble a montré que ces patients sont très contagieux pendant au moins 6 mois, voire un an après le début des symptômes (41).

#### **IV. Les cellules cibles de l'EBV**

La présence de l'ADN et des ARN EBV dans les cellules épithéliales de l'oropharynx, décrite chez les patients MNI (145) suggérait que les cellules épithéliales étaient la première cible de l'EBV et le principal site de la réplication virale. En se basant sur ces données et sur la détection constante de l'EBV dans les cellules épithéliales du carcinome indifférencié du nasopharynx, et de la leucoplasie orale chevelue, on a proposé que les cellules épithéliales, en plus des lymphocytes B, soient un site de persistance de l'EBV (7). Cependant, l'utilisation de nouvelles techniques plus sensibles remet en cause cette hypothèse. L'hybridation *in situ*,

l'immunohistochimie et la PCR sur les cellules des glandes salivaires et des amygdales des patients MNI (8, 70, 112) ont montré que l'EBV a un lymphotropisme strict lors de la primo-infection, et que la persistance du virus a lieu principalement dans les cellules B mémoires (64). Les débats sur le double ou le mono-tropisme de l'EBV ne sont pas clos.

Faulkner et al. (45) ont présenté un modèle sur le transit de l'EBV depuis l'oropharynx jusqu'aux cellules B lors de la primo-infection, l'EBV pourrait traverser l'épithélium par transcytose ou emprunter les cryptes de l'épithélium oropharyngé afin d'infecter les cellules B en contact immédiat avec celui-ci. Les cellules B infectées vont ensuite proliférer en exprimant la totalité des gènes de latence. Contre ces cellules B infectées, se développera alors une réponse immune essentiellement représentée par les cellules T cytotoxiques (CTL). Certaines cellules B infectées échapperont au système immunitaire et abriteront l'EBV cette fois sous forme de latence stricte : ce sont les cellules mémoires qui persisteront toute la vie. Ces cellules empruntent ensuite les vaisseaux lymphatiques puis accèdent au sang circulant. Au cours du cycle cellulaire, certaines cellules mémoires infectées retournent dans les amygdales, se différencient en plasmocytes et réactivent l'EBV. Comme les plasmocytes sont en contact direct avec le lymphoépithélium, les virions EBV qu'ils libèrent accèdent par ce biais directement à la salive.

Plus récemment, Borza et al. (16) ont décrit un autre modèle qui pourrait aplanir les controverses concernant le tropisme cellulaire de l'EBV. Les cellules épithéliales seraient probablement les premières cellules cibles de l'EBV lors de la primo-infection, cette infection ayant lieu au cours de la période d'incubation – silencieuse – qui est de 4 à 6 semaines. Il s'agirait d'un phénomène transitoire car les cellules épithéliales sont incapables de maintenir de l'EBV latent sous forme épisomale, comme cela a été démontré *in vitro* (145). Le virus présent dans ces cellules sous forme répliquative lytique induit la production de virions et la lyse cellulaire. Les virus relargués par les cellules épithéliales infectent ensuite les

lymphocytes B présents dans le tissu lymphoïde. Toutes les cellules infectées par l'EBV, notamment les cellules épithéliales, sont la cible de la très forte réponse immunitaire qui précède l'apparition des symptômes de la MNI (20). Seules les cellules infectées qui n'expriment aucune protéine de latence virale (latence 0) échapperont à la réponse immunitaire. Par ce biais, le virus est détecté uniquement dans les cellules B mémoires pendant la phase symptomatique de la MNI, ce qui expliquerait pourquoi les équipes citées précédemment n'ont jamais pu détecter le génome EBV dans les cellules épithéliales au cours de la MNI.

## **V. La persistance de l'EBV**

Après la primo-infection, l'EBV persiste toute la vie dans l'organisme, le plus souvent sans aucune conséquence pathologique apparente pour l'hôte infecté : on peut ainsi parler de « persistance normale du virus chez l'individu ». Cette cohabitation pacifique est le résultat d'un équilibre complexe entre 3 phénomènes :

1. L'infection virale se manifeste sous deux formes complémentaires : latente et productive. La forme latente se caractérise par l'expression limitée des protéines dénommées protéines de latence sans production de nouveaux virions par la cellule infectée. Le nombre des protéines de latence exprimées est variable selon la cellule infectée et définit plusieurs types de latence. Dans l'infection productive, de nombreuses protéines dénommées protéines du cycle lytique sont exprimées de façon séquentielle. Elle aboutit, lorsque l'expression est complète, au relargage par la cellule de nouvelles particules virales infectieuses ainsi qu'à

la lyse de cette cellule. Les deux types d'infection sont possibles dans les lymphocytes B et probablement dans certaines cellules épithéliales.

2. La biologie normale des lymphocytes B comprend des mécanismes de différenciation et d'activation dans le tissu lymphoïde en particulier au niveau de l'oropharynx qui conditionnent les différentes formes d'infection virales citées plus haut.
3. La réponse immunitaire anti-EBV, elle, sans pouvoir éradiquer l'infection, contrôle la quantité de virions libres et le nombre de cellules infectées dans l'organisme.

A l'opposé de cette persistance asymptomatique, la notoriété de l'EBV, depuis sa découverte dans les lignées cellulaires issues du lymphome de Burkitt, tient au fait que le génome viral et certaines protéines de latence, oncogéniques expérimentalement, sont retrouvés avec une grande fréquence dans certains lymphomes et carcinomes chez l'homme. On parle alors de cancers associés à l'EBV. L'infection virale étant ubiquitaire dans la population générale, et le virus étant « normalement » lymphotrope et épithéliotrope, les critères de cette association sont complexes et encore discutés. Cependant, le rôle dans certains cancers semble bien établi et, dans l'histoire de la médecine, l'EBV restera le premier virus humain à être associé à des cancers. Cette association est le résultat d'un déséquilibre entre les 3 phénomènes cités plus haut.

## **VI. Les maladies causées par l'EBV**

### **1. La mononucléose infectieuse**

Au milieu des années 60, les chercheurs Werner et Gertrude Henle travaillant sur l'EBV, montrèrent, grâce aux techniques sérologiques d'immunofluorescence et de fixation du complément, que les anticorps dirigés contre l'EBV étaient non seulement détectables chez les africains atteints de lymphome de Burkitt mais aussi dans 85 % de la population adulte des Etats-Unis. En 1968, un technicien de leur laboratoire, séronégatif pour l'EBV, développa une MNI ; son sérum prélevé après la maladie était devenu positif. L'EBV fut définitivement reconnu comme l'agent étiologique de la MNI, à la suite d'études séro-épidémiologiques rétrospectives menées chez les étudiants d'universités américaines.

Dans les années 70, Chang and Golden (22) et Pereira et al. (121) montrèrent la présence de particules virales transformantes dans la salive des patients MNI. D'autres études suivirent et confirmèrent la présence de virions infectieux dans la salive de tous les patients MNI au cours de la phase aiguë (9, 167).

Plusieurs études ont tenté de mettre en évidence les facteurs impliqués dans la survenue ou non d'une MNI, au cours d'une primo-infection EBV. L'étude épidémiologique de Borer et al. (15) a montré une corrélation positive entre le niveau socio-économique élevé et la survenue de la MNI ; les auteurs expliquent cette tendance par l'amélioration des conditions d'hygiène, qui entraîne une exposition plus tardive au virus.

Après une période d'incubation de 4 à 8 semaines, la MNI se présente sous forme de : fièvre, angine ou rhinopharyngite, polyadénopathies particulièrement au niveau du cou, et asthénie prolongée.

En plus des symptômes classiques, malaises et migraine ont été rapportés dans 50 % des cas de MNI (133). La toux, les arthralgies, les myalgies, les nausées et la somnolence surviennent

moins fréquemment (<10 % des cas). La splénomégalie est rapportée dans plus de 50 % des cas, la fréquence de l'hépatomégalie varie entre 7 % et 90 % selon les études (120, 133).

La MNI se complique parfois par des manifestations aiguës ou chroniques graves. Schématiquement, le mécanisme de ces complications est dû soit à une réponse immune exagérée, soit à une réponse immune insuffisante incapable de contrôler la prolifération des lymphocytes B infectés. L'une de ces complications est le syndrome hémophagocytaire. Ce syndrome grave est souvent fatal. Il est caractérisé par une fièvre persistante et une hépatosplénomégalie accompagnées de cytopénie, coagulopathie et hyperferritinémie.

## **2. Le syndrome lymphoprolifératif lié au chromosome X (XLP) ou syndrome de Purtilo**

Décrit par Purtilo en 1974 (127) le syndrome lymphoprolifératif lié au chromosome X (XLP) est caractérisé par une altération de l'immunosurveillance de l'EBV. Il s'agit probablement d'une prolifération polyclonale des lymphocytes B et des lymphocytes T CD8.

Le syndrome de Purtilo touche les jeunes garçons. Il se manifeste en général par une MNI typique, avec fièvre, adénopathies et hépatosplénomégalie, qui évolue très rapidement vers une hépatite fulminante accompagnée d'une aplasie médullaire entraînant la mort dans 40 % des cas. Il se manifeste aussi dans 25 % des cas d'emblée par un lymphome B non hodgkinien. Au total 70 % des enfants de sexe masculin atteints de ce syndrome meurent avant l'âge de dix ans. Mais en l'absence d'infection par l'EBV, les enfants portant ce déficit génétique présentent une réponse immunitaire normale.

La cause génétique de ce déficit a été identifiée en 1998 (138). Il s'agit d'un gène, localisé au niveau du chromosome X dans la région Xq25, qui code pour une protéine intervenant dans les mécanismes physiologiques d'activation lymphocytaire T. Cette protéine appelée SH2D1A (*SH2 domain protein 1A*) interagit avec la « SLAM » (*signaling lymphocyte*



*activation molecule*) ; il en résulte une perturbation de l'immunité à médiation cellulaire anti-EBV.

### **3. L'infection chronique active à EBV (CAEBV)**

Classiquement, après la phase aiguë de la primo-infection, qu'elle soit symptomatique ou non, l'EBV persiste sous forme silencieuse dans l'organisme et est rarement responsable de récurrence symptomatique chez les sujets immunocompétents. L'infection chronique active à EBV, connue sous le nom de CAEBV (Chronic Active EBV Infection), est définie comme une infection chronique ou une mononucléose récurrente grave dont les symptômes persistent plus d'un an. C'est une affection rare (0,01 à 0,1 %) qui survient chez les sujets immunocompétents, avec une fréquence plus élevée au Japon.

Du point de vue virologique, la CAEBV est toujours associée à la présence d'un taux d'anticorps anti-EBV élevé (en particulier anti-EA et anti-VCA), suggérant une réplication virale active, et/ou d'une forte charge virale EBV dans le sang périphérique et dans les tissus atteints. L'analyse de tissus provenant de lymphomes T ou NK post-CAEBV a montré une expression des protéines de latence EBV de type II ou III, et la présence d'ARN messagers Zebra et BCRF-1(VIL10) (72).

### **4. La leucoplasie orale chevelue (OHL)**

Elle se manifeste chez les personnes infectées par le VIH. C'est une lésion localisée au niveau des cellules épithéliales des bords latéraux de la langue. Le virus se réplique alors de façon productive (lytique) dans ces cellules (53). Cliniquement, elle se caractérise par des stries blanchâtres, verticales et parallèles. Elle est occasionnellement observée chez des patients transplantés.

## VII. Les maladies associées à l'EBV

### 1. Le Lymphome de Burkitt (LB)

C'est un cancer (19) qui touche principalement les enfants. Classiquement, il existe deux formes de LB : la « forme endémique » fréquente dans les pays africains équatoriaux et en Nouvelle Guinée-Papouasie, la forme « sporadique » rencontrée beaucoup plus rarement dans les pays occidentaux. Dans ces 2 formes, la cellule lymphomateuse dérive d'un lymphocyte B probablement issu des centres germinatifs. Ce lymphocyte malin comprend dans tous les cas l'une des 3 translocations suivantes : t(8;14) (la plus fréquente), t(2;8), t(8;22) qui mettent l'oncogène *c-myc* (présent sur le chromosome 8) sous la dépendance des gènes des chaînes lourdes (chromosome 14) ou légères (chromosome 2 ou 22) des immunoglobulines. Ces translocations conduisent à une hyper-expression de l'oncogène *c-myc*.

Cliniquement, ces deux formes se révèlent le plus souvent par des manifestations extra-ganglionnaires avec des différences toutefois : l'atteinte de la mâchoire est très fréquente dans les formes endémiques avec une sensibilité plus grande à la chimiothérapie. L'atteinte digestive et l'envahissement médullaire sont plus fréquents dans la forme sporadique. L'atteinte ganglionnaire est fréquente dans les LB se développant dans le contexte spécifique de l'infection VIH.

L'EBV est associé au lymphome de Burkitt endémique dans près de 100 % des cas. A l'inverse, l'EBV n'est détectable que dans 15 à 20 % des cas de LB sporadique, sauf dans le cas particulier du LB chez le VIH où la fréquence de détection avoisine les 30 à 40 %.

Quelle que soit la fréquence de détection du génome viral, seuls la protéine EBNA1 et les ARN EBERs sont exprimés dans les cellules tumorales, ce qui définit la latence de type I. Du

fait de ces différences dans le taux de détection du génome viral et du fait d'une expression virale limitée à EBNA1, le rôle du virus dans cette tumeur reste controversé.

## **2. Les syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation (PTLD)**

Le syndrome lymphoprolifératif post-transplantation (PTLD, pour Post Transplant Lymphoproliferative Disease) inclut par définition toutes les lymphoproliférations qui surviennent après une greffe d'organe ou de moelle osseuse. Globalement, entre 80 à 90 % des ces tumeurs sont associées à l'EBV qui est le facteur étiologique prédominant.

L'incidence des PTLDS dépend essentiellement du type de tissu greffé, du statut immunitaire du couple receveur-donneur, de l'âge du receveur, du type d'immunodépresseurs anti-rejets utilisés, et d'autres facteurs moins importants. A immunodépression équivalente, les PTLDS sont plus fréquents dans les greffes de poumon ou d'intestin, ce qui pourrait s'expliquer par la grande quantité de tissu lymphoïde dans ces organes. La primo-infection chez un receveur EBV-séronégatif greffé avec un greffon d'un donneur séropositif est un facteur de risque important : lors des greffes d'organe, les greffés EBV-séronégatifs présentent un risque de PTLDD 10 à 76 fois plus élevé que les greffés EBV-séropositifs.

Enfin, le statut sérologique EBV des transplantés de moelle semble moins influencer l'incidence du PTLDD puisque c'est le greffon qui apporte à la fois l'EBV et les cellules anti-EBV. La fréquence des PTLDD sur ce terrain dépend donc essentiellement du type de greffe (B- ou T- déplété) et du traitement immunosuppresseur.

## **3. Les Lymphomes Malins Non-Hodgkiniens (LMNH) des patients VIH-positifs**

L'incidence des LMNH chez les patients infectés par le VIH est 60 fois plus élevée que dans la population générale. Globalement, le génome EBV est détectable dans les cellules

tumorales dans 60 à 70 % de l'ensemble des cas de LMNH des patients VIH mais cette fréquence varie selon le type histologique et la localisation du LMNH. On distingue schématiquement 3 types de LMNH dans ce contexte : (i) le LMNH à grandes cellules et à cellules immunoblastiques, (ii) le lymphome de Burkitt et les formes apparentées, (iii) le lymphome primitif des séreuses. Les LMNH à grandes cellules et les LMNH immunoblastiques sont les tumeurs rencontrées le plus fréquemment même si leur incidence tend à diminuer depuis les multithérapies anti-VIH. Ces LMNH surviennent en effet le plus souvent sur un terrain fortement immunodéprimé, contrairement au lymphome de Burkitt, avec des localisations extraganglionnaires fréquentes et un mauvais pronostic.

En ce qui concerne les LMNH cérébraux primitifs la mise en évidence du génome viral dans le LCR en cas de suspicion est un élément très en faveur de la nature lymphomateuse du processus expansif intra-crânien et pourrait, pour certains, éviter la biopsie cérébrale si celle-ci s'avérait trop dangereuse. A noter dans ce contexte, certains cas publiés d'efficacité des antiviraux dans des processus tumoraux intra-crâniens associés à l'EBV.

#### **4. Le Carcinome Indifférencié du Nasopharynx (NPC)**

Le carcinome indifférencié du nasopharynx (172) (ou carcinome du nasopharynx de type III selon la classification OMS) est une tumeur qui se développe aux dépens de l'épithélium de la cavité rétronasale, d'où les signes cliniques d'appel insidieux et une découverte le plus souvent au stade d'une métastase ganglionnaire cervicale.

Le génome complet de l'EBV a été détecté à l'intérieur des cellules tumorales dans presque 100 % des biopsies de NPC. Cette fréquence de détection fait de cette tumeur le cancer le plus fréquemment associé à l'EBV. Le virus exprime des protéines potentiellement oncogènes à l'intérieur de la cellule tumorale. La protéine EBNA1 et les ARN non codants EBERS sont présents dans 100 % des cas, les protéines LMP2A et 2B dans 75 % des cas, la protéine

LMP1 dans 50 à 65 % des cas. Quoi que qu'il en soit, cette expression correspond à une latence de type II et il est admis que cette latence participe au maintien du phénotype malin. De manière intéressante, la présence de plusieurs protéines du cycle lytique, notamment les protéines très précoces ou précoces comme ZEBRA, EB2, BARF1, a été rapportée dans les tumeurs. Le rôle du cycle lytique, d'ailleurs induit par les facteurs alimentaires cités plus haut, dans le maintien du phénotype transformé de la cellule est en cours d'exploration.

## **5. La Maladie de Hodgkin (MH)**

La maladie de Hodgkin (MH) ou lymphome de Hodgkin est définie par la présence, au sein des ganglions, d'une cellule anormale la cellule de Reed-Sternberg (RS), cellule lymphoïde d'origine B. Cette cellule tumorale est faiblement représentée au sein de la tumeur (1 % des cellules) au milieu d'un tissu réactionnel important de lymphocytes non tumoraux T et B avec ou sans fibrose. En fonction de l'organisation de ce tissu réactionnel, deux types de MH sont décrits : la MH classique (95 % des cas) et la MH nodulaire à prédominance lymphocytaire.

Le risque de développement de MH classique chez le patient VIH est 3 à 6 fois supérieur à celui de la population non VIH et l'association avec l'EBV est également plus fréquente atteignant 90 % sur ce terrain. Les MH survenant dans d'autre contexte d'immunodépression (Greffé, immunodépression congénitale) sont également la plupart du temps associés à l'EBV. Dans des pays en développement, la fréquence d'association avec l'EBV est également plus importante et peut atteindre 100 % dans certaines études.

En général, dans les MH associées à l'EBV, trois protéines de latence de l'EBV sont exprimées dans les cellules de RS : EBNA1, LMP1 et LMP2 (inconstamment) et les ARN non codants EBERs ce qui correspond à une latence virale de type II.

## **6. Autres tumeurs associées à l'EBV**

L'association de l'EBV à d'autres types de lymphomes ou de carcinomes a aussi été évoquée, dont certains lymphomes T, certains carcinomes de l'estomac ou du sein.

Suite à ce rappel sur les propriétés biologiques de l'EBV, nous aborderons dans les parties suivantes les différentes études qui ont été réalisées sur les antiviraux anti-EBV, que ce soit en culture cellulaire ou *in vivo*.

**L'évaluation *in vitro* et *in vivo* des antiviraux contre le virus d'Epstein-Barr**

## Introduction

Les virus sont des parasites intracellulaires stricts. Ils ne peuvent donc se multiplier qu'à l'intérieur d'une cellule hôte en détournant à leur profit la machinerie cellulaire. Le but de la chimiothérapie antivirale est l'élaboration de molécules actives capables d'inhiber l'activité d'un virus tout en ayant un effet minimal sur la fonction de la cellule hôte.

Ces dernières décennies, des progrès considérables ont été réalisés dans ce domaine, aboutissant à une grande amélioration du traitement des maladies virales. En ce qui concerne l'EBV, il n'y a pas actuellement d'agents antiviraux validés pour l'usage clinique. D'ailleurs, les quelques études qui ont été réalisées *in vivo* n'ont pas permis de trancher en faveur de l'utilisation d'un antiviral ou d'un autre. Cependant, le nombre croissant des malades immunodéprimés (transplantation, SIDA) susceptibles de développer des maladies associées à l'EBV, montre l'importance du développement de nouvelles molécules antivirales efficaces contre la réplication du virus. La sélection de molécules actives ayant des propriétés pharmacologiques adaptées (faible toxicité, effets prolongés et bonne biodisponibilité par voie orale) est donc essentielle.

Dans ce but, de nombreux tests *in vitro* ont été mis au point pour l'analyse de différents antiviraux d'activité reconnue contre d'autres virus, ou pour cribler de nouvelles drogues ; mais ces essais sont souvent fastidieux et ne permettent de tester qu'un nombre restreint de molécules.

Le but de cette partie est de faire un état des lieux de l'évaluation *in vitro* et *in vivo* des antiviraux anti-EBV, en rappelant dans un premier temps le métabolisme et le mécanisme d'action des trois grandes classes d'antiviraux qui ont été largement testées contre ce virus. Dans un second temps, nous développerons les différentes méthodologies utilisées dans les



tests *in vitro*, pour ensuite comparer les résultats obtenus pour les différentes drogues testées.

Enfin, nous exposerons une synthèse des études qui ont été réalisées *in vivo*.

## **I. Métabolisme intracellulaire et mécanisme d'action des antiviraux**

De nombreuses études ont montré que les trois composés antiviraux : le ganciclovir (GCV) (voir figure 3), le cidofovir (HPMPC) (voir figure 4), et le foscarnet (PFA) (voir figure 5) ont une certaine efficacité anti-EBV que ce soit *in vitro* ou *in vivo* (voir les parties suivantes). Ces composés appartiennent à trois grandes classes antivirales qui sont respectivement : les analogues des nucléosides, des nucléotides, et du pyrophosphate. Pour ces raisons, nous avons choisi dans notre étude expérimentale, de tester leur action contre l'EBV pour pouvoir mettre au point un modèle de système d'évaluation de l'action antivirale en culture cellulaire.

Dans cette partie, nous présenterons un rappel sur le métabolisme intracellulaire et le mécanisme d'action de ces trois grandes classes qui ont été largement testées contre l'EBV en culture cellulaire ; en insistant sur ceux du GCV, du HPMPC et du PFA.

### **1. Les analogues des nucléosides**

Ce sont des composés qui nécessitent d'être phosphorylés intracellulairement en trois étapes successives avant d'interagir avec leur enzyme cible. Ils sont sélectivement phosphorylés en monophosphates (ex. aciclovir (ACV), GCV) ou diphosphates (ex. brivudine (BVDU), BVaraU) par une thymidine kinase (TK) codée par le virus (ex. HSV, VZV) ou une protéine kinase (PK) comme dans le cas du HCMV qui ne code pas une TK virale. Ces mono- et diphosphates sont phosphorylés ultérieurement par des kinases cellulaires en formes triphosphates actives (ex. GCV-TP). Ces formes sont ensuite capables de bloquer la synthèse de l'ADN viral en interagissant avec l'ADN polymérase virale (110). Cependant, des études ont montré que la TK-EBV et la TK-HHV-8 ont une faible spécificité pour certains composés (GCV, ACV), avec un avantage clair pour les analogues des nucléosides tels que les dérivés

de thymidine (55, 56, 159). Malgré ceci, l'ACV et le GCV (l'analogue 2-hydroxyméthyle de l'ACV) se sont révélés parmi les molécules de cette classe les plus efficaces contre l'EBV en culture cellulaire (voir partie suivante).

En ce qui concerne le mécanisme d'action de ces molécules, elles inhibent l'ADN polymérase virale des herpesvirus. Ceci se fait selon l'un des trois modes suivants : 1) par inhibition directe de l'ADN polymérase virale par compétition avec les nucléosides triphosphates naturels (dGTP dans le cas des triphosphates de l'ACV, du GCV et du penciclovir (PCV) ; qui sont des analogues de la déoxyguanosine), 2) par incorporation à l'extrémité 3' de la chaîne d'ADN viral empêchant ainsi son élongation ultérieure : effet terminateur de chaîne (ex. les triphosphates de l'ACV), 3) par coupure du brin d'ADN après incorporation du nucléotide non naturel (ex. les triphosphates du GCV, du BVDU) dans l'ADN viral (grâce à la présence d'une fonction hydroxyle qui est équivalente au groupe 3'-OH des nucléotides réguliers). En revanche, ils ont une faible affinité pour les ADN polymérases cellulaires par comparaison avec l'ADN polymérase virale (34, 109).

## **2. Les analogues des nucléotides**

Ce sont des molécules qui contiennent un groupe phosphonylméthyle [O-CH<sub>2</sub>-P(O)(OH)<sub>2</sub>] alors que les nucléotides réguliers contiennent un groupe phosphate méthyle [CH<sub>2</sub>-O-P(O)(OH)<sub>2</sub>]. Contrairement à la liaison C-O-P dans ces derniers, la liaison C-P dans les analogues nucléotidiques est stable ; elle ne peut donc pas être clivée par hydrolyse par les phosphomonoesterases avant qu'ils puissent entrer dans les cellules. Grâce à cette structure particulière de ces composés, ils ne nécessitent pas l'implication d'une TK virale dans leur métabolisme intracellulaire (110). Une fois à l'intérieur de la cellule, deux étapes de phosphorylation se déroulent après l'action d'enzymes cellulaires, aboutissant alors à la formation de métabolites diphosphorylés actifs (ex. HPMPCpp, PMEApp). Concernant le

HPMPC, la première phosphorylation se fait par une pyrimidine nucleoside monophosphate (PNMP) kinase. Cependant, une nucleoside diphosphate (NDP) kinase, une pyruvate kinase ou une créatine kinase intervient pour accomplir la deuxième phosphorylation. Ces deux étapes ont lieu dans les cellules non infectées, mais de façon beaucoup plus accentuée dans les cellules infectées par les herpesvirus (32).

Sous leurs formes actives, les analogues nucléotidiques agissent comme inhibiteurs compétitifs ou substrats alternatifs au niveau de l'ADN polymérase virale. Le HPMPC agit comme terminateur de chaîne suite à son incorporation à l'extrémité 3' de la chaîne d'ADN viral (deux incorporations séquentielles sont nécessaires pour la terminaison de chaîne comme démontré dans le cas de la synthèse de l'ADN HCMV) (33).

### **3. Les analogues du pyrophosphate**

Ce sont des analogues (PFA, PAA ou acide phosphonoacétique) inorganiques du pyrophosphate. Contrairement, aux composés des deux classes citées ci-dessus, ils ne nécessitent aucune phosphorylation intracellulaire. Concernant le PFA, il agit comme un inhibiteur d'une façon non compétitive avec les substrats naturels de l'ADN polymérase virale (29, 83, 114) se liant au niveau du site de liaison du pyrophosphate (PPi) sur celle-ci (28, 29, 134). La présence de PPi dans la réaction synthétique de l'ADN réduit significativement l'action du PFA. L'ADN polymérase de l'EBV nécessite 5-6 fois plus de PFA pour 50 % d'inhibition en présence de 0.5 mM de PPi (29). Cette liaison empêche donc le clivage du PPi à partir des dNTPs ce qui termine l'élongation de la chaîne d'ADN viral (134). Il est important de signaler que le PFA inhibe préférentiellement les ADN polymérases d'origine virale (EBV, HSV, VZV, CMV) par comparaison avec les ADN polymérases des cellules hôtes (29, 83).

### Figure 3 : Ganciclovir

C'est un analogue de la désoxyguanosine.

- **Dénominations :**

Les différentes dénominations qui ont été retrouvées dans la littérature sont :

BW759U  
BW B759U  
BIOLF-62  
2' NDG (2'-nor-2' désoxyguanosine)  
DHPG (dihydropropoxymethylguanine)  
GCV  
Cymévan

- **Poids moléculaire :**

225.23

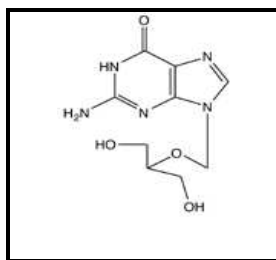
- **Formule chimique :**

9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine

- **Formule moléculaire :**

$C_9H_{13}N_5O_4$

- **Formule structurale :**



## Figure 4 : Cidofovir

C'est un analogue de la désoxycytidine.

- **Dénominations :**

HPMPC  
CDV  
Cidofovir  
Vistide

- **Poids moléculaire :**

315.22 (279.19 anhydre)

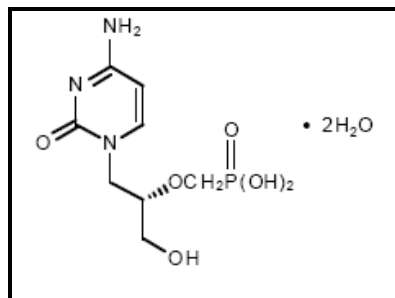
- **Formule chimique :**

[1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine]

- **Formule moléculaire :**

$C_8H_{14}N_3O_6P \cdot 2H_2O$

- **Formule structurale :**



## Figure 5 : Foscarnet

C'est un analogue du pyrophosphate.

- **Dénominations :**

Acide phosphonoformique  
Phosphonoformate trisodique  
PFA  
FSC  
FCV  
FOS  
Foscavir

- **Poids moléculaire :**

300.04

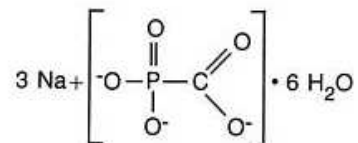
- **Formule chimique :**

Acide phosphonoformique

- **Formule moléculaire :**

$\text{CNa}_3\text{O}_5\text{P} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

- **Formule structurale :**



## **II. Méthodes d'évaluation de l'activité des antiviraux**

Il est intéressant de noter que si les techniques utilisées en virologie ont beaucoup évolué cette dernière décennie, les techniques d'évaluation des molécules anti-EBV sont restées très classiques, et ce n'est que récemment que des systèmes utilisant les nouveaux outils tels que la cytométrie en flux ou la PCR en temps réel ont été utilisés. Peu de systèmes utilisent les protéines recombinantes du virus, et les tests en culture cellulaire restent de mise. Il est donc important, pour comparer les différents essais de faire un bilan des systèmes cellulaires utilisés, en insistant sur l'induction du cycle lytique puisque la majorité des composés antiviraux n'agissent que sur les formes linéaires, lytiques du génome viral ; mais également de prendre en compte le temps d'exposition aux antiviraux. Les différentes technologies utilisées pour évaluer la diminution de la réplication virale seront détaillées par la suite.

### **1. Les systèmes cellulaires**

Voir tableau 4.

Il n'existe pas de système cellulaire complètement permissif pour l'EBV *in vitro*, permettant d'étudier le cycle lytique de l'EBV. En revanche, l'EBV étant le plus puissant agent immortalisant des cellules de mammifères, de nombreux systèmes *in vitro* d'infection latente des lymphocytes B par le virus sont disponibles. Certaines dérivent de lymphomes de Burkitt (ex : lignée Raji), d'autres, les lignées lymphoblastoïdes (LCL), proviennent de la transformation de lymphocytes de sujets EBV séronégatifs par le virus transformant B95-8 ou par des souches cliniques. La lignée B95-8 a la particularité d'être d'origine simienne puisqu'elle est issue de lymphocytes de singe immortalisés par l'EBV. Dans certaines lignées,



appelées « lignées productrices », un faible pourcentage de cellules supportent spontanément le cycle lytique d'EBV (lignée P3HR-1 : environ 10 %, lignée B95-8 : environ 3 %) contrairement aux lignées « non productrices » (lignées Akata, Raji, Daudi). Il est cependant possible d'induire le cycle lytique de certaines lignées non productrices par des méthodes immunologiques (lignée Akata induite par les IgG) (6, 170) biologiques [lignées Daudi ou Raji induites par surinfection par le virus P3HR-1 non transformant (Raji : (84, 88, 90, 157) - Daudi : (132) ] ou chimiques (lignée Raji induite par les esters de phorbol, comme le TPA : 1, 2 tetradecanoylphorbol 13-acetate) associé ou non à l'acide butyrique (BA) (3, 4, 131, 155) ; d'autres inducteurs chimiques peuvent également être utilisés comme l'IUDR (113). Les méthodes chimiques d'induction sont également utilisées pour sur-induire les lignées productrices P3HR-1 et B95-8 (47, 99, 102, 103, 111, 126). L'induction permet d'augmenter le nombre de cellules capables d'assurer le cycle lytique d'EBV c'est-à-dire d'augmenter le nombre de virions excrétés dans le surnageant de culture, le nombre de génomes viraux lytiques sous forme linéaire et le nombre d'antigènes viraux exprimés dans les cellules. De ce fait la visualisation de l'extinction du signal attendu suite à l'action des antiviraux sera améliorée. Dans la plupart des études, l'induction est réalisée en même temps que l'ajout de l'antiviral.

Le temps d'exposition des cellules aux substances antivirales est également un facteur important (voir tableau 5). Le choix du temps de traitement dépend de la lignée cellulaire utilisée, mais également de la technologie mise en œuvre pour mesurer l'effet antiviral. Généralement, les cellules P3HR-1, et les sous clones en dérivant, sont cultivés en présence d'antiviraux pendant 5 à 14 jours lorsque l'analyse ultérieure porte sur la présence d'ADN viral (47, 85, 87, 89-92, 99, 102, 111). En revanche, le temps d'exposition aux antiviraux est de 2 à 5 jours pour l'analyse des protéines virales, qu'il s'agisse de l'expression des protéines (30, 113, 126) ou de l'activité d'une enzyme (126, 165). Récemment, l'équipe de Chang (21)

a mis en évidence un effet antiviral de l'épigallocatechine gallate dans les cellules P3HR-1 après seulement 24h d'incubation avec la molécule, l'induction par la trichostatine intervenant 1h après l'ajout de l'antiviral. Cette équipe utilisait, en parallèle aux méthodes traditionnelles (immunofluorescence (IF), western blot (WB)), des technologies plus récentes telles que la cytométrie en flux pour l'analyse de l'expression des protéines et les puces à ADN pour l'analyse de la transcription des gènes.

Pour les cellules Daudi, Akata, et plus généralement Raji, qui sont principalement utilisées, après induction (chimique ou biologique) pour l'analyse de l'expression des protéines virales, le traitement antiviral est maintenu 3 jours ou moins avant l'évaluation de l'activité antivirale. Il faut noter que le temps d'incubation des cellules Raji surinfectées par le virus P3HR-1 avec les antiviraux reste court (24-48h) même si l'analyse ultérieure porte sur la réduction de l'ADN viral (84, 88).

Enfin, les cellules B95-8 sont rarement utilisées directement pour les tests d'activité des antiviraux, mais plutôt pour leur capacité à produire, dans leur surnageant de culture, des virions transformants utilisés dans les tests de transformation de cellules B, naïves pour l'EBV (cellules de sang de cordon ombilical ou du sang périphérique). Ce test, qui sera développé plus tard, permet également d'évaluer l'activité de molécules antivirales qui seront alors ajoutées sur les cultures de lymphocytes B naïfs pendant toute la durée de l'essai, c'est-à-dire 7 jours, si l'analyse se fait par mesure de l'incorporation de thymidine tritiée, à 6 semaines si l'observation se fait au microscope (Cf plus loin). Cependant, dans deux études, les cellules B95-8 ont été incubées avec les antiviraux. Pour la première (11) le temps d'exposition au penciclovir était de 7 jours, puis les surnageants de ces cultures étaient titrés par transformation des lymphocytes naïfs. Dans la seconde (119) l'expression des gènes d'EBV, dans leur ensemble, étaient analysés après 24 ou 48h en présence de l'hydroxyurée.

**Tableau 4 : Principales lignées EBV (avec ou sans induction du cycle lytique) citées dans les études *in vitro***

<b>Lignées EBV</b>	<b>Induction du cycle lytique</b>	<b>Référence</b>
<b>Lignées lymphomateuses productrices</b>		
P3HR-1	Sans induction	(11, 14, 26, 29, 84, 86, 89-91, 99, 103, 105, 106, 113)
	TPA (20 ou 30 ng/mL)	(47, 102, 103, 111, 126)
	TPA (20 ng/mL) + n-butyrate (3 mM)	(126)
	TPA (30 ng/mL) + Na-butyrate (3 mM)	(99)
	Phorbol-12,13-dibutyrate (50 nM) + n-butyrate (4mM)	(82)
	Trichostatin A ( TSA) (300 nM)	(21)
	IUDR (20 µg/mL), en présence d'hypoxantine (14 µg/mL) et d'aminoptérine (0.4 µg/mL)	(126)
P3HR-1 (LS)	Sans induction	(85, 87, 88)
H1	Sans induction	(24, 25, 92, 128, 165, 171)
P3PFA	TPA (20 ng/mL) + n-butyrate (3 mM)	(126)
	IUDR (20 µg/mL), en présence d'hypoxantine (14 µg/mL) et d'aminoptérine (0.4 µg/mL)	(126)
B95-8	Sans induction	(11, 42, 46, 81, 100, 113, 135, 151, 157)
<b>Lignées lymphomateuses latentes</b>		
Daudi	Sans induction	(78, 171)
	Surinfection par le virus de P3HR-1	(132)
	TPA (20 ng/mL) + Na-butyrate (3 mM)	(42)
Raji	Sans induction	(11, 26, 29, 84, 91, 151)
	TPA (32 pM) + 4 mM acide n-butyrique	(3, 4, 38, 67, 68, 107, 117, 131, 136, 155)
	Surinfection par le virus de P3HR-1	(29, 76, 84, 86, 87, 89, 90, 157)
	Surinfection par le virus de P3HR-1 (LS)	(88)
	Surinfection par le virus de HR1-K	(26)
	IdUrd (50 µg/mL)	(113)

Akata	IgG	(6) (170)
<b>Lignées lymphoblastoïdes</b>		
Lymphocytes du sang périphérique ou du cordon ombilical immortalisés par le virus B95-8	Sans induction	(6, 11, 46, 113, 135, 157)

**Tableau 5 : Durées du traitement par les antiviraux anti-EBV utilisées dans les études *in vitro***

<b>Durée du traitement antiviral</b>	<b>Technique ou méthodologie</b>	<b>Référence</b>
4h	Mesure de la production et de l'infectivité du virus	(84)
5h (antiviral à 0 h après adsorption du virus)	IF : détecter EA/VCA	(84)
12h	Western Blot : détecter EA-D	(170)
24h	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide : détecter les polypeptides associés à l'EBV	(87, 90, 91)
	IF : détecter EA/VCA	(84)
	IF : détecter EA-D, Rta, Zta, et EBNA-1	(21)
	Puce à ADN : ARNms lytiques	(21)
	Cytométrie en flux : détecter EA-D, Rta, Zta, et EBNA-1	(21)
	Immunoblot : détecter EA-D, Rta, Zta, et EBNA-1	(21)
	Mesure de la production et de l'infectivité du virus	(165)
	Western Blot : détecter EA-D	(170)
	Transfection des cellules P3HR-1 : mesure de l'activité de la luciférase	(21)
	Puce à ADN : détecter les ARNms lytiques de l'EBV	(21)
48h	Hybridation ARNc-ADN	(88)
	Gradient de Césium (CsCl)	(84, 91)
	Marquage à thymidine tritiée puis radioactivité mesurée : déterminer l'effet sur l'ADN viral	(113)
	IF : détecter VCA	(76)
	IF : détecter EA	(3, 4, 67, 68, 76, 107, 117, 131, 136, 155)
	Immunoblot : détecter les protéines lytiques de l'EBV (EA-D, gp350/220)	(6)

48h	Puce à ADN : détecter les ARNms lytiques de l'EBV	(21)
	Western Blot : détecter EA-D	(170)
	Mesurer l'activité de l'ADN polymérase	(82)
3 jours	IF : détecter gp350/220	(132)
	IF : détecter VCA	(126, 132)
	IF pour détecter EA	(113, 126)
	Western Blot : détecter EA-D	(170)
	ELISA : VCA	(132)
	Immortalisation des lymphocytes par le virus B95-8	(6)
	Mesure de la production et de l'infectivité du virus	(165)
	Mesure de l'activité de l'ADN polymérase	(126, 165)
	Southern Blot	(170)
	Terminal probe analysis : analyser l'ADN EBV linéaire et aussi le circulaire	(170)
	Hybridation <i>in situ</i>	(132)
Hybridation ARNc-ADN	(88)	
4 jours	IF : détecter VCA et EA	(30, 113, 151)
	IF : détecter EBNA-2 et LMP-1	(6)
	IF : détecter EBNA	(151)
	Immortalisation des lymphocytes du sang périphérique par le virus B95-8	(157)
5 jours	Slot Blot	(92, 165)
	Hybridation ARNc-ADN	(89)
	Hybridation ADN-ADN	(11)
	Mesure de la production et de l'infectivité du virus	(25, 165)
	Immortalisation des lymphocytes par le virus B95-8	(6)
	Mesure de l'activité de l'ADN polymérase	(165)
	IF : détecter VCA et EA	(126)
ELISA : détecter les antigènes EBV	(11)	
6 jours	Immortalisation des lymphocytes du sang périphérique par le virus B95-8	(157)
7 jours	Slot Blot	(47, 102, 103, 111)
	Southern Blot	(99, 102)
	Hybridation ARNc-ADN	(87-89)
	PCR en temps réel (TaqMan)	(47)
	Hybridation ADN-ADN	(99)
	IF : détecter EBNA	(151)
	IF : détecter EA	(81, 102)
	IF : détecter VCA	(81, 102, 103)
	Mesure de l'infectivité du virus	(11)
	Immortalisation des lymphocytes du cordon par le virus B95-8	(100)

9 jours	Immortalisation des lymphocytes du sang périphérique par le virus B95-8	(157)
10 jours	Hybridation ARNc-ADN	(82)
14 jours	Southern Blot	(84)
	Hybridation ARNc-ADN	(14, 85-87, 90, 91)
24 jours	IF : détecter EBNA	(100)
30 jours	Immortalisation des lymphocytes du sang périphérique par le virus B95-8	(157)
40 jours	Immortalisation des lymphocytes du cordon par le virus B95-8	(46)
<b>Différentes durées dans un même essai</b>		
0-120 min	Mesure de la radioactivité émise par l'EBV marqué à la thymidine tritiée	(84)
0-70 jours	Hybridation ARNc-ADN	(162)
0, 1, 2, 3, 4, 6, et 7 jours	Analyse du taux de renaturation : ADN EBV par cellule (contenu de l'ADN cellulaire en ADN EBV)	(151)
3, 6, 12, 24, et 48 h	Northern Blot : détecter les ARNs EA-D, BRLF1/BZLF1, BZLF1	(170)
0, 1, 2, 3, et 4 jours	IF : détecter VCA	(151)
1, 2, 3, 5, 7, et 9 jours	IF : détecter VCA	(26)
0, 1, 2, 3, 4, 6, et 7 jours	IF : détecter EA	(151)
40-96h	IF : détecter EA	(26)
1, 3, 5, 7, et 9 jours	IF : détecter EA	(26)
0-16 jours	IF : détecter VCA et EA	(113)
0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, et 8 jours après infection	Immortalisation des lymphocytes du sang périphérique par le virus B95-8	(157)

## **2. Les technologies pour évaluer la diminution de la réplication virale.**

Voir tableau 6.

La plupart des systèmes de susceptibilité des herpesvirus aux substances antivirales décrits dans la littérature sont des essais phénotypiques basés sur la réduction de l'effet cytopathogène du virus. Cependant, l'absence d'effet cytopathogène de l'EBV en culture cellulaire a obligé les chercheurs à mettre au point d'autres méthodologies pour l'évaluation de l'effet des antiviraux sur ce virus. Ces méthodologies qui cherchent à mettre en évidence la diminution de la quantité de virus dans les cellules peuvent être séparées en quatre grands groupes : l'évaluation de l'effet antiviral sur 1) la synthèse de l'ADN du virus, 2) l'expression des protéines virales ou de leurs transcrits 3) l'activité transformante du virus, et 4) l'activité enzymatique des protéines virales.

### **a. Détection ou quantification de l'ADN viral**

Les méthodes d'hybridation ADN-ADN ou ARNc-ADN (89-91), sur membrane de nitrocellulose et utilisant des sondes ADN ou ARN radioactives produites *in vitro* ont été très largement utilisées pour la mesure de la réduction du nombre de copies d'ADN viral par cellule. L'hybridation *in situ* a aussi été employée pour tester l'activité des antiviraux (87, 132). La méthode de Slot blot à partir de l'ADN total, extrait des cellules P3HR-1, a également été développée (47, 102, 103, 111, 165) mais présente le désavantage d'être uniquement semi-quantitative et d'avoir un bruit de fond important malgré l'utilisation d'une seule sonde spécifique. La séparation électrophorétique des fragments d'ADN d'EBV, digérés par l'enzyme BamH1, réalisée dans le Southern blot améliore la spécificité de détection (99, 102). Ces outils possèdent cependant l'inconvénient de quantifier, en même temps les copies épisomales d'EBV (correspondant au virus latent non sensible aux traitements antiviraux classiques) que les copies linéaires (correspondant au virus enveloppé, infectieux, sensible

aux antiviraux). Gardella et al. (48) ont développé un Southern blot particulier (Gardella gel), réalisé sans digestion préalable de l'ADN par les enzymes de restriction, qui permet de discriminer les deux formes génomiques mais qui reste en revanche une technique semi-quantitative (101). Il en est de même pour la technique de « Terminal Probe Analysis » (130) utilisée par Zacny et al. pour l'évaluation d'un benzimidazolé (170). Le développement récent des techniques de PCR en temps réel, a permis la quantification de l'ADN des virus sans avoir recours aux substances radioactives. Notre équipe ainsi que celle de Friedrichs ((47), Ballout et al. (soumis) ont mis à profit cette technologie sensible, spécifique et reproductible pour l'étude des antiviraux. Les résultats obtenus sont encourageants, cependant il serait nécessaire de trouver un procédé pour restreindre cette quantification générale de l'ADN au génome linéaire uniquement.

#### **b. Détection ou quantification des transcrits et antigènes viraux**

Peu d'études utilisent les méthodes d'immunoblotting (6, 21, 170) pour l'analyse des antigènes viraux. L'immunofluorescence est plus classiquement utilisée pour l'étude de l'action des antiviraux mais également pour le criblage de molécules. Ces dernières années plusieurs travaux ont exposé des résultats d'ELISA (94, 132, 171) qui restent néanmoins souvent associés aux résultats d'immunofluorescence. Les antigènes recherchés sont principalement les antigènes du cycle lytique avec une grande prédominance pour les antigènes tardifs de capsid (VCA : viral capsid antigen) et les antigènes précoces (EA = Early antigen). En revanche, l'expression des antigènes très précoces, les transactivateurs Rta et Zta (IEA = immediate early antigen) est rarement évaluée sauf dans le cas d'étude du mécanisme d'action de nouvelles molécules antivirales (21). Les antigènes de latence sont généralement utilisés soit pour montrer que l'antiviral n'a pas d'effet sur ceux-ci (car la majorité d'antiviraux n'agit pas sur le cycle latent) (21) ou bien pour mettre en évidence l'inhibition de la transformation des lymphocytes B naïfs (100). Les technologies récentes de



cytométrie en flux n'ont pas encore trouvé leur place dans l'étude de l'activité des antiviraux contre l'EBV à l'exception de quelques travaux (21, 94, 135). Dans l'étude de Long et al. (94), on évalue l'effet antiviral sur l'expression de VCA. Cependant, dans celle de Chang et al. (21), on analyse l'extinction de l'expression des EA et IEA. Cette dernière équipe se démarque également par l'utilisation de puces à ADN pour étudier, en amont des protéines, la transcription de la totalité des gènes d'EBV. Cette approche avait déjà été abordée par Northern blot (170) avec la détection des ARN messagers des EA et IEA. Un autre travail récent (119) a ciblé la totalité des transcrits d'EBV (80 transcrits), en utilisant des amorces aléatoires pour la transcription inverse et la technologie de PCR en temps réel pour la quantification des ADN complémentaires synthétisés. Il faut cependant noter que les résultats obtenus dans ces deux études restent difficiles à interpréter. Nos travaux (Ballout et al. soumis) se sont également intéressés aux transcrits de l'EBV. En effet, les ARN messagers de la protéine tardive gp350/220 ont été quantifiés par RT-PCR en temps réel (en une seule étape). Cette glycoprotéine d'enveloppe a également été détectée par immunofluorescence (132) ou par immunoblot (6) pour estimer l'activité des antiviraux.

### **c. Evaluation de l'activité transformante du virus**

Deux grands types de tests ont été développés à cet effet. Le premier consiste à observer l'immortalisation de lymphocytes B naïfs pour l'EBV, par observation de la formation de colonies au microscope optique ou par l'incorporation de thymidine tritiée dans les cellules (6, 11). L'immunofluorescence est souvent utilisée en parallèle pour l'analyse de l'expression des protéines de latence. Les antiviraux peuvent être utilisés directement dans les cultures de lymphocytes B : dans ce cas, c'est l'effet inhibiteur du processus de transformation qui est mesuré (6). Cette méthode peut également servir d'outil pour titrer un surnageant d'une

culture traitée par les antiviraux et mesurer ainsi l'effet inhibiteur sur la production de virions (11).

**d. Evaluation de l'activité enzymatique des protéines virales.**

Certains travaux étudient l'activité de phosphorylation des kinases virales après traitement antiviral (50, 74), d'autres l'activité de l'ADN polymérase. Pour cette dernière, deux cas de figure sont possibles. 1) L'enzyme virale est extraite et purifiée à partir de cellules Raji surinfectées puis son activité est testée en présence ou absence de drogue (29), 2) Les cellules sont traitées par les antiviraux, puis l'activité de l'enzyme, extraite et purifiée, est analysée (126). L'activité enzymatique peut également être utilisée comme outil pour mesurer une production de virions par les cellules traitées. Les études de Yao et al. et Chu et al. (25, 165) ont ainsi corrélé l'activité ADN polymérase de cellules Raji surinfectées avec la quantité de virus présent dans le surnageant de culture utilisé pour la surinfection.

La diversité des méthodologies utilisées pour l'analyse de l'effet anti-EBV des substances antivirales explique l'hétérogénéité des résultats obtenus. La synthèse de ces résultats est exposée dans la partie suivante.

**Tableau 6 : Les technologies ou méthodologies utilisées dans les études *in vitro* pour l'évaluation de l'action des antiviraux contre l'EBV**

<b>Technologie ou méthodologie</b>	<b>Référence</b>
<b>Détection de l'ADN EBV</b>	
Hybridation ARNc-ADN	(14, 85, 86-91, 162)
Hybridation <i>in situ</i>	(87, 132)
Hybridation ADN-ADN	(11, 87, 99, 171)
Slot Blot	(47, 102, 103, 111, 165, 170)
Southern Blot	(42, 84, 99, 102)
Centrifugation en densité de chlorure de Césium (CsCl)	(29, 84, 86, 87, 89, 91)
PCR en temps réel	(47)
Terminal probe analysis	(170)
Gardella	(101)
<b>Détection de l'ARN EBV</b>	
Puces à ADN : détecter les ARNm lytiques	(21)
Northern Blot : détecter les ARNs EA-D, BRLF1/BZLF1, et BZLF1	(170)
<b>Détection des antigènes EBV</b>	
ELISA : détecter VCA, gp350/220, antigènes EBV	(132, 171)
Immunofluorescence (IF) : détecter EA	(3, 4, 21, 26, 29, 38, 42, 67-69, 76, 81, 102, 107, 113, 117, 126, 131, 136, 151, 153, 155, 157)
IF : détecter VCA	(26, 29, 42, 76, 81, 100, 102, 103, 113, 126, 132, 151)
IF : détecter Ma	(132)
IF : détecter EBNA	(6, 21, 42, 81, 100, 151)
IF : détecter LMP-1	(6)
IF : détecter Rta, Zta	(21)
IF : détecter VCA/EA	(84)
IF : détecter gp350/220	(132)
Cytométrie en flux : détecter les antigènes viraux CD21, EA-D, Rta, Zta, et EBNA-1, VCA	(21, 94, 135)
Western Blot : détecter EA-D	(170)
Immunoblot : détecter EA-D	(6, 21)

Immunoblot : détecter gp350/220	(6)
Immunoblot : détecter Rta, Zta, et EBNA-1	(21)
<b>Détection des polypeptides associés à l'EBV</b>	
Electrophorèse sur gel de polyacrylamide	(29, 87, 90, 91)
<b>Autres méthodologies</b>	
La transformation en LCL des lymphocytes B (lymphocytes du sang du cordon ou du sang périphérique) par le virus B95-8	(6, 11, 46, 100, 113, 135, 157)
Mesure de la production et de l'infectivité du virus	(11, 25, 165)
Mesure de l'activité de l'ADN polymérase EBV	(25, 29, 82, 126, 165)
Transfection des cellules P3HR-1 : mesure de l'activité de la luciférase	(21)
Essais enzymatiques pour détecter l'activité de la TK, la désoxycytidine kinase	(30)

### **III. Résultats d'évaluation de l'activité des antiviraux *in vitro***

Dans cette partie nous exposerons d'une façon détaillée les résultats qui ont été obtenus dans les études *in vitro*. Dans la majorité de ces études, il a été montré que l'action antivirale de toutes les molécules testées est concentration- et temps-dépendante (lorsque ça a été mesuré). Cette action a été évaluée en terme d'EC<sub>50</sub> et parfois d'EC<sub>90</sub> qui sont respectivement les doses efficaces qui inhibent de 50 % et de 90 % un paramètre viral donné. Il est important de noter que le calcul d'EC<sub>50</sub> (ou EC<sub>90</sub>) a été fait surtout sur la réplication de l'ADN viral, moins fréquemment sur l'expression des protéines virales, et rarement sur l'activité enzymatique de l'ADN polymérase virale ou la transformation des lymphocytes B. Dans certaines études, le calcul de l'indice de sélectivité (SI), a été réalisé en parallèle à celui d'EC<sub>50</sub>. Cet indice est défini comme le rapport CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub> dans certaines études ou CC<sub>50</sub>/EC<sub>90</sub> dans d'autres (où CC<sub>50</sub> est la concentration de la drogue qui inhibe de 50 % la croissance cellulaire).

Dans les paragraphes suivants, les résultats seront présentés selon les différents groupes d'antiviraux (voir tableau 7) qui ont été testés contre l'EBV, en insistant sur les essais effectués et en mentionnant les différents EC<sub>50</sub>s et SI (quand c'est nécessaire) obtenus (voir tableau 8).

#### **1. Les analogues des nucléosides**

De nombreuses études ont évalué l'effet anti-EBV des analogues nucléosidiques. Ce sont parmi les premières molécules qui ont été largement testées en culture cellulaire contre ce virus et aussi bien contre d'autres herpesvirus tel que HSV-1 et HSV-2 (146, 147), HCMV (98, 146), et HHV-6 (2).

Le GCV [9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine] -un analogue de la désoxyguanosine- est parmi les agents anti-EBV les plus efficaces de cette classe. Selon les différents essais utilisés, l' $EC_{50}$  (d'inhibition de l'ADN viral) de ce composé est de 0.01-1.13  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . L'effet temps-dépendant de l'action du GCV a été clairement montré dans l'étude de Lin et al. (88). Il n'y a pas de différence significative observée dans les copies du génome EBV par cellule P3HR-1 à 1 jour après traitement. Cependant, une réduction approximative de 44 % et 77 % a respectivement été observée après 3 et 7 jours (88). L'activité de dérivés de pyrimidine reliés au GCV : ayant le substitut (1,3-dihydroxy-2-propoxy)methyl et contenant tous la même chaîne acyclique, a été comparée à celle de ce composé. L'effet du BW A1117U 1-[(1,3-dihydroxy-2-propoxy)methyl]cytosine ( $EC_{50}$  0.05-0.09  $\mu\text{M}$ ) est similaire à celui du GCV ( $EC_{50}$  : 0.05  $\mu\text{M}$ ). Par contre, celui des autres dérivés cytosines et des dérivés uraciles est nettement plus faible avec une  $EC_{50}$  supérieure à 22  $\mu\text{M}$ . Cependant, des variations sur les positions 2 et 4 du cycle (dérivés miscellaneous) induisent l'élimination de l'activité antivirale ( $EC_{50}$  164-436  $\mu\text{M}$ ) (14).

Ce qui est important à signaler, c'est que l'analogue nucléosidique de purine, le S2242 : 2-amino-7-[(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)purine], qui est une forme 6-désoxy du GCV avec la chaîne latérale acyclique, substituée à la position N-7 au lieu de N-9, a une activité largement supérieure ( $EC_{50}$  : 0.5  $\text{ng}/\text{mL}$ , SI : 600) à celle du GCV ( $EC_{50}$  : 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , SI : 24). D'ailleurs, il s'est révélé le plus puissant composé anti-EBV parmi tous les composés (appartenant à différentes classes antivirales : analogues nucléosidiques, analogues nucléotidiques, antirétroviraux, ...) testés dans la même étude (102).

L'ACV [9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine] est un autre analogue de la désoxyguanosine, a été souvent testé contre ce virus. Son  $EC_{50}$  (ADN) varie entre 0.07 et 2.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  selon les études. Plusieurs travaux comparant les activités anti-EBV du GCV et de l'ACV ont montré que l'effet antiviral du premier est supérieur à celui du deuxième. Le GCV

est aussi 6 fois plus efficace ( $EC_{50}$  : 0.05  $\mu$ M ou 0.01  $\mu$ g/mL) que l'ACV ( $EC_{50}$  : 0.3  $\mu$ M ou 0.07  $\mu$ g/mL) dans l'inhibition de la réplication de l'ADN viral au niveau des cellules P3HR-1 (14 jours), avec des SI respectifs de 4000 et de 833 (91). Plus récemment et en utilisant la technique de PCR en temps réel, les résultats obtenus par Friedrichs et al. (47), sont en corrélation avec ces derniers. Ils montrent que le GCV ( $EC_{50}$  : 0.14  $\mu$ g/mL, SI : 86) a une activité sur l'ADN viral qui est 3 à 10 fois plus prononcée que celle de l'ACV ( $EC_{50}$  : 1.14  $\mu$ g/mL, SI : 77). Cependant, les valeurs d' $EC_{50}$  sont respectivement 14 et plus de 16 fois supérieures à celles obtenues dans l'étude précédente. D'ailleurs, dans Meerbach et al. (102), et sous les mêmes conditions d'essai (7 jours, P3HR-1 TPA-induites), mais en utilisant la technique d'hybridation d'ADN (Slot blot) ; l' $EC_{50}$  calculée du GCV ( $EC_{50}$  : 0.4  $\mu$ g/mL) est inférieure à celle de l'ACV ( $EC_{50}$  : 1.4  $\mu$ g/mL).

Concernant l'étude de la cinétique de réversibilité de ces deux composés, les résultats montrent que l'ACV a un effet réversible sur la synthèse de l'ADN viral au niveau des cellules P3HR-1 (après 7 ou 14 jours de traitement). Après 7 jours de culture sans ACV, le nombre de copies EBV retourne à 98 % du niveau du contrôle (87), alors que le retour au niveau basal a lieu 10-11 jours (89-91) après la suppression de la drogue. Par contre le GCV a un effet plus prolongé que l'ACV, qui persiste plus de 21 jours (où l'ADN viral est restauré à 23 %). Il faut 42 jours de culture sans GCV des cellules qui ont été traitées à 30  $\mu$ M de cette drogue, pour que l'ADN EBV revienne à son niveau basal. Cette action plus prolongée a aussi été obtenue sur l'expression des polypeptides associés à l'EBV au niveau des cellules Raji surinfectées (91). Ceci peut être interprété par la différence des taux des métabolites intracellulaires qui sont dans le cas du GCV, phosphorylés à des taux supérieurs et éliminés moins rapidement que ceux de l'ACV (88).

L'activité anti-EBV d'un autre analogue de la désoxyguanosine, le PCV [9-(4-hydroxy-3-hydroxymethylbut-1-yl)guanine] a été comparée à celle de l'ACV. D'après l'étude de

Bacon and Boyd (11), l'effet du PCV ( $EC_{50}$  : 2.3  $\mu\text{g/mL}$ ) sur la synthèse de l'ADN viral, est similaire à celui de l'ACV ( $EC_{50}$  : 2.2  $\mu\text{g/mL}$ ). Les  $EC_{50}$ s d'inhibition de l'expression de l'antigène viral (5 jours, cellules P3HR-1) sont entre 1 et 3  $\mu\text{g/mL}$  pour les deux composés. Ces résultats d'expression antigénique sont en corrélation avec ceux de Rajappan et al. (132) où les  $EC_{50}$ s de l'ACV sont de 1,66-2,74  $\mu\text{g/mL}$  pour VCA, et 1,28  $\mu\text{g/mL}$  pour gp350/220, après un traitement de 3 jours des cellules Daudi surinfectées. Par contre et après 7 jours de culture, Meerbach et al. (103) ont montré que le PCV ( $EC_{50}$  : 3.2  $\mu\text{g/mL}$ , SI > 31) est moins actif que l'ACV ( $EC_{50}$  : 1.52  $\mu\text{g/mL}$ , SI : 58).

Contrairement à toutes les études citées plus haut, et en utilisant différentes méthodologies (IF, FACS, ELISA, et hybridation *in situ*), Long et al. (94) ont montré que seul l'ACV est efficace contre l'EBV avec une  $EC_{50(\text{VCA})}$  de 1.3  $\mu\text{g/mL}$  (cellules H1) alors que le GCV ( $EC_{50(\text{VCA})} > 50 \mu\text{g/mL}$ ) et le PCV ( $EC_{50(\text{VCA})} > 50 \mu\text{g/mL}$ ) n'ont pas d'efficacité contre ce virus après 3 jours de traitement des cellules Daudi surinfectées.

L'effet antiviral d'autres catégories d'analogues nucléosidiques : les analogues d'uridine (FIAU, FMAU, FEAU, VaraU, BV-araU et BVDU) et l'analogue de cytidine (FIAC : 1-(2-désoxy-2-fluoro-bêta-D-arabinofuranosyl)-5-iodocytosine) a été évalué et comparé à celui du GCV et de l'ACV (90). En utilisant le même essai que dans Lin et al. (91) et en se basant sur les activités anti-EBV ( $EC_{50}$ ) de ces drogues, les résultats montrent que : FIAC = FIAU (0.005  $\mu\text{M}$ ) > FMAU (0.0065  $\mu\text{M}$ ) > GCV (0.05  $\mu\text{M}$ ) > BVDU (0.06  $\mu\text{M}$ ) > ACV (0.3  $\mu\text{M}$ ). Par contre, le profil d'activité n'est pas le même en prenant les valeurs de SI comme critère d'évaluation (82, 89, 90). Cette supériorité de l'effet inhibiteur du BVDU ((E)-5-(2-bromovinyl)-2'-désoxyuridine), du FIAC, et du FMAU (1-(2-désoxy-2-fluoro-bêta-D-arabinofuranosyl)-5-méthyleuracile) à celui de l'ACV a aussi été démontrée dans l'étude de Lin et al. (89) : pour une durée de traitement de 5 jours, les trois composés sont respectivement 5, 10, et 50 fois plus puissants que l'ACV. Ces résultats sont en corrélation



avec ceux obtenus par Lin and Machida (87) qui montrent que le BVDU ( $EC_{50}$ : 0.055  $\mu$ M (0.02  $\mu$ g/mL)) a une activité supérieure à celle de son congénère le BV-araU ( $EC_{50}$ : 0.26  $\mu$ M) et tous les deux plus efficaces que l'ACV ( $EC_{50}$ : 0.3  $\mu$ M (0.07  $\mu$ g/mL) au niveau des cellules P3HR-1 (14 jours).

Un profil d'activité comparable a été obtenu dans d'autres études évaluant l'effet des ces deux derniers composés en parallèle avec celui de VaraU. Après 7 jours de traitement des cellules P3HR-1, le VaraU s'est avéré le plus efficace dans l'inhibition de l'expression de VCA. Par contre, l'expression d'EBNA au niveau de ces cellules n'est affectée par aucun des trois composés (43, 89).

Contrairement à la cinétique de réversibilité rapide de l'ACV, les composés tels que le BVDU, le BV-araU, le VaraU, le FIAC, et le FMAU ont des effets plus prolongés que celui de l'ACV (43, 87, 89-91).

Il est important de noter que la variabilité des résultats entre les études est parfois très importante, ce qui est clairement remarqué dans le cas du BVDU. Contrairement aux études de Lin (87, 89, 90), Friedrichs et al. (47) ont récemment montré que l'ACV ( $EC_{50}$  1.14  $\mu$ g/mL) est beaucoup plus efficace dans l'inhibition de la réplication de l'EBV (PCR en temps réel) que le brivudin (BVDU) qui a une  $EC_{50}$  de 22  $\mu$ g/mL. Cette inefficacité du BVDU dans l'inhibition de l'ADN viral a aussi été observée dans d'autres études récentes ( $EC_{50}$  > 100  $\mu$ g/mL) (104-106).

En ce qui concerne l'expression de polypeptides associés à l'EBV. Ce sont 7 polypeptides (de 145, 140, 135, 110, 85, 55, et 32 kDa) qui sont détectés après 24h au niveau des cellules Raji surinfectées. C'est l'expression des polypeptides de 145 et 140 kDa qui est fortement réduite par le GCV, le FMAU, le BVDU et le BV-araU, mais seulement en partie par l'ACV, le FIAC et le FIAU. Une inhibition différentielle est obtenue avec les autres polypeptides (87, 90, 91).

Dans des études plus ou moins récentes, on a montré que les formes L-nucléosides de certains composés ont une forte activité contre l'EBV. Dans Chu et al. (25) parmi les quatre composés testés contre l'EBV : L-FMAU, D-FMAU, L-FEAU, et D-FEAU ; le L-FMAU émerge comme un nouvel agent anti-EBV avec une haute sélectivité ( $EC_{90}$  : 5  $\mu$ M, SI : 183). Par contre, son isomère, le D-FMAU est actif contre l'EBV ( $EC_{90}$  : 0.1  $\mu$ M, SI > 100) mais il a une forte cytotoxicité. L'activité importante du L-FMAU a aussi été rapportée dans une autre étude qui montre que ce composé ( $EC_{90}$  : 5  $\mu$ M, SI : 200) est nettement plus efficace que le GCV ( $EC_{90}$  : 5  $\mu$ M, SI : 15) et l'ACV ( $EC_{90}$  : 50  $\mu$ M, SI : 20) (166). Plus récemment, l'action d'un autre analogue L-nucléosidique, le L-I-OddU s'est révélée intéressante ( $EC_{50}$  : 0.033  $\mu$ M). Il inhibe l'ADN EBV de 80 % seulement après 1,5 jours d'incubation des cellules H1. Le retour au niveau basal de l'ADN se fait à 50, 55, et 60 jours après suppression de cette drogue du milieu des cellules H1 qui ont été traitées respectivement par 0.4, 2, et 10  $\mu$ M (92). Cette cinétique de réversibilité est plus lente comparée à celles d'autres composés (ACV, GCV, FMAU, BVDU, ...) cités dans les études de Lin (87, 89-91).

Rares sont les études qui ont été réalisées sur les analogues nucléosidiques de l'adénine. L'adénine arabinoside, Ara-A, avait été testée pour la première fois contre l'EBV par Coker-Vann and Dolin (26). Ce composé inhibe l'expression de VCA au niveau des cellules P3HR-1, mais il est sans effet sur l'expression de EA dans Raji (à 40-96h).

Cependant, les thérapies prolongées utilisant les analogues nucléosidiques a provoqué l'émergence de souches résistantes qui sont soit TK-déficientes ou dans lesquelles la TK est altérée (ex. souches TK- de HSV et VZV). En conséquence, les analogues nucléosidiques dont l'action dépend de TK sont peu ou pas efficaces contre ces souches virales.

Cependant, l'utilisation de nucléosides sous formes phosphorylées ne permet pas de résoudre le problème car leur groupe phosphate (dans la liaison C-O-P) pourrait être clivé par les estérases avant qu'ils puissent entrer dans les cellules. Les chercheurs ont alors essayé de

trouver d'autres stratégies dans le but de vaincre cet obstacle. Pour cela, deux concepts ont donc été développés pour synthétiser des molécules mimant les analogues des nucléosides sous leurs formes monophosphates et permettant donc de dépasser la dépendance de la TK virale.

Le premier concept repose sur la synthèse d'analogues nucléotidiques dont la structure et le métabolisme ont été largement discutés dans la partie (métabolisme).

Le deuxième, plus récent, est le concept du *CycloSaligenyl-nucleotide*. L'idée de base est d'utiliser un précurseur lipophile neutre du nucléoside monophosphate (nucléotide) : un *cycloSal*-pronucléotide qui est capable d'entrer dans les cellules sans être clivé et de libérer le nucléotide de façon sélective et efficace par hydrolyse induite chimiquement incluant un clivage couplé successif des esters phényle et benzyle du *CycloSal*-phosphotriester (réaction en tandem). Ceci permet de rendre bioactif un composé qui ne l'est pas tel que le BVDU selon les études de Meier et al. (104-106).

Les résultats obtenus avec les composés de ces deux classes seront présentés dans les paragraphes suivants.

## **2. Les analogues nucléotidiques**

Les analogues nucléosidiques phosphonylés ou analogues nucléotidiques ont été utilisés avec succès dans les infections herpétiques. Ils ont montré une activité remarquable contre un grand nombre d'herpesvirus humains et animaux. Le plus important à signaler c'est leur efficacité contre les souches HCMV et les souches HSV TK- et VZV TK-, qui sont déficientes dans leur capacité de phosphoryler les analogues nucléosidiques tels que le GCV (35).

Le HPMPC ((S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine) s'est révélé l'un des plus puissants composés de cette classe avec un large spectre d'activité contre des virus à

ADN, à ARN et des rétrovirus (36). En ce qui concerne l'EBV, le HPMPC semble également l'agent le plus puissant parmi les composés de cette classe. L' $EC_{50}$  obtenue dans les différentes études varie entre 0.009 et 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en fonction des différentes méthodologies utilisées.

Son effet inhibiteur a été évalué par hybridation ARNc-ADN au niveau des cellules P3HR-1 (14 jours) en le comparant à celui d'analogues d'adénine et de purine appartenant à la même classe. Selon les valeurs d' $EC_{50}$  : (S)-HPMPC (0.03  $\mu\text{M}$  ou 0.009  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) > (S)-HPMPA (0.08  $\mu\text{M}$ ) > PMEDAP (0.16  $\mu\text{M}$ ) > (S)-cHPMPA (1.5  $\mu\text{M}$ ) > (S)-HPMPDAP (2  $\mu\text{M}$ ) (85). Cependant, dans d'autres études utilisant une différente méthodologie où l'on traite des cellules P3HR-1 TPA-induites pendant 7 jours, l' $EC_{50}$  (0.22-0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (évaluée par Slot blot) de ce composé est approximativement 24-44 fois plus élevée que celle obtenue dans l'étude précédente (102, 103, 111).

Dans l'étude de Meerbach et al. (102) le HPMPC ( $EC_{50}$  : 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ; SI : 45) a aussi montré une activité qui est supérieure à celle du PMEAA ( $EC_{50}$  : 3.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , SI : 30) qui est un analogue nucléotidique de l'adénine. Ceci a été confirmé par Friedrichs et al. (47), et sous les mêmes conditions mais en utilisant la PCR en temps réel (TaqMan) comme technologie. Cependant, les  $EC_{50}$ s obtenues dans cette étude sont largement inférieures - de l'ordre de 6 fois pour le HPMPC ( $EC_{50}$  : 0.065  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) et plus de 7 fois pour le PMEAA ( $EC_{50}$  : 0.42  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) - à celles obtenues par Meerbach et al. (102). Ces résultats sur l'efficacité anti-EBV du PMEAA sont en corrélation avec ceux de Lin et al. (86), qui montrent que cet antiviral ( $EC_{50}$  : 1.1  $\mu\text{M}$ ) aussi bien que l'autre analogue de l'adénine, le (S)-HPMPA ((S)-9-(3-Hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)adenine) ( $EC_{50}$  : 0.08  $\mu\text{M}$ ) inhibent efficacement la synthèse de l'ADN viral alors que le (S)-DHPA n'a aucun effet.

Finalement, une série de 15 analogues nucléotidiques a aussi été testée. Seuls quatre parmi ceux-ci ont prouvé être des inhibiteurs sélectifs et puissants sur le cycle répliatif de

l'EBV. Ce sont les 1f ( $EC_{50}$  : 1.1  $\mu\text{g/mL}$ ), 2a ( $EC_{50}$  : 1.3  $\mu\text{g/mL}$ ), 4a ( $EC_{50}$  : 0.8  $\mu\text{g/mL}$ ), et 3c ( $EC_{50}$  : 0.5  $\mu\text{g/mL}$ ). Ils ont aussi montré des résultats similaires sur la production de la protéine structurale VCA (102).

Il est important de signaler que l'étude de la cinétique de réversibilité pour les composés de cette classe a été rarement réalisée. Dans l'étude de Lin et al. (85) le (S)-HPMPC a montré au niveau des cellules P3HR-1 un effet significativement plus prolongé que celui du BVDU. Le nombre de copies EBV par cellule a été restauré à 38 % par rapport aux cellules non traitées après 19 jours sans BVDU, alors qu'il a été restauré à 26 % dans le cas du HPMPC.

### **3. Les *CycloSal*-nucléosides monophosphates**

En ce qui concerne les *CycloSal*-nucléosides monophosphates, l'application de la méthode *CycloSal* pour l'évaluation de l'activité anti-EBV de ces composés est toute récente. En 2000, Meerbach et al. (103) ont testé l'activité de six dérivés *CycloSal* de l'ACV et du PCV au niveau des cellules P3HR-1 TPA-induites (Slot Blot, 7 jours). Les résultats montrent que le 3-Methyl-*CycloSal*-ACVMP ( $EC_{50}$  : 2.38  $\mu\text{g/mL}$ ), le 5-Methyl-*CycloSal*-ACVMP ( $EC_{50}$  : 1.85  $\mu\text{g/mL}$ ), et le 5-H-*CycloSal*-ACVMP ( $EC_{50}$  : 4.07  $\mu\text{g/mL}$ ) sont sélectifs pour inhiber l'ADN EBV similairement à l'ACV 3-Methyl-*CycloSal*-ACVMP qui est intéressant à signaler c'est qu'en plus de leurs effets anti-EBV et anti-HSV-1 démontrés dans cette étude, et contrairement à l'ACV, ils ont une activité remarquable contre des souches HSV-1 TK- (B2006). Le composé le plus actif contre ces souches est le 3-Methyl-*CycloSal*-ACVMP, il est 62 fois plus efficace que l'ACV. Le 5-H-*CycloSal*-ACVMP et le 5-Methyl-*CycloSal*-ACVMP ont respectivement une activité de 20 et 19 fois plus élevée que celle de l'ACV. Parmi les dérivés *CycloSal* du PCV, seuls le 3-Methyl-*CycloSal*-PCVMP et le 5-H-*CycloSal*-PCVMP montrent une activité marginale (les  $EC_{50}$ s respectives sont de 21.7 et 25.2  $\mu\text{g/mL}$ ). Par contre le 3-Methyl *CycloSal*-O-acetyl-PCVMP n'a aucun effet anti-EBV.

Meier et al. (105, 106) ont rapporté pour la première fois l'application du concept *CycloSal* à un autre analogue nucléosidique, le BVDU (possédant un groupe 3'-OH), résultant en une augmentation de l'activité antivirale.

Le 3-Methyl-*CycloSal*-BVDUMP et une série de dérivés 3'-O-modifiés, ont été synthétisés à partir du BVDU (105, 106). En utilisant toujours le même concept, Meier et al. (104) ont synthétisé et testé l'activité anti-EBV du BVDU et de ses *CycloSal* phosphate triesters au niveau des cellules P3HR-1 TPA- induites (7 jours, Slot Blot). Les résultats de ces études montrent que le groupe 3'-OH est essentiel pour l'activité antivirale. L'estérification de ce groupe avec de simples acides carboxyliques abolit toute l'activité biologique alors que l'utilisation des esters d'acides  $\alpha$ -aminés retient l'activité (105). Les 3'-non modifiés *CycloSal*-BVDUMPs ont une forte activité, contrairement à tous les dérivés 3'-ester qui sont inactifs. Le 5-methoxy-*CycloSal*-BVDUMP est plus de 90 fois plus actif que le BVDU, alors que les 3'-aminoacyl-*CycloSal*-BVDUMPs ont une activité qui dépend de l'acide aminé et de la configuration C $\alpha$ . Le plus actif de ces derniers est le composé 4f qui est un dérivé L-leucine (104). Dans Meier et al. (105), le 3-methyl-*CycloSal*-BVDUMP s'est avéré le plus actif parmi les composés testés. Il est plus de 73 fois plus actif ( $EC_{50}$  : 4.1  $\mu$ M) que le BVDU ( $EC_{50}$  > 300  $\mu$ M ou 100  $\mu$ g/mL) qui est complètement inactif, et 2 fois plus actif que le composé de référence l'ACV ( $EC_{50}$  : 7.2  $\mu$ M ou 1.62  $\mu$ g/mL). Des valeurs similaires d' $EC_{50}$  ont été obtenues dans les autres études de Meier et al. (104, 106).

Finalement, ces résultats nous montrent qu'avec la méthode *CycloSal*, il est possible de convertir un composé anti-EBV inactif, le BVDU, en un agent bioactif. Elle permet aussi l'utilisation réussie d'analogues nucléosidiques sans l'intervention d'une TK virale.

#### **4. Les analogues du pyrophosphate**

Ce sont des composés actifs contre un large spectre de virus dont les herpesvirus (114). Leur action est indépendante de l'implication d'une TK-virale (voir partie précédente pour le métabolisme détaillé), ce qui leur donne l'avantage d'être actifs contre des souches herpétiques résistantes à cause d'une déficience en TK virale (33).

Le PFA est le composé de cette classe qui a montré la meilleure efficacité contre l'EBV dans différents systèmes cellulaires. L' $EC_{50}$  d'inhibition de l'ADN polymérase EBV par ce composé est de 0.5-3  $\mu$ M (0.15-0.9  $\mu$ g/mL) (114).

Son  $EC_{90}$  a été évaluée (par un test d'infectivité) à 22.5  $\mu$ g/mL (165). La synthèse de l'ADN viral et l'expression de VCA, ont été inhibées respectivement de 90 % et de 75 % après 4 jours d'exposition des cellules P3HR-1 à ce composé (29). L'inhibition de cette expression par le PFA a aussi été montrée au niveau de la lignée B95-8 et pour une durée 7 jours (81). Une réduction de 95 % de cette expression a également été observée au niveau des cellules P3HR-1 induites (126). Ces résultats sont en corrélation avec ceux obtenus récemment par Falk and Ernberg (42). Dans cette étude, on a montré que le PFA bloque complètement l'expression de VCA au niveau des cellules Daudi (induites par le TPA et du butyrate de sodium) à plusieurs durées brèves de traitement de 27, 39 et 51h (42).

Cependant, le PFA n'a aucun effet sur l'expression de EA que ce soit au niveau des cellules Raji surinfectées (29) des cellules P3HR-1 (126) des cellules B95-8 (81) ou des cellules Daudi induites par le TPA et le butyrate de sodium (42).

Contrairement à ces études, Long et al. (94) ont récemment montré que le PFA n'a pas d'effet sur l'EBV avec une  $EC_{50}$  (VCA) > 47.7  $\mu$ g/mL après 3 jours de traitement des cellules Daudi surinfectées.

Dans l'étude de Margalith et al. (100) l'activité du PFA a été comparée à celle d'un autre analogue du pyrophosphate, l'éthyle PFA (Et-PFA). Ils ont montré que le premier est plus

efficace ; il inhibe la transformation des lymphocytes du cordon par l'EBV (B95-8) après 7 jours de traitement. Par contre, l'Et-PFA n'a pas d'effet sur ce processus. Parallèlement, l'expression de VCA est inhibée de 96.7 % à 500  $\mu$ M de PFA alors qu'elle est seulement réduite de 68.9 % à 2000  $\mu$ M d'Et-PFA. Cependant, ils sont sans effet sur l'expression de la protéine de latence EBNA (100).

Finalement, l'effet sur l'EBV d'un troisième composé de cette classe, le PAA (ou acide phosphonoacétique), a été rapporté par Prachova et al. (126). Le nombre de copies d'ADN-EBV passe de 150 à 40 copies par cellule B95-8 après traitement par le PAA. Cependant, après la suppression de la drogue du milieu de culture à la suite d'un traitement de courte durée (4 jours), le retour au niveau basal se produit à 5 jours. Il n'y a pas d'effet du PAA sur l'ADN latent dans les cellules Raji (126) ni sur l'expression des antigènes EA ou EBNA dans les cellules B95-8 et Raji à 4 et 7 jours de traitement par ce composé (151).

## **5. Les autres groupes antiviraux**

Les nombreux inconvénients des molécules anti-herpes -ayant une efficacité prouvée- tels que la faible biodisponibilité, le manque d'efficacité et/ou la cytotoxicité ont poussé les chercheurs à la conception et la synthèse de nouvelles molécules qui auraient une bonne biodisponibilité, une meilleure efficacité et une toxicité minimale. Certains de ces composés auraient des mécanismes d'action différents de celui de la majorité des molécules qui existent, c'est-à-dire l'inhibition de la réplication de l'ADN viral. Ces composés peuvent être divisés en deux groupes : a) molécules à activité antivirale, et b) molécules à double activité antivirale et anticancéreuse.



#### a. Les molécules à activité antivirale

En 1993, Kumar et al. (76) ont rapporté la synthèse et les activités antivirales d'analogues 5-(1-azido-2-haloéthyle)-2'-deoxyuridines 3a-c et des analogues liés : le 5-(1-azidoéthyle), le 5-(1-aminoéthyle) et le 5-(1-méthoxyéthyle). Après 2 jours de traitement des cellules Raji surinfectées, les composés 3a-c inhibent efficacement l'expression de l'antigène viral (EA et VCA) ( $EC_{50}$  : 4-11.1  $\mu\text{M}$ ). L'atome d'halogène dans le groupement 5-(1-azido-2-haloéthyle) de ces composés testés semblerait essentiel pour l'activité antivirale puisque le composé 5-(1-azidoéthyle) est inactif contre ce virus.

L'activité de nouvelles molécules appelées : les benzimidazoles ribonucléosides a été récemment rapportée (163, 170). Après un traitement de 3 jours, le BDCRB (2-bromo-5,6-dichloro-1-(beta-D-ribofuranosyl)benzimidazole) n'avait aucune activité contre ce virus. Cependant, le L-riboside 1263W94 (un nucléoside L-ribofuranosyl) était très efficace avec une  $EC_{50}$  de 0.15 à 1.1  $\mu\text{M}$  largement inférieure à celle de l'ACV (10  $\mu\text{M}$ ) (170). Par contre, il est aussi actif ( $EC_{50}$  : 5.1  $\mu\text{M}$ ) que l'ACV ( $EC_{50}$  : 3.6  $\mu\text{M}$ ) dans l'étude de Williams et al. (163). Un autre composé testé dans cette dernière étude, le 175X (un analogue de BDCRB dans lequel le sucre (D-ribose) est sous forme pyranosyl au lieu de furanosyl), a aussi une activité ( $EC_{50}$  : 10  $\mu\text{M}$ ) équipotente à celle de l'ACV. Ce qui est intéressant à signaler c'est que le 1263W94 inhibe la phosphorylation et l'accumulation de EA-D qui est un cofacteur essentiel du cycle lytique de l'EBV (170). Après 24h de traitement des cellules Akata (induites par anti-IgG), l'expression de cet antigène a aussi été efficacement réduite par deux dérivés de l'analogue ribonucléosidique DRB : le SC21 (ou 2-méthyl-DRB) et le SC22 (ou 2-éthyl-DRB). Les  $EC_{50}$ s d'inhibition de EA-D sont respectivement de 15.2  $\mu\text{M}$  et de 17.2  $\mu\text{M}$ . La synthèse de l'ADN viral est aussi affectée par ces 2 composés après cette courte durée (93).

D'autres nouveaux agents antiviraux nommés les nucléosides carbocycliques -sans l'unité 5'-méthylène (5'-nor carbanucléosides)- ont récemment été testés. Dans l'étude de Rajappan et al. (132), les énantiomères (composés 3 et 4) possédant la base guanine ont été évalués pour la première fois contre l'EBV. Seul le composé 3 (énantiomère D) a montré une activité significative au niveau des cellules Daudi surinfectées après un traitement de 3 jours et similaire à celle de l'ACV. Il inhibe l'expression de VCA de 50 % à 0.78-1.8 µg/mL. Pour un même pourcentage d'inhibition, les valeurs sont de 4.04 µg/mL pour l'expression de gp350/220 et de 0.82 µg/mL pour la synthèse de l'ADN. Finalement, le nouvel analogue nucléosidique (ayant aussi la base guanine) A-5021 a aussi montré une activité ( $EC_{50}$ : 1.0 µg/mL) équivalente à celle de l'ACV ( $EC_{50}$ : 1.4 µg/mL) (111).

Récemment, dans l'étude de Lin (84), l'acide glycyrrhizique (GL : pour glycyrrhizic acid) (extrait d'une plante), a été montré actif contre la réplication de l'EBV ayant un SI de 120. L' $EC_{50}$  pour l'inhibition de l'expression de l'antigène viral (VCA/EA) est de 0,38 mM. Ce qui est intéressant c'est son mode d'action différent de celui des analogues nucléosidiques. Il n'a pas d'effet sur l'ADN EBV dans P3HR-1 et Raji. Son activité antivirale n'est pas due à une inactivation directe du virus, ni à l'inhibition de l'adsorption du virus au niveau de ces cellules. Par contre, il bloque la pénétration de l'EBV dans ces cellules, un processus qui a lieu durant 5h après l'adsorption du virus (84).

Similairement, Chang et al. (21) ont rapporté le mécanisme d'action particulier d'un autre composé : l'(-)-Epigallocatechin gallate (EGCG), qui est un isomère du catechine (composant majeur du thé vert). A des concentrations supérieures à 50 µM, l'EGCG inhibe l'expression des gènes lytiques EA-D, Rta et Zta qui a été induite par le trichostatin A (TSA) au niveau des cellules P3HR-1. Il inhibe la transcription des gènes immédiats précoces BRLF1 et BZLF1 (à 24h) inhibant ainsi l'initiation de la cascade lytique de l'EBV. Par

contre l'expression du gène de latence EBNA-1 est indépendante de la concentration d'EGCG.

Dans Medveczky et al. (101) un autre composé naturel, le delta-9 tetrahydrocannabinol (THC) (un composé cannabique de la marijuana) inhibe la synthèse de l'ADN linéaire de l'EBV à 3 jours dans les cellules P3HR-1 induites par le TPA. L' $EC_{50}$  est estimée à : 0.9  $\mu\text{g/mL}$ .

Très récemment, dans l'étude de Yeo et al. (168) une série de produits analogues de l'helioxanthine (qui est une acrylnaphthalène lactone) a été synthétisée avec des modifications dans le cycle lactone et le groupe dioxyméthylène, et évaluée contre l'EBV. L'activité de ces composés est variable selon la modification de structure. Cette relation structure-activité a aussi été rapportée par Yang and Schneller (164). Dans cette étude, trois dérivés amino substitués (acétyle (3), formyle (4), et méthyle (5)) du composé 2 ont été préparés dans le but de résoudre le problème de toxicité de ce dernier (malgré un potentiel antiviral important). Les résultats obtenus montrent que les trois dérivés ont une cytotoxicité inférieure à celle du composé 2. Cependant, les composés 3 et 4 sont inactifs ( $EC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ ) alors que le composé 5 a un faible effet contre l'EBV ( $EC_{50} : 24.9 \mu\text{g/mL}$ ). Ceci montre qu'une modification au niveau du centre 4'-amino résulte en une réduction ou élimination du potentiel antiviral.

Qiu et al. (128) ont rapporté la synthèse et l'activité antivirale d'analogues nucléosidiques le (R)- et le (S)- synadenol (1a et 2a). Ce sont des inhibiteurs efficaces de l'EBV (cellules H-1), mais l'énantiomère-R 1a ( $EC_{50} : 0,09 \mu\text{M}$ ) est plus puissant que l'énantiomère-S, 2a ( $EC_{50} : 0,62 \mu\text{M}$ ).

Finalement, les effets inhibiteurs d'une autre classe antivirale, les oligodésoxynucléotides (S-oligos) phosphorothioates, ont aussi été rapportés. Ce sont des molécules qui agissent comme antisens ou antigènes. En 1993, Yao et al. (165) ont testé

l'activité des phosphorothioates oligodésoxycytidine (de 20, 28, S-dC<sub>28</sub> et 35 nucléotides) et des 28-mer S-oligos (EB1, EB2, EB3).

Les activités de ces composés sont dépendantes de la longueur de la chaîne : S-dC<sub>35</sub> ≥ S-dC<sub>28</sub> > S-dC<sub>20</sub> alors qu'elles sont indépendantes de la séquence (S-dC<sub>28</sub>, EB1, EB2, EB3) ; EB1 et S-dC<sub>28</sub> sont les plus actifs parmi ceux-ci.

En comparant leurs effets avec d'autres agents antiviraux (ACV, GCV et PFA) et en terme d'EC<sub>90S</sub> (production de virions) : S-dC<sub>28</sub> (0.5 μM) > GCV (5 μM) > ACV (50 μM) > PFA (75 μM). Par contre, selon les SI : S-dC<sub>28</sub> (> 100) > ACV (20) > PFA (16) > GCV (15).

#### **b. Les molécules à double activité antivirale et anticancéreuse**

Une autre catégorie de composés antiviraux est celle des produits naturels ou semi-synthétiques, qui ont des structures très différentes de celles des analogues nucléosidiques. Ces composés ont été testés dans de nombreuses études pour leurs effets anti-promoteurs de tumeur en se basant sur la théorie de la carcinogenèse en multi-étapes (125). Cette théorie explique la carcinogenèse chimique en trois étapes qui sont : l'initiation, la promotion, et la progression. Cependant, les effets inhibiteurs contre l'activation d'EBV-EA se sont montrés parallèles à ceux contre la promotion de la tumeur *in vivo* (75, 154). Pour ceci, l'essai d'inhibition de l'activation d'EBV-EA (au niveau des cellules Raji induites) a été utilisé dans ces études pour évaluer l'activité anti-promotion de tumeur des molécules testées. L'étude de la viabilité des cellules Raji, réalisée en parallèle dans la majorité de ces études, montre que tous les composés qui ont une efficacité sur l'inhibition de l'activation de l'EBV-EA ne sont pas toxiques pour ces cellules aux concentrations utilisées dans les tests. Dans le paragraphe suivant, nous présenterons les résultats qui ont été obtenus dans ces études, en insistant sur l'effet structure-dépendant de ces composés. Ils seront rassemblés en différents groupes (triterpènes, diterpènes, monoterpènes, quassinoides, ...).

Le premier groupe dans cette classe est celui des triterpènes. Des effets inhibiteurs importants sur l'activation de l'EBV-EA, ont été obtenus en présence de l'acide arjunolique, son dérivé triacétate, et leurs méthyles d'esters (38), aussi bien qu'en présence d'eupha-7,9(11),24-trien-3 $\beta$ -ol ou antiquol C et de six autres alcools de triterpène (à l'exception du composé monocyclique) (3). En 2004, cette dernière équipe (4) a isolé et caractérisé un autre nouveau triterpénoïde, l'épicabraleahydroxylactone (composé 1) avec six autres triterpénoïdes connus. Les résultats montrent que trois composés (5-7) ont des effets inhibiteurs importants ( $EC_{50}$  : 277-420 mole ratio/32 pmole TPA) et équivalents à ceux de la  $\beta$ -carotène ( $EC_{50}$  : 397 mole ratio/32 pmole TPA).

Concernant les diterpènes, certains (dont un nouveau diterpène de type nor-labdane) ont montré une efficacité contre l'EBV (107). Similairement, une forte activité a été montrée avec trois nouveaux euglobes (extraits à partir des feuilles juvéniles d'*Eucalyptus grandis*) ayant des structures acylphloroglucinol-monoterpène, nommés euglobe -G1, -G2, et -G3 (153). Cependant, parmi 15 iridoïdes (des composés monoterpènes), le glycoside paederoside s'est avéré le plus actif contre l'EBV (69).

Toujours dans le même but ont été évalués les effets de 45 quassinoides. Parmi ceux-ci certains sont actifs alors que d'autres ne le sont pas. D'ailleurs, il y a une relation structure-activité importante ; une liaison oxyméthylène et une chaîne latérale augmentent l'activité alors qu'un groupement sucre réduit l'activité (117).

D'autres produits naturels, les acridone alcaloïdes ont été testés pour la première fois pour leurs effets inhibiteurs sur l'activation d'EBV-EA. Parmi ces composés, le 5-hydroxynoracronycine et l'acrimarine-F ont montré des effets inhibiteurs remarquables (100 % inhibition à 1000 mol ratio/TPA et 12-33 % à 10 mol ratio/TPA) (155).

L'inhibition de l'activation d'EBV-EA induite par le TPA dans les cellules Raji a aussi été rapportée dans d'autres travaux. Ces dernières ont testé des extraits de fruits Citrus et

d'extraits d'épluchures et de graines à partir du genre Citrus, et des espèces Fortunella, et Poncirus (68) et des xanthones (dont 7 nouveaux xanthones : les brasixanthonés A-G) (67). Des composés semi-synthétiques ont aussi été testés. Cinq quassinoides (composés 3-7) ont été obtenus par estérification du groupe C-15 OH de l'isobrucéine-B déacétylée (composé 2). Les résultats montrent que l'estérification de ce groupe augmente l'activité anti-EBV EA. Tous ces composés avaient une activité supérieure à celle du composé 2. De même, la fluorination de la chaîne latérale aliphatique augmente l'activité alors que la saturation ou l'insaturation de la chaîne latérale n'a pas d'effet sur cette activité. Cependant, ils sont tous plus efficaces que les trois composés testés en parallèle : la curcumine, le  $\beta$ -carotène, et la glycyrrhizine (131).

Finalement et récemment, 16 naphthoquinones (composés 2-17) ont été synthétisées à partir du Lapachol et testées (136). Ces dérivés sont obtenus par acylation, modifications de la chaîne latérale, modifications sur le carbonyle en C-1, ou cyclisation du Lapachol. Parmi les 16 dérivés, certains sont plus actifs que le précurseur, le Lapachol, et aussi plus efficaces que le produit de référence, le  $\beta$ -carotène. Tous ces composés conservent le système original 1,4-naphthoquinone, qui apparaît être important pour produire une activité inhibitrice élevée. Les composés 11 et 12 (qui possèdent un groupe oxime en C-1 au lieu de la fonction carbonyle correspondante) sont moins actifs que le Lapachol, ce qui indique que le groupe carbonyle joue un rôle important pour l'activité.

**Tableau 7 : Les différents groupes d'antiviraux anti-EBV cités dans les études *in vitro***

<b>Groupe d'antiviral</b>	<b>Référence</b>
<b>Analogues des nucléosides</b>	
<b>Les analogues de la guanine</b>	
GCV	(14, 46, 47, 76, 84, 88, 90-92, 99, 102, 129, 162, 165, 171)
ACV	(11, 24, 30, 46, 47, 76, 78, 84, 86-92, 102, 103, 105, 106, 111, 132, 135, 162, 165, 170, 171)
PCV	(11, 24, 103)
<b>Les analogues de la cytosine</b>	
FIAC	(89, 90)
Dérivés cytosine : 18 (5-H) 8 (5-F) 10 (5-I) 23 (5-Me) 22 (5-aza) 12 (2-H)	(14)
<b>Les analogues de l'uracile</b>	
FMAU	(25, 89, 90 )
FIAU	(90)
L-FMAU	(25, 92)
D-FEAU ; L-FEAU	(25)
L-OddU, L-F-OddU, L-Cl-OddU, L-Br-OddU, L-I-OddU, D-I-OddU, L-I-SddU, L-CF3-OddU, et	(92)
BVDU	(24, 47, 85-87, 89, 90, 105, 106)
BV-araU VaraU	(87)
L-BVDU, L-BVAU, L-FBVRU, L-FBVAU, $\beta$ -D-BV-SddU, $\beta$ -L-BV-SddU, $\beta$ -D-BV-OddU, $\alpha$ -D-BV-OddU, $\beta$ -L-CV-OddU, $\alpha$ -L-CV-OddU, $\beta$ -L-BV-OddU, $\alpha$ -L-BV-OddU, $\beta$ -L-IV-OddU, $\alpha$ -L-IV-OddU, $\beta$ -L-Br-OddU, $\beta$ -L-I-OddU, BVAU	(24)
Dérivés uracile : 14 (5-H) 11 (5-I) 13 (5-Br) 15 (5-Me) 16 (5-NH <sub>2</sub> )	(14)
<b>Les analogues de l'adénine</b>	
Ara-A	(26)
<b>Les analogues de la purine</b>	
S2242	(102)

<b>Les analogues des nucléotides</b>	
<b>Les analogues de la cytosine</b>	
HPMPC ou (S)-HPMPC	(47, 78, 85, 102, 103, 111)
cHPMPC	(102)
<b>Les analogues de l'adénine</b>	
(S)-HPMPA	(85, 86, 89)
(S)-cHPMPA	(85)
(S)-DHPA	(86, 89)
PMEA ou Adéfovir	(47, 86, 89, 102)
<b>Les analogues de la purine</b>	
(S)-HPMPDAP, PMEDAP	(85)
<b>Les <i>CycloSal</i>-nucléosides monophosphates</b>	
<i>CycloSal</i> -ACVMPs : 3-Methyl <i>CycloSal</i> -ACVMP 5-Methyl <i>CycloSal</i> -ACVMP 5-H- <i>CycloSal</i> -ACVMP	(103)
<i>CycloSal</i> -PCVMPs : 3-Methyl <i>CycloSal</i> -PCVMP 3-Methyl <i>CycloSal</i> -O-acetyl-PCVMP 5-H- <i>CycloSal</i> -PCVMP	(106)
3-methyl- <i>CycloSal</i> -BVDUMP dérivés 3'-O-modifiés : 3a, 3b, 3c, 3d, 3e, 3f, 3g, 3h	(106)
<b>Les analogues du pyrophosphate</b>	
PFA	(29, 42, 81, 82, 100, 126, 165)
Et-PFA	(100)
PAA	(82, 113, 151, 157)
<b>Les oligodésoxynucléotides</b>	
Les oligodésoxynucléotides (S-oligos) phosphorothioates : S-dC28, EB1, EB2, EB3	(165)
<b>Les composés à double activité anti-EBV-EA et anticancéreuse</b>	
<b>Les produits naturels</b>	
Acridone alcaloïdes	(155)
Iridoïdes	(69)
Monoterpènes : euglobal-G1, euglobal-G2 et euglobal-G3	(153)
Diterpènes	(107)
Triterpènes	(38)
Extraits du latex d'une plante : (Euphorbia antiquorum L.), 1 euphol, 2 antiquol C, 3 antiquol B, 4 euphorbol, 5 lemmaphylla-7, 21-dien-3β-ol, 6 isohelianol, 7 camelliol C	(3)



3-Epicabraleahydroxylactone, 3-Epicabraleadiol, Ocotillol II, Ocotillol I, Dammarenediol II, (20R)-Taraxastane-3 $\beta$ ,20-diol, Lupane-3 $\beta$ ,20-diol	(4)
Xanthones Brasixanthone A Brasixanthone B Brasixanthone C Brasixanthone D 6-deoxyjacareubin 3,8-dihydroxy-1,2-dimethoxyxanthone 8-desoxygartanin cudraxanthone 4-hydroxyxanthone 1,2-dimethoxyxanthone garcinone B $\beta$ -carotène	(67)
Quassinoides 15 quassinoides isolés à partir de <i>B. javanica</i>  16 quassinoides isolés à partir de <i>B. antidysenterica</i>  14 quassinoides isolés à partir de <i>P. ailanthoides</i>	(117)
Extraits du genre Citrus Extraits de l'espèce Fortunella, Extraits de l'espèce Poncirus	(68)
<b>Les produits semi-synthétiques</b>	
Quassinoides	(131)
Naphtoquinones	(136)
<b>Les autres composés (dont certains auraient des mécanismes d'action particuliers)</b>	
Les analogues de l'heliioxanthine (qui est une acrylnaphthalène lactone)	(168)
l'(-)-Epigallocatechin gallate (EGCG)	(21)
Delta-9 tetrahydrocannabinol (THC)	(101)
L'acide glycyrrhizique (GL : pour glycyrrhizic acid)	(84)
Benzimidazoles ribonucléosides : BDCRB 1263W94 (L-riboside) 175X	(170)
Les analogues 5-(1-azido-2-haloéthyl)-2'-désoxyuridines	(76)

A-5021 (ayant la base guanine)	(111)
les nucléosides carbocycliques (5'-nor carbaguanosine) : 3 4	(132)
Kutapressin (KU)	(135)
1a + 2a (±)-synadenol 1a (R)-(-)-synadenol 2a (S)-(+)-synadenol	(129)

**Tableau 8 : Les EC<sub>50</sub> des antiviraux anti-EBV citées dans les études *in vitro* (Calculées en fonction des différents paramètres)**

Antiviral	Lignée	Durée du traitement (pour calcul d'EC <sub>50</sub> )	Technique ou méthodologie	EC <sub>50</sub>	CC <sub>50</sub> (de la croissance cellulaire)	SI (CC <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub> )	Référence
GCV	B95-8	40 jours	Transformation des lymphocytes du sang du cordon ombilical	1-5 µg/mL			(46)
	P3HR-1	14 jours	Hybridation ARNc-ADN	0.05 µM	200 µM	4000	(91)
	P3HR-1	14 jours	Hybridation ARNc-ADN	0.05 µM			(14)
	P3HR-1	7 jours	Hybridation ADN-ADN	0.15 µM	200 µM	1333	(99)
	P3HR-1	7 jours	Slot Blot	0.4 µg/mL	11 µg/mL	24	(102)
	P3HR-1	7 jours	IF indirecte : VCA et EA	0.3 µg/mL (VCA)			(102)
	H1	5 jours	Slot Blot	5 µM	75 µM	ND	(92)
	H-1	ND	Hybridation ADN	5 µM			(171)
	P3HR-1	7 jours	PCR en temps réel	0.14 + 0.07 µg/mL	12 + 1.5 µg/mL	86	(47)
P3HR-1	7 jours	Slot Blot	0.2 + 0.2 µg/mL	12 + 1.5 µg/mL	60	(47)	
PCV	P3HR-1	5 jours	ELISA pour les antigènes EBV	1-3 µg/mL	> 100 µg/mL		(11)
	P3HR-1	5 jours	Hybridation ADN-ADN	2.3 + 0.8 µg/mL	> 100 µg/mL		(11)
	P3HR-1	7 jours	Slot Blot	3.2 ± 1.99 µg/mL	> 100 µg/mL	> 31	(103)
	P3HR-1	7 jours	IF indirecte VCA	6 ± 1.8 µg/mL			(103)

Antiviral	Lignée	Durée du traitement (pour le calcul d'EC <sub>50</sub> )	Technique ou méthodologie	EC <sub>50</sub>	CC <sub>50</sub> (de la croissance cellulaire)	SI (CC <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub> )	Référence
ACV	B95-8	40 jours	Transformation des lymphocytes du sang du cordon	> 10-100 µg/mL			(46)
	P3HR-1	14 jours	Hybridation ARNc-ADN	0.3 µM	250 µM	833	(91)
	P3HR-1 (LS)	14 jours	Hybridation ARNc-ADN	0.3 µM	255 µM	850	(87)
	Raji surinfectés par le virus P3HR-1	48 h	IF : pour détecter EA ou VCA	2.9 µM	> 440 µM		(76)
	B95-8	7 jours	Immortalisation des PBMCs : déterminer les titres d'infectivité	3-4 µg/mL			(11)
	P3HR-1	5 jours	ELISA pour les antigènes EBV	1-3 µg/mL	> 100 µg/mL		(11)
	P3HR-1	5 jours	Hybridation ADN-ADN	2.2 + 0.6 µg/mL	> 100 µg/mL		(11)
	P3HR-1	7 jours	Slot Blot	1.4 µg/mL	> 100 µg/mL	> 70	(102)
	P3HR-1	7 jours	IF indirecte : VCA et EA	0.91 µg/mL (VCA)			(102)
	H1	5 jours	Slot Blot	50 µM	1000 µM	ND	(92)
	Akata	72 h	Southern Blot	10 µM	55-90 µM	50-100	(170)
	P3HR-1	7 jours	Slot Blot	1.52 ± 0.59 µg/mL	88.3 ± 5.77 µg/mL	58	(103)
	P3HR-1	7 jours	IF indirecte VCA	5.42 ± 2.35 µg/mL			(103)
	P3HR-1	ND	ND	7.2 µM	422 µM		(105)
	P3HR-1	ND	ND	1.5 µg/mL	88.3 µg/mL		(106)
	P3HR-1	7 jours	Slot Blot	1.4 + 0.2 µg/mL			(111)
	Daudi surinfectées par le virus P3HR-1	3 jours	IF : VCA et gp350/220	VCA : 2.74+0.87 µg/mL gp 350/220 : 1.28+0.57 µg/mL	> 50 µg/mL		(132)
	Daudi surinfectées par le virus P3HR-1	3 jours	ELISA : VCA	1.66+0.38 µg/mL	> 50 µg/mL		(132)

ACV	Daudi surinfectées par le virus P3HR-1	3 jours	Hybridation <i>in situ</i> : ADN EBV	0.66+0.31 µg/mL	> 50 µg/mL		(132)
	Daudi		ELISA : détecter VCA	1.1 µM	> 222 µM		(171)
	P3HR-1	7 jours	PCR en temps réel	1.14 + 0.88 µg/mL	88 + 5.8 µg/mL	77	(47)
	P3HR-1	7 jours	Slot Blot	2.3 + 1.4 µg/mL	88 + 5.8 µg/mL	38	(47)
3-Méthyl CycloSal-ACVMP	P3HR-1	7 jours	Slot Blot	2.38 ± 1.19 µg/mL	> 100 µg/mL	> 42	(103)
	P3HR-1	7 jours	IF indirecte VCA	9.17 ± 2.52 µg/mL			(103)
5-Méthyl CycloSal-ACVMP	P3HR-1	7 jours	Slot Blot	1.85 ± 0.17 µg/mL	> 100 µg/mL	> 54	(103)
	P3HR-1	7 jours	IF indirecte VCA	10 ± 2.5 µg/mL			(103)
3-Méthyl CycloSal-PCVMP	P3HR-1	7 jours	Slot Blot	21.7 ± 1.13 µg/mL	67.5 ± 17.7 µg/mL	3	(103)
	P3HR-1	7 jours	IF indirecte VCA	35 ± 7.55 µg/mL			(103)
3-Méthyl CycloSal-O-acétyl-PCVMP	P3HR-1	7 jours	Slot Blot	> 50 µg/mL	> 100 µg/mL	ND	(103)
	P3HR-1	7 jours	IF indirecte VCA	> 50 µg/mL			(103)
5-H-CycloSal-PCVMP	P3HR-1	7 jours	Slot Blot	25.2 ± 10.7 µg/mL	87.5 ± 10.6 µg/mL	4	(103)
	P3HR-1	7 jours	IF indirecte VCA	33.7 ± 6.81 µg/mL			(103)
S2242	P3HR-1	7 jours	Slot Blot	0.0005 µg/mL	0.3 µg/mL	600	(102)
	P3HR-1	7 jours	IF indirecte : VCA et EA	0.00086 µg/mL (VCA)			(102)
D-FMAU	P3HR-1	14 jours	Hybridation ARNc-ADN	0.0065 µM	1 µM	154	(90)
L-FMAU	H1	5 jours	Slot Blot	5 µM	1000 µM	ND	(92)
FIAU	P3HR-1	14 jours	Hybridation ARNc-ADN	0.005 µM	1 µM	200	(90)
D-I-OddU	H1	5 jours	Slot Blot	7.6 µM	18 µM	ND	(92)
L-I-OddU	H1	5 jours	Slot Blot	0.033 + 0.017 µM	> 1000 µM	> 6250	(92)

Antiviral	Lignée	Durée du traitement (pour le calcul d'EC <sub>50</sub> )	Technique ou méthodologie	EC <sub>50</sub>	CC <sub>50</sub> (de la croissance cellulaire)	SI (CC <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub> )	Référence
L-OddU	H1	5 jours	Slot Blot	> 50 µM	ND	ND	(92)
L-Cl-OddU	H1	5 jours	Slot Blot	0.6 + 0.28 µM	> 100 µM	> 72	(92)
L-Br-OddU	H1	5 jours	Slot Blot	0.19 + 0.065 µM	> 1000 µM	> 2083	(92)
L-F-OddU	H1	5 jours	Slot Blot	50 µM	> 100 µM		(92)
L-I-SddU	H1	5 jours	Slot Blot	> 100 µM	> 100 µM	ND	(92)
L-CF3-OddU	H1	5 jours	Slot Blot	4 µM	> 100 µM	ND	(92)
BV-ara U	P3HR-1 (LS)	14 jours	Hybridation ARNc-ADN	0.26 µM	390 µM	1500	(87)
FIAC	P3HR-1	14 jours	Hybridation ARNc-ADN	0.005 µM	5 µM	1.000	(90)
BVDU	P3HR-1	14 jours	Hybridation ARNc-ADN	0.06 µM	390 µM	6.500	(90)
	P3HR-1	14 jours	Hybridation ARNc-ADN	0.06µM			(86)
	P3HR-1 (LS)	14 jours	Hybridation ARNc-ADN	0.055 µM	360 µM	6500	(87)
	P3HR-1	ND	ND	> 300 µM	225 µM		(105)
	P3HR-1	ND	ND	> 100 µg/mL	75 µg/mL		(106)
	P3HR-1	7 jours	PCR en temps réel	22 + 9 µg/mL	75 + 4.4 µg/mL	3.4	(47)
	P3HR-1	7 jours	Slot Blot	≥ 50 µg/mL	75 + 4.4 µg/mL	≤ 1.5	(47)
3-méthyl-CycloSal-BVDUMP	P3HR-1	ND	ND	4.1 µM	122 µM		(105)
	P3HR-1	ND	ND	2.1 µg/mL	63 µg/mL		(106)
dérivés 3'-O-modifiés du CycloSal-BVDUMP :	P3HR-1	ND	ND				(105)
3a				> 85 µM	110 µM		
3b				> 150 µM	> 300 µM		
3c				> 150 µM	> 300 µM		
3d				> 150 µM	> 300 µM		
3e				> 85 µM	57 µM		
3f				21 .8 µM	140 µM		
3g				9.5 µM	83 µM		
3h				40 µM	20 µM		

Antiviral	Lignée	Durée du traitement (pour le calcul d'EC <sub>50</sub> )	Technique ou méthodologie	EC <sub>50</sub>	CC <sub>50</sub> (de la croissance cellulaire)	SI (CC <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub> )	Référence
Dérivés 3'-O-modifiés du CycloSal-BVDUMP : 3 4 5 6	P3HR-1	ND		> 50 µg/mL >100µg/mL 31.5 µg/mL > 50 µg/mL	61 µg/mL >200µg/mL 16 µg/mL >100µg/mL		(106)
Enantiomère du 5'-norguanosine carbocyclique :	Daudi surinfectées par le virus P3HR-1	3 jours	IF : VCA et gp350/220	VCA : 1.8+0.28 µg/mL gp 350/220 : 4.04+4.14 µg/mL	> 50 µg/mL		(132)
	Daudi surinfectées par le virus P3HR-1	3 jours	ELISA : VCA	0.78+0.19 µg/mL	> 50 µg/mL		(132)
	Daudi surinfectées par le virus P3HR-1	3 jours	hybridation <i>in situ</i> (ADN EBV)	0.82+0.43 µg/mL	> 50 µg/mL		(132)
Enantiomère du 5'-norguanosine carbocyclique :	Daudi surinfectées par le virus P3HR-1	3 jours	IF : VCA et gp350/220	VCA : >50 µg/mL gp 350/220 > 50 µg/mL	> 50 µg/mL		(132)
	Daudi surinfectées par le virus P3HR-1	3 jours	ELISA : VCA	> 50 µg/mL	> 50 µg/mL		(132)
	Daudi surinfectées par le virus P3HR-1	3 jours	hybridation <i>in situ</i> (ADN EBV)	> 50 µg/mL	> 50 µg/mL		(132)
(S)-HPMPA	P3HR-1 (LS)	14 jours	Hybridation ARNc-ADN	0.08 µM	80 µM	1000	(85)
(S)-cHPMPA	P3HR-1 (LS)	14 jours	Hybridation ARNc-ADN	1.5 µM	150 µM	136	(85)

Antiviral	Lignée	Durée du traitement (pour le calcul d'EC <sub>50</sub> )	Technique ou méthodologie	EC <sub>50</sub>	CC <sub>50</sub> (de la croissance cellulaire)	SI (CC <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub> )	Référence
PMEA	P3HR-1	7 jours	Slot Blot	3.3 µg/mL	100 µg/mL	30	(102)
	P3HR-1	7 jours	IF indirecte : VCA et EA	1.2 µg/mL (VCA)			(102)
	P3HR-1	14 jours	Hybridation ARNc-ADN	1.1 µM			(86)
	P3HR-1	7 jours	PCR en temps réel	0.42 + 0.06 µg/mL	27 + 0.6 µg/mL	64	(47)
(S)-DHPA	P3HR-1	14 jours	Hybridation ARNc-ADN	pas d'effet			(86)
PMEDAP	P3HR-1 (LS)	14 jours	Hybridation ARNc ou ADN	0.16 µM	160 µM	1000	(85)
(S)-HPMPDAP	P3HR-1 (LS)	14 jours	Hybridation ARNc ou ADN	2.0 µM	155 µM	78	(85)
HPMPC	P3HR-1	7 jours	Slot Blot	0.4 µg/mL	18 µg/mL	45	(102)
	P3HR-1	7 jours	IF indirecte : VCA et EA	0.5 µg/mL (VCA)			(102)
	P3HR-1 (LS)	14 jours	Hybridation ARNc ou ADN	0.03 µM	150 µM	5000	(85)
	P3HR-1	7 jours	Slot Blot	0.22 ± 0.12 µg/mL	28.3 ± 3.51 µg/mL	129	(103)
	P3HR-1	7 jours	IF indirecte VCA	1.25 ± 0.35 µg/mL			(103)
	P3HR-1	7 jours	Slot Blot	0.4 + 0.3 µg/mL			(111)
	P3HR-1	7 jours	PCR en temps réel	0.065 + 0.036 µg/mL	28 + 3.5 µg/mL	431	(47)
	P3HR-1	7 jours	Slot Blot	0.1 + 0.1 µg/mL	28 + 3.5 µg/mL	280	(47)
cHPMPC	P3HR-1	7 jours	Slot Blot	0.3 µg/mL	18 µg/mL	60	(102)
	P3HR-1	7 jours	IF indirecte : VCA et EA	0.5 µg/mL (VCA)			(102)

Antiviral	Lignée	Durée du traitement (pour le calcul d'EC <sub>50</sub> )	Technique ou méthodologie	EC <sub>50</sub>	CC <sub>50</sub> (de la croissance cellulaire)	SI (CC <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub> )	Référence
PFA	P3HR-1 ou P3PFA induites par TPA (20 ng/mL) + n-butyrate (3 mM)	3 jours (+/- sulfate d'ammonium (AS))	Activité de l'ADN polymérase	+AS : 6-7 µg/mL (les deux lignées)			(126)
PAA	B95-8	6 jours	Immortalisation des PBL par le virus B95-8	100 µg/mL			(157)
1a + 2a (±)-synadenol	H-1	ND	ND	0.2 µM			(128)
1a (R)-(-)-synadenol	H-1	ND	ND	0.09 µM			(128)
2a (S)-(+)-synadenol	H-1	ND	ND	0.63 µM			(128)
GL	Raji surinfectés	24 h	IF indirecte pour EA/VCA	0,38 mM	4,8 mM		(84)
	Raji prétraités par GL (1 µM) avant surinfection	24 h	IF indirecte pour EA/VCA	0.04 mM			(84)
A-5021	P3HR-1	7 jours	Slot Blot	1 µg/mL			(111)
1263W94	Akata	72 h	Southern Blot	0.15-1.1 µM	55-90 µM	50-100	(170)



Antiviral	Lignée	Durée du traitement (pour le calcul d'EC <sub>50</sub> )	Technique ou méthodologie	EC <sub>50</sub>	CC <sub>50</sub> (de la croissance cellulaire)	SI (CC <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub> )	Référence
Dérivés cytosine : 18 (5-H) 8 (5-F) 10 (5-I) 22 (5-aza) 12 (2-H)	P3HR-1	14 jours	Hybridation ARNc-ADN	0.05-0.09 μM 22 μM 43 μM 22 μM 161 μM			(14)
Dérivés uracile : 11 (5-I) 13 (5-Br) 15 (5-Me)	P3HR-1	14 jours	Hybridation ARNc-ADN	27 μM 33 μM 100 μM			(14)
(+)-D-β-DOC	P3HR-1	7 jours	Hybridation ADN-ADN	1.5 μM	150 μM	100	(99)
(-)-L-β-DOC	P3HR-1	7 jours	Hybridation ADN-ADN	0.83 μM	30 μM	36	(99)
(+)-D-β-OTC	P3HR-1	7 jours	Hybridation ADN-ADN	8.3 μM	30 μM	3.6	(99)
(-)-L-β-OTC	P3HR-1	7 jours	Hybridation ADN-ADN	14 μM	10 μM	0.7	(99)
AZT	P3HR-1	7 jours	Hybridation ADN-ADN	7.7 μM	200 μM	26	(99)
	P3HR-1	7 jours	Slot Blot	10 μg/mL	53 μg/mL	5.3	(102)
	P3HR-1	7 jours	IF indirecte : VCA et EA	< 10 μg/mL (VCA)			(102)

D'après tous les résultats présentés tout au long de cette partie, on peut noter que :

- La structure d'un composé antiviral est déterminante pour son activité. Des modifications structurales peuvent augmenter significativement l'effet d'un antiviral ou au contraire l'inhiber complètement.
- Les valeurs d'EC<sub>50</sub> calculées sont très variables selon les études et dépendent de plusieurs facteurs dont : le système cellulaire, la durée du traitement, la méthodologie et le paramètre viral étudié. Cependant, peu nombreuses sont les études qui se différencient par un seul paramètre nous permettant de tirer des conclusions sur l'effet de ce paramètre sur les résultats obtenus. Pour cela, il est difficile de pouvoir établir une conclusion concernant l'influence de tel ou tel paramètre. Cependant, en plus de la variabilité des conditions expérimentales pour le calcul d'EC<sub>50</sub> (ou EC<sub>90</sub>), l'évaluation de la CC<sub>50</sub> a été réalisée parfois sous les mêmes conditions que celles d'EC<sub>50</sub> (lignée, durée) alors que dans d'autres cas elle a été mesurée à une durée inférieure et/ou sur un autre système cellulaire. Ceci a aussi entraîné des différences entre les valeurs des SI calculées pour un même composé. D'après ce qui précède, on conclut sur l'importance de la standardisation des essais en culture cellulaire pour faciliter la comparaison des résultats inter-études.

Enfin, même si de nombreuses molécules ont montré une certaine efficacité contre l'EBV *in vitro*, leur efficacité *in vivo* reste à prouver.

#### **IV. Evaluation *in vivo* de l'activité des antiviraux contre l'EBV**

Dans cette partie nous présenterons les résultats des études qui ont été réalisées *in vivo*.

En se basant sur l'activité anti-EBV démontrée *in vitro*, le choix d'antiviraux utilisés dans ces études a été restreint à quelques composés parmi les nombreuses molécules testées en culture cellulaire. Parmi ces antiviraux on a l'ACV, le valaciclovir, le desciclovir, le GCV, et la vidarabine pour les analogues nucléosidiques ; le HPMPC pour les analogues nucléotidiques, et le PFA pour les analogues du pyrophosphate.

Il est important de noter que la majorité de ces études n'ont rapporté que des cas isolés et peu nombreuses sont les études randomisées effectuées contre un placebo. Les résultats obtenus seront classés par type de maladie en notant quand c'est possible le nombre de patients, la nature et la durée du traitement antiviral.

Concernant les PTLDs, il est important de signaler que l'infection à EBV et le type et l'intensité de l'immunosuppression sont les deux facteurs les plus importants dans le développement de ces lymphoproliférations (61). Les traitements utilisés pour les PTLDs ont inclus : la réduction de l'immunosuppression, l'administration additionnelle d'agents antiviraux, l'infusion d'immunoglobuline anti-cellules B, l'ablation chirurgicale, et la chimiothérapie cytotoxique (60, 148, 152). Nous nous limiterons à l'exposition des résultats concernant les agents antiviraux.

La thérapie antivirale par l'ACV avec une réduction de l'immunosuppression a été décrite pour la première fois par Hanto et al. (60) résultant en une régression prolongée de PTLD chez des patients ayant une (mononucléose-like) maladie. En 1989, Pirsch et al. (124) ont rapporté pour la première fois l'usage du ganciclovir pour le traitement de PTLD dû à l'EBV. Chacun des deux patients traités avait un syndrome lymphoprolifératif sévère, après transplantation rénale pour le premier et pancréatique pour le deuxième. Malgré un diagnostic

précoce, la réduction de l'immunosuppression et le traitement par l'ACV, n'ont pas été efficaces. Par contre, l'administration du GCV pendant 14 jours chez le premier patient a été bénéfique ; durant un suivi de six mois le patient était toujours en complète rémission. Cependant, cet antiviral n'avait aucun effet sur la maladie chez le deuxième patient.

Plus récemment, l'analogue nucléotidique, HPMPC, s'est montré efficace dans le traitement d'une patiente (24 ans) qui a développé un lymphome-B (PTLD) associé à l'EBV après une transplantation HSCT (hematopoietic stem cell transplantation) allogène. Suite à l'arrêt de l'immunosuppression, la patiente a été traitée par du rituximab (un anticorps monoclonal anti-CD20) et du cidofovir (5 mg/kg I.V). Un suivi de la patiente jusqu'à 440 jours après transplantation a montré qu'elle était toujours en complète rémission (59).

Oertel et al. (115) ont rapporté pour la première fois, une complète rémission persistante de (nonmononucleosis-like) PTLN par le foscarnet en présence de niveau élevé continu de drogues immunosuppressives. Le patient (47 ans) receveur de transplantation simultanée de cœur et de rein, a été traité par le PFA intraveineux (2 x 200mg/jour puis 2 x 125 mg/jour) pendant 28 jours. Cette étude supporte l'hypothèse du rôle pathoétiologique de l'EBV dans les PTLNs aussi bien qu'un rôle causal du foscarnet dans le traitement de ces maladies.

Toujours dans le cadre de transplantation d'organes, Mozzanica et al. (108) ont rapporté le premier cas de lymphome B avec localisation exclusive au niveau de la peau chez un receveur de transplantation du cœur. Ce patient a développé le lymphome cutané (4 ans après la transplantation) avec une infection monoclonale à EBV. Malgré la nature monoclonale de la tumeur et son apparition tardive, une complète rémission a eu lieu après traitement par l'ACV (10 mg/kg/jour I.V pendant 14 jours) combiné à une réduction de l'immunosuppression. Ceci suggère que l'infection à EBV joue un rôle central dans la maintenance de la croissance de la tumeur.

L'observation d'Oettle et al. (116) confirme celle de Pirsch et al. citée ci-dessus et supporte l'idée que les concentrations du GCV achevées *in vivo* inhibent efficacement la réplication de l'EBV. Ils ont rapporté le cas d'un patient immunodéprimé qui a une maladie fébrile aiguë induite par l'EBV après transplantation de moelle osseuse allogène. Le traitement prophylactique par l'ACV n'a pas été efficace. Par contre le patient a été traité de façon réussie par le GCV administré (28 jours) en parallèle avec l'Ig polyvalente (21 jours).

Un cas de myélite transverse induite par l'EBV après transplantation de moelle osseuse allogène a été rapporté pour la première fois par Gruhn et al. (54). Le patient de 16 ans a développé la maladie 19 mois après la transplantation. Il a reçu le GCV I.V (10 mg/kg/jour) pendant 4 semaines, suivi par le GCV oral à une dose de 60 mg/kg/jour, pendant 4 semaines supplémentaires. Il a reçu aussi l'immunoglobuline CMV hyperimmune. Une complète rémission a été observée après 4 semaines de traitement.

Dellemijn et al. (37) ont diagnostiqué pour la première fois une méningo-encéphalite aiguë due à l'EBV (détecté par PCR dans le liquide céphalo-rachidien (LCR)) après transplantation allogène de moelle osseuse. Un traitement de 14 jours par le GCV (5 mg/kg, 2x/jour) a permis une complète rémission au bout de 4 semaines. Plus récemment, le traitement de l'encéphalite à EBV par le GCV a aussi été rapporté par MacGinley et al. (96). La maladie a été diagnostiquée (par la détection de l'EBV par PCR nichée dans le LCR) suite à une thérapie de 7 jours par OKT3 pour un rejet aigu d'allogreffe, chez une patiente transplantée rénale. Une rémission complète a été observée suite à l'administration du GCV (parentéral, 5 mg/kg/jour) durant 21 jours suivie par un traitement oral de trois mois par le valaciclovir (500mg b.d). La patiente est restée asymptomatique durant un suivi de 5 mois après arrêt du valaciclovir.

Les lymphoproliférations associées à l'EBV chez des patients ayant le SIDA sont des proliférations B polymorphiques qui ressemblent aux désordres lymphoprolifératifs après transplantation (169). Schneider et al. (140) ont rapporté la rémission complète de deux

patients ayant ces lymphoproliférations (réfractaires à la chimiothérapie) suite à un traitement de 3 semaines par le foscarnet. Schmidt et al. (139) ont aussi rapporté la thérapie efficace par le foscarnet (180 mg/kg b.w, 21 jours) dans une lymphoprolifération polymorphique B associée à l'EBV chez un patient infecté par le VIH.

Dans le contexte d'une infection chronique active à EBV, un traitement de 5 jours par l'ACV n'a montré aucune efficacité dans l'étude de Sullivan et al. (150). Il n'y avait pas d'amélioration de la condition clinique de la patiente (de 18 mois) même après 6 mois de suivi. Ce résultat est en corrélation avec l'étude de Ishida et al. (66) dans laquelle une patiente de 11 ans avait une infection chronique active à EBV réfractaire à l'ACV. Cependant, l'administration du GCV (I.V 5 mg/kg) a abouti au traitement réussi de la maladie. Contrairement aux études précédentes, l'ACV avait une efficacité dans le traitement d'une infection chronique à EBV associée à une fièvre et une pneumonie interstitielle (141).

Plus récemment, Kimura et al. (73) ont rapporté l'effet d'un autre analogue nucléosidique, la vidarabine (adénine arabinoside), chez 4 patients ayant une infection à EBV chronique active sévère de type NK. Les patients ont répondu à la thérapie et leurs symptômes se sont améliorés. Après la thérapie le nombre de cellules NK dans le sang périphérique a diminué. Chez 2 patients, la charge virale (déterminée par PCR quantitative et hybridation *in situ*) a diminué parallèlement avec l'amélioration symptomatique. Cependant, l'effet de cet antiviral était transitoire ; les symptômes ont réapparu après l'arrêt du traitement et la charge virale EBV a augmenté de nouveau.

Plusieurs études contre placebo ont évalué l'efficacité de l'ACV dans la MNI (10, 118, 161, 167). L'ACV s'est avéré sans effet sur l'EBV présent dans les lymphocytes comme l'a montré le test de transformation spontanée des lymphocytes B des patients MNI. Seule la production de virions dans la salive baisse au cours du traitement d'une façon temporaire et se rétablit dès l'arrêt du traitement. D'après une méta-analyse publiée en 1999 par Torre and

Tambini (158) et concernant 5 études randomisées (339 patients), aucun bénéfice clinique n'a été observé sous ACV comparé à un placebo. Ce manque d'efficacité de l'ACV a aussi été rapporté dans le cas d'un enfant de 27 mois ayant une infection à EBV aiguë fatale (150). Contrairement à ces études, l'ACV a montré un effet bénéfique. Dans l'étude de Baykurt et al. (13) une patiente (3.5 ans) ayant une MNI qui a été compliquée par une myocardite, a été traitée avec succès par une thérapie de combinaison : de prednisolone (6 semaines) et d'ACV (15 mg/kg par dose, 3x/jour, 14 jours). L'ACV s'est avéré aussi efficace dans le traitement d'un syndrome hémophagocytaire (HPS) associé à un lymphome B. Administré avec l'Ig intraveineuse pour une durée de 5 jours, ceci a abouti à la disparition des anomalies associées à cette maladie (51). Similairement, dans l'étude de Brockemeyer et al. (18) deux patients infectés par le VIH ayant un lymphome malin non-hodgkinien associé à l'EBV ont été traités de façon réussie par une thérapie de maintenance par l'ACV.

Le traitement antiviral a aussi été rapporté dans d'autres types de maladies EBV. Le GCV a aussi montré une efficacité dans le cas de maladie interstitielle chronique du poumon. En 2000, Pflieger et al. (123) ont rapporté le cas d'un enfant de 5 mois ayant cette maladie. Après 7 mois de symptômes respiratoires, il a été traité avec réussite par le GCV intraveineux (5 mg.kg/b.w) pendant 10 jours suivi par l'ACV oral (30 mg.kg/b.w) pendant 20 jours. Il est resté asymptomatique durant un suivi de 2 ans.

Perkkio et al. (122) ont aussi rapporté le traitement réussi par l'ACV, le cyclophosphamide et l'interféron- $\alpha$  d'un désordre lymphoprolifératif B associé à l'EBV au niveau du poumon (développé après chimiothérapie pour une leucémie lymphoblastique aiguë).

Dans une étude (80) de phase III en double aveugle avec placebo : onze patients de moyenne d'âge 42.7 ans ayant un syndrome de fatigue chronique (CFS) dont 4 ayant une coinfection à l'EBV, ont été suivis pendant 18 mois. Ils ont été traités par le GCV I.V 5

mg/kg q12h (1 mois), suivi par le GCV oral 1g, q8h. Après 6 mois d'arrêt du GCV I.V, s'il n'y a pas d'amélioration et si les anticorps anti-EBV sont élevés le valacyclovir oral 1 g, q6h a été rajouté au GCV oral. A 18 mois, le (mean symptom score) était de 0.19 sachant qu'un (symptom score) de 1 correspond à la présence de tous les 4 symptômes liés à la maladie, alors qu'un (symptom score) de 0 correspond à l'absence de tous ces symptômes. Dans une autre étude de Lerner et al. (79) réalisée sur 16 patients ayant une CFS, ils ont montré une amélioration de ces patients après 6 mois de traitement par le valacyclovir.

Drago et al. (39) ont rapporté le cas d'une patiente (de 30 ans) ayant une amyloïdose cutanée primaire et un syndrome de fatigue chronique. Le traitement par l'ACV oral (4g/jour) et l'interféron- $\alpha$  (3 MU 3x/semaine) a rapidement amélioré son état. Ce traitement arrête la croissance des lymphocytes sanguins en culture et réduit le contenu en ADN EBV des sécrétions orales et des PBMCs. En plus de l'activité antivirale, ces données supportent une réactivation endogène de l'infection à EBV et suggèrent une relation causale avec l'amyloïdose primaire.

Quelques études ont aussi rapporté le traitement antiviral de la leucoplasie orale chevelue (OHL). Greenspan et al. (52) ont rapporté l'effet du desciclovir (BW A515) (une prodrogue de l'ACV) sur l'OHL dans une étude contre un placebo. 14 patients dont 8 recevaient le desciclovir, et 6 le placebo : administrés pendant 14 jours à 250 mg par voie orale 3x/jour. Les lésions ont montré une diminution significative des caractéristiques histologiques de l'OHL chez les premiers. Des études cytochimiques, d'hybridation *in situ*, et d'ultrasructure (microscopie électronique) ont indiqué que l'infection à EBV a été éliminée ou fortement réduite seulement chez ce groupe. Cependant, cet effet était temporaire ; les lésions ont réapparu après arrêt du desciclovir durant 1 à 4 mois. En 1994, Albrecht et al. (5) ont rapporté pour la première fois l'efficacité du foscarnet contre l'OHL associée à l'EBV chez trois patients VIH positifs. Il a été administré par voie intraveineuse à 4800 mg, 2x/jour



pendant 14 jours chez le premier patient (de 35 ans), à 5400 mg, 2x/jour, pendant 3 semaines chez le deuxième (de 38 ans), et à 6000 mg, 2x/jour, pendant 3 semaines chez le troisième patient (de 45 ans), ce qui résultait en une complète résolution de l'OHL.

Schramm et al. (142) ont rapporté le cas d'un patient infecté par le VIH traité par thérapie antirétrovirale et par du foscarnet intraveineux durant deux ans environ à cause de la possibilité d'une rétinite à CMV. Pendant moins d'un mois, après arrêt du traitement par le foscarnet, le patient développait une maladie de Hodgkin EBV-positif de cellularité mixte et une sérologie EBV a montré une réactivation virale. Ce cas présenté ajoute une évidence qu'il y a une relation causale directe entre l'infection à EBV et le développement de HD. Il est en corrélation avec les études citées ci-dessus et montrant une efficacité du PFA *in vivo*.

Hocqueloux et al. (65) ont rapporté le cas d'un patient (42 ans) ayant un PEL (primary effusion lymphoma) associé au SIDA. L'administration du cidofovir (I.V 5 mg/kg) en combinaison avec l'interféron alpha (3 MIU) et une thérapie antirétrovirale hautement active (HAART) sans chimiothérapie cytostatique, a abouti à la rémission complète du patient.

Ces dernières années, certaines études se sont intéressées à l'évaluation de l'importance d'une prophylaxie antivirale dans le cas des PTLDs. En 1995, l'étude de Davis et al. (31) réalisée sur 83 patients transplantés rein-pancréas et 123 patients transplantés du foie, a montré l'efficacité de cette la prophylaxie antivirale. L'administration du GCV intraveineux suivi par l'ACV oral à haute dose a diminué l'incidence de PTLD par rapport à celle enregistrée précédemment (en prenant en considération le statut EBV des patients et l'usage de préparations anti-lymphocytes). Plus récemment, Malouf et al. (97) ont aussi rapporté le traitement prophylactique continu chez des patients (transplantés de poumon) EBV séronégatifs à haut risque. Les résultats sont encourageants montrant une diminution de l'incidence de PTLD chez ces patients, en absence de thérapie d'induction. L'étude de Farmer

et al. (44) est l'une des premières investigations employant l'usage systémique d'un traitement prophylactique à long-terme suivi par une thérapie préventive dirigée contre la maladie à EBV après transplantation intestinale (IT). Les résultats montrent que la prophylaxie empêche la maladie virale durant la durée de la thérapie. Plus de 50 % des patients n'avaient pas d'évidence de virémie (définie comme la présence d'une PCR positive en absence de symptômes cliniques) ou de maladie EBV après IT. L'incidence de la maladie à EBV est de 7.7 % chez les patients, et elle n'a pas lieu dans le cas où la PCR est négative. D'après ce rapport, on conclut qu'en utilisant ce protocole de prophylaxie à long-terme, et de thérapie préemptive, un excellent contrôle de la maladie à EBV peut être obtenu après IT.

Suite à cette brève présentation des études *in vivo* on peut conclure que :

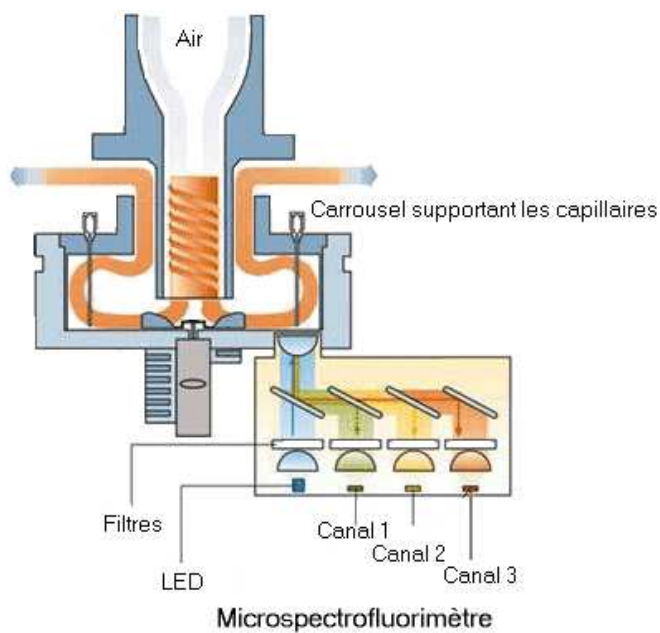
- Il est clair que chacun de ces antiviraux mentionnés dans ces études a joué un rôle dans l'amélioration de symptômes de la maladie ou la rémission complète du patient. Cependant, dans certaines de ces études, d'autres facteurs tels que la réduction de l'immunosuppression, l'administration de molécules non antivirales (immunoglobuline, interféron- $\alpha$ , anti-CD20) ont aussi participé au résultat final. Il n'est pas donc possible de trancher sur l'exclusivité du bénéfice de l'action antivirale.
- Le traitement virustatique par les antiviraux serait une approche intéressante dans le traitement des maladies EBV.

## **Rappel sur les techniques utilisées dans notre étude expérimentale**

## Le système du LightCycler

### Description du système du LightCycler (Roche)

L'instrument LightCycler est constitué de deux composants différents : le thermocycleur à air pulsé et l'unité optique (figure 6). Ces composants fonctionnent ensemble pour permettre de réaliser de façon simple des applications telles que la quantification par PCR et RT-PCR, l'analyse de mutations grâce à des courbes de fusion.



**Figure 6 : Représentation schématique de l'instrument du LightCycler**

## 1. Le thermocycleur

Deux éléments se trouvent au niveau du thermocycleur : le carousel et la chambre thermique.

### a. Le carousel

Les réactions de PCR ont lieu dans des capillaires en verre de borosilicate (diamètre extérieur, 1,55 mm ; longueur, 35 mm) (figure 7) qui peuvent contenir jusqu'à 20  $\mu\text{L}$  d'échantillon. Ces capillaires sont placés dans un carousel (figure 8) qui est l'élément central dans la chambre thermique et qui peut contenir jusqu'à 32 capillaires. Ils ont un ratio élevé de surface-volume qui permet un transfert thermique très rapide entre le mélange réactionnel et l'air utilisé pour les montées en température (voir paragraphe suivant). Grâce à cette combinaison entre l'utilisation de l'air et le ratio (S/V) élevé des capillaires, un seul cycle de PCR peut être réalisé en 30 secondes, et la réalisation d'une PCR complète de 30-40 cycles peut se faire en 20-30 minutes.



**Figures 7 et 8 : Représentation schématique des capillaires (figure 7) et du carousel (figure 8)**

### **b. La chambre thermique**

Le système du LightCycler utilise l'air pour atteindre les températures nécessaires à la réaction de PCR. L'air est chauffé dans un bloc chauffant contrôlé par des thermocouples. Puisque l'air n'a virtuellement pas de masse, ce processus est alors nettement plus rapide qu'avec les thermocycleurs conventionnels. Grâce à des variations thermiques très rapides, jusqu'à 20°C/seconde, les températures peuvent donc être atteintes en quelques secondes avec une précision de  $\pm 0.3^{\circ}\text{C}$ .

Un ventilateur, localisé à la base de la chambre thermique, distribue l'air entrant donc la température d'une manière uniforme, exposant ainsi tous les capillaires à des conditions identiques de PCR. Ceci est avantageux par rapport aux thermocycleurs conventionnels dont la géométrie des blocs peut causer des variations dans les conditions de PCR pour les différentes positions de l'échantillon. Pour permettre des mesures de fluorescence, la chambre thermique est directement connectée au système optique du spectrofluorimètre.

## **2. L'unité optique**

Elle est constituée de plusieurs éléments :

- Un moteur qui fait tourner le carousel et ajuste l'unité optique avec une haute précision. Durant une procédure de recherche qui précède chaque PCR, la position optimale pour le carousel et l'unité optique est déterminée pour chaque capillaire (le temps de mesure pour chaque capillaire est de 20 millisecondes approximativement).
- Une diode bleue (LED : light-emitting diode) émet de la lumière qui est filtrée par un système optique spécial pour produire un faisceau de lumière homogène (470 nm). La lumière émise par cette source d'énergie permet l'excitation des fluorophores qui se trouvent au niveau de l'échantillon.

- Des miroirs dichroïques dévient la lumière émise par l'échantillon qui sera mesurée dans l'un des trois canaux de détection selon les propriétés spectrales du fluorophore utilisé. Le canal 1 (F1) permet de mesurer à 530 nm les signaux émis soit par la fluorescéine ou par le SYBR Green I. Les fluorescences émises par le LC-Red 640 (LightCycler-Red-640-N-hydroxy-succinimide ester) et le LC-Red 705 (LightCycler-Red-705-Phosphoramitide) sont respectivement détectées dans le canal 2 (F2, 640 nm) et le canal 3 (F3, 710 nm).

### **3. Les formats de fluorescence**

Différents formats de fluorescence peuvent être utilisés dans le système du LightCycler. Ils permettent la corrélation entre la quantité du produit amplifié et les signaux de fluorescence mesurés. Ci-dessous, nous présentons une explication détaillée du principe de chacun de ces formats.

#### **a. Sondes d'hybridation**

Le format utilisant des sondes d'hybridation couplées à des fluorophores, permet la quantification de l'ADN de façon séquence-spécifique. Les deux sondes utilisées sont : la sonde d'hybridation 1 qui est marquée à la fluorescéine (fluorophore donneur) à l'extrémité 3' et la sonde d'hybridation 2 qui est marquée en 5' au fluorophore accepteur, le LC-Red 640 ou le LC-Red 705. Ces sondes oligonucléotidiques s'hybrident à des séquences internes adjacentes au niveau de l'ADN cible, ramenant ainsi les deux fluorophores à proximité. L'extrémité 3' du fluorophore accepteur doit être phosphorylée pour empêcher son élongation par l'ADN polymérase durant la PCR.

Le schéma suivant illustre comment les deux sondes d'hybridation produisent une émission de fluorescence mesurable :

- Figure 9-A : durant la phase de dénaturation de la PCR, l'hybridation des sondes n'a pas encore lieu. De la lumière bleue émise à partir de la diode excite la fluorescéine (fluorophore donneur) qui émet de la fluorescence verte. Cependant, cette énergie émise ne peut pas exciter le fluorophore accepteur. Le transfert d'énergie [nommé transfert d'énergie par résonance de fluorescence (fluorescence resonance energy transfer : FRET)] ne peut pas avoir lieu car il dépend de la distance qui sépare les deux fluorophores. L'énergie peut être transférée seulement si les deux molécules sont à proximité (1-5 nucléotides). Par conséquent, il n'y a pas d'émission de fluorescence rouge par le LCRed (640 ou 705).
- Figure 9-B : durant l'étape d'hybridation, les sondes oligonucléotidiques s'hybrident au niveau de l'ADN cible, ramenant ainsi les deux fluorophores à proximité. Le FRET peut donc avoir lieu. L'énergie émise par le fluorophore donneur va exciter le fluorophore accepteur qui à son tour va émettre une lumière fluorescente rouge mesurable (à une longueur d'onde différente).

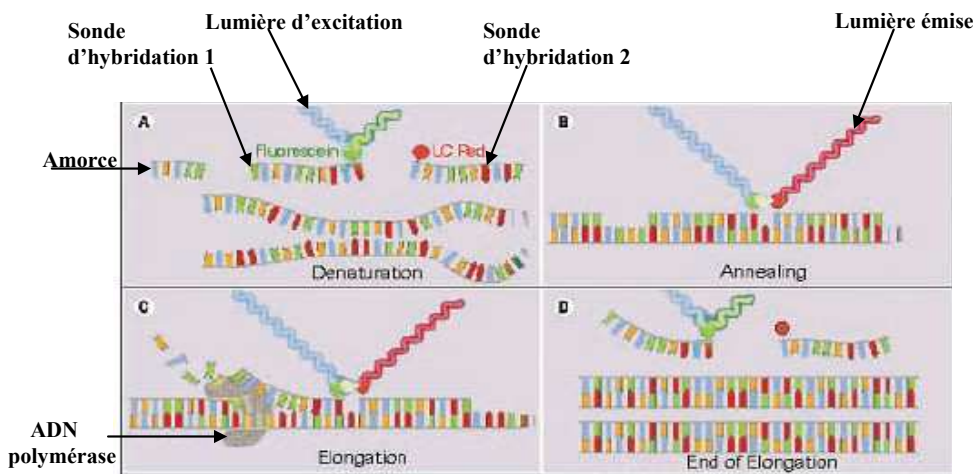
La fluorescence émise par le LC-Red 640 ou le LC-Red 705 est directement proportionnelle à la quantité de l'ADN cible générée durant la PCR. Elle est mesurée au niveau de l'unité optique à la fin de chaque étape d'hybridation (quand elle est à son maximum).

- Figure 9-C : durant l'étape d'élongation les sondes d'hybridation sont déplacées.



- Figure 9-D : à la fin de cette étape, le produit PCR est double-brin ; les sondes d'hybridation sont trop loin l'une de l'autre ; par conséquent ceci ne permet pas que le FRET ait lieu et la fluorescence rouge ne peut donc pas être détectée.

L'avantage de ce format est que la fluorescence n'est pas détectée quand il n'y a pas d'échantillon. Bien que des dimères d'amorces puissent être formés, ils ne peuvent pas être détectés. C'est pour ces raisons de haute spécificité que nous avons utilisé ce format dans nos expériences pour la quantification de l'ADN EBV et de l'ADN cellulaire (voir partie Matériels et Méthodes).



**Figure 9 : Représentation schématique de l'action des sondes d'hybridation**

D'après le site : <https://www.roche-applied-science.com>

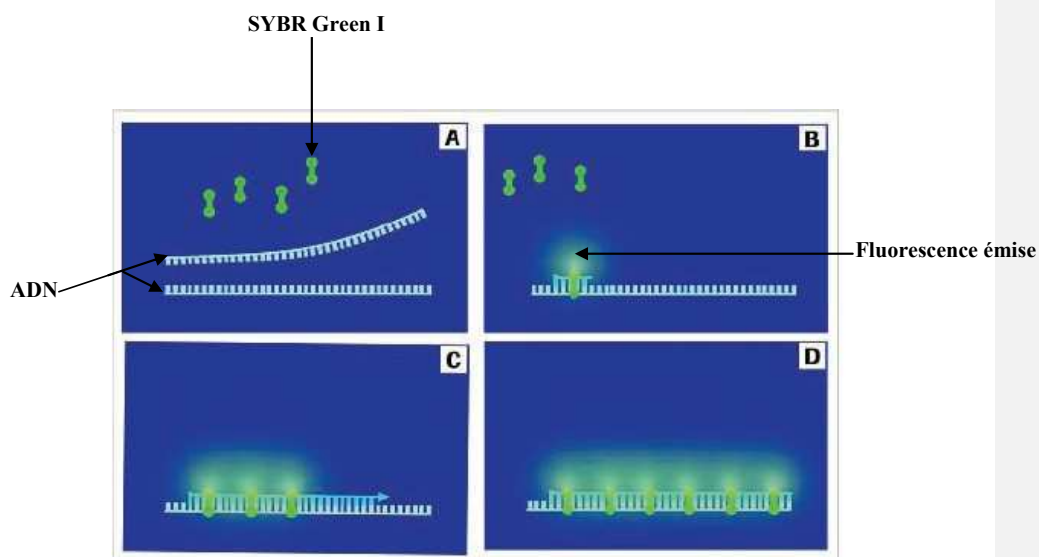
#### **b. SYBR Green I**

Le bromure d'éthidium n'est pas utilisé dans le système du LightCycler à cause de sa faible sensibilité et spécificité. Cependant, l'utilisation du SYBR Green I est plus spécifique, car c'est un fluorophore qui n'émet de forte fluorescence que lorsqu'il est lié à l'ADN double brin (au niveau du petit sillon).

Durant les différentes étapes de PCR, des intensités différentes de signaux de fluorescence peuvent être détectées selon la quantité d'ADN double brin présente :

- Figure 10-A : tout l'ADN est simple brin suite à l'étape de dénaturation. Par conséquent, le SYBR Green I ne se lie pas et l'intensité des signaux de fluorescence est faible.
- Figure 10-B : durant la phase d'hybridation, les amorces s'hybrident à la séquence cible, ce qui résulte en petites séquences d'ADN double brin auxquelles l'agent intercalant peut se lier, ce qui fait augmenter alors l'intensité de fluorescence.
- Figures 10-C et -D : durant la phase d'élongation, les amorces sont rallongées et donc de plus en plus de SYBR Green I peut se lier. A la fin de cette phase, tout l'ADN est devenu double brin, et un taux maximal de sonde est lié. Pour ceci, la mesure de la fluorescence émise se fait à la fin de chaque phase d'élongation d'un cycle de PCR et indique la quantité du produit PCR formée durant ce cycle.

Cependant, l'inconvénient du SYBR Green I est qu'il se lie à l'ADN double brin de façon séquence-indépendante, ce qui fait que les produits spécifiques, les produits non-spécifiques et les dimères d'amorces (surtout pour les faibles concentrations d'échantillons) peuvent être tous détectés.



**Figure 10 : Représentation schématique de l'action de SYBR Green I**

D'après le site : <https://www.roche-applied-science.com>

### c. Sondes d'hydrolyse (technologie TaqMan)

Le système du LightCycler permet aussi d'autres formats de détection de fluorescence tels que les sondes d'hydrolyse (technologie TaqMan) (figure 11).

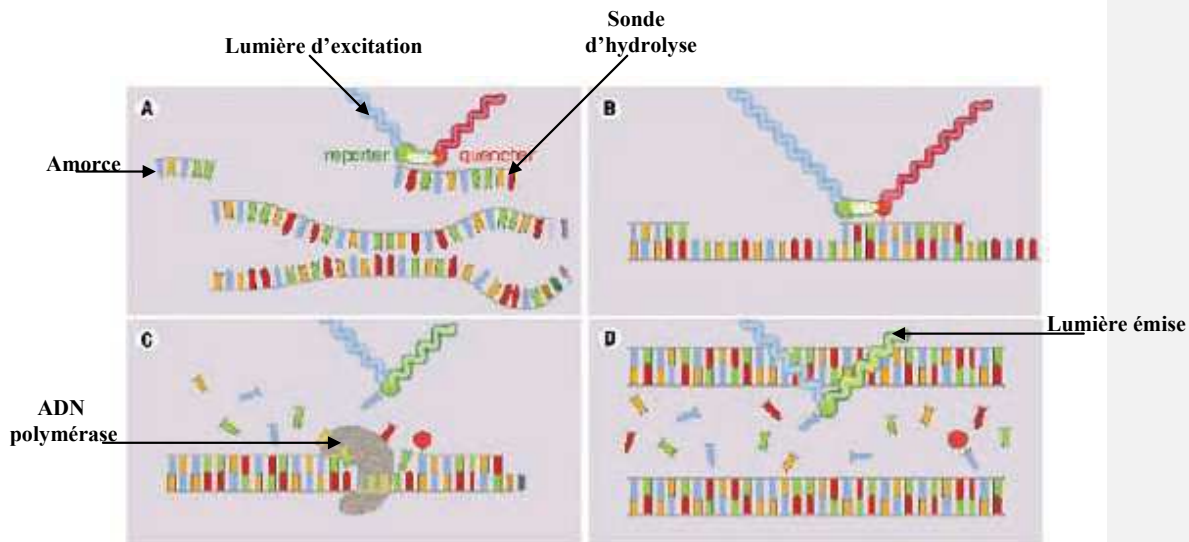
La technologie Taqman est basée sur l'activité 5'- exonucléasique de la Taq polymérase qui hydrolyse une sonde hybridée à sa séquence complémentaire sur l'ADN cible durant l'étape d'élongation de la PCR.

La sonde utilisée est marquée à son extrémité 5' par un fluorophore émetteur (*reporter*) (ex . FAM : 6-carboxy-fluoresceine) ; son émission de fluorescence est inhibée par un second fluorophore suppresseur (*quencher*) présent à l'extrémité 3' (ex . TAMRA : 6-carboxy-tetramethyl, rhodamine).

Figures 11-A et -B : durant les deux étapes de dénaturation (11-A) et d'hybridation (11-B), quand le *reporter* est stimulé, il transfère son énergie au *quencher* par le système de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), et celui-ci dissipe cette énergie sous forme de chaleur : il n'y a donc pas d'émission de fluorescence par le fluorophore (*reporter*).

Figures 11-C et -D : La Taq polymérase débute l'elongation du nouveau brin d'ADN à partir de l'amorce jusqu'à ce qu'elle rencontre la sonde hybridée qu'elle hydrolyse avec son activité 5'-exonucléasique. Le *reporter* est alors libéré et peut ainsi émettre de la fluorescence qui sera mesurée. Cette fluorescence augmente à chaque cycle proportionnellement au taux d'hydrolyse de la sonde et donc au nombre de copies d'ADN amplifiées au cours de la PCR.

La technologie Taqman présente une spécificité accrue grâce à l'utilisation de sonde spécifique. L'émission de fluorescence non spécifique, liée à des mauvais appariements ou à des dimères d'amorces, est donc significativement réduite.



**Figure 11 : Représentation schématique de l'action des sondes d'hydrolyse**

D'après le site : <https://www.roche-applied-science.com>

#### **d. Mesure de la fluorescence**

Les propriétés optiques du verre de borosilicate rendent les capillaires idéalement convenables comme cuvettes pour les mesures de fluorescence émise par les produits PCR amplifiés. L'unité optique détecte cette fluorescence à partir de l'extrémité des capillaires.

Etant donné que l'intensité du signal de fluorescence produit par un fluorophore est proportionnelle à la quantité du produit PCR formé, alors l'augmentation de cette intensité correspond à une augmentation de la formation du produit PCR. Le système du LightCycler permet la mesure de cette fluorescence (une fois à chaque cycle en général) à des intervalles pré-programmés durant la PCR.

#### **4. Analyse des données**

Grâce au Software du LightCycler, les données de fluorescence sont analysées de façon simple et rapide. Elles sont immédiatement tracées sur l'écran de l'ordinateur permettant une analyse en temps réel et en ligne.

#### **5. Les avantages du système du LightCycler**

Le système du LightCycler nous offre plusieurs avantages dans la réalisation de la PCR parmi lesquels on a :

- Des résultats analysés en temps réel et en ligne évitant les procédures (telles que l'analyse sur gel d'agarose) nécessitant un temps additionnel pour l'analyse des produits PCR.
- L'analyse directe des résultats permet d'éviter le nombre d'étapes de manipulation de l'échantillon, minimisant ainsi le risque de contamination.

- Un large éventail de détection, de  $10$  à  $10^{10}$  copies dans une seule expérience de PCR.
  
- La reproductibilité :
  - ✓ une seule chambre thermique avec une distribution uniforme de la température garantissant des conditions identiques de PCR pour chaque capillaire.
  - ✓ des mesures identiques de fluorescence grâce à l'utilisation d'une seule unité optique.
  - ✓ une faible variation d'échantillon à échantillon.
  - ✓ une haute résolution d'évaluation des concentrations de départ.
  
- La rapidité : les analyses par PCR LightCycler peuvent être réalisées en seulement 20-30 min pour 30-40 cycles.
  
- La précision : la quantification se fait d'une manière très précise grâce à la mesure de la fluorescence à chaque cycle durant la PCR.

# **La cytométrie en flux**

## **I. Principe**

La cytométrie en flux est une technologie qui permet de mesurer simultanément puis d'analyser de multiples caractéristiques physiques concernant des particules ou des cellules.

Les mesures sont effectuées pendant que celles-ci défilent dans un courant fluide à travers un faisceau de lumière laser, à une vitesse de quelques milliers de cellules par seconde.

### **1. Quel type de particules ?**

N'importe quelle particule ou cellule en suspension de taille comprise entre 0.2 et 150 micromètres est convenable pour l'analyse. Cependant, les cellules d'un tissu solide doivent être désagrégées avant analyse.

### **2. Les propriétés mesurées**

Les propriétés d'une particule qui peuvent être mesurées par cytométrie en flux incluent :

- Sa taille relative : FSC (forward scatter).
- Sa granularité relative ou complexité interne : SSC (side scatter).
- L'intensité relative de fluorescence.

Ces caractéristiques sont déterminées en utilisant un système de couplage optique-électronique qui enregistre comment la cellule ou la particule disperse la lumière laser incidente et émet de la fluorescence.

### **3. Dispersion de la lumière (Light Scattering)**

La dispersion de la lumière (Light Scattering) a lieu suite à l'interaction des particules avec les rayons laser. Ces particules dévient la lumière incidente, et cette lumière diffusée ou réfléchiée peut être mesurée selon divers angles par rapport au faisceau incident.

Cette dispersion dépend des propriétés physiques d'une particule, notamment de sa taille et de sa complexité interne. Les facteurs qui affectent le Light Scattering sont la membrane de la cellule, le noyau, et n'importe quel matériel granuleux à l'intérieur de la cellule. La forme de la cellule et la topographie de sa surface contribuent aussi à la dispersion totale de la lumière.

### **4. Qu'est ce que le FSC et le SSC ?**

#### **FSC :**

- C'est la lumière diffractée aux petits angles.
- Elle est proportionnelle à la taille de la cellule.
- Elle est détectée dans l'axe de la lumière incidente (à un angle  $< 10^\circ$ ).

#### **SSC :**

- C'est la lumière diffractée aux grands angles.
- Elle est proportionnelle à la granularité de la cellule, ou à sa complexité interne.
- Elle est détectée à  $90^\circ$  par rapport à l'axe de la lumière incidente.

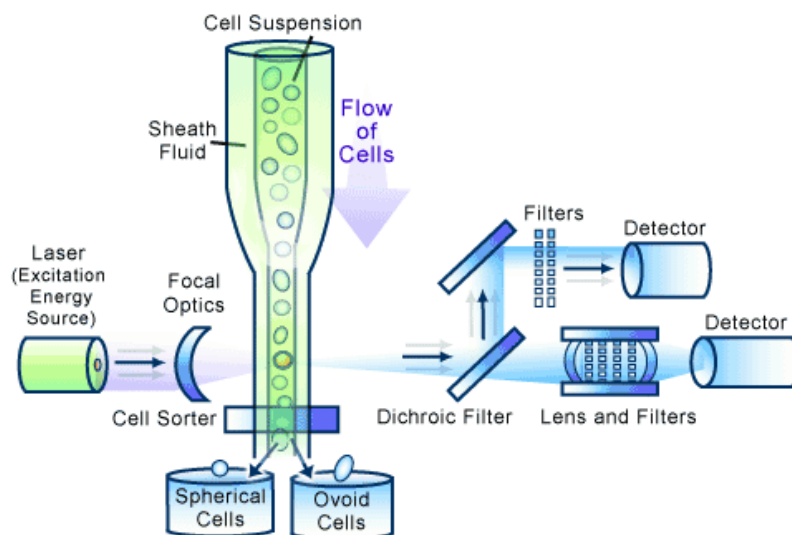


## Mesures FSC-SSC :

La corrélation des mesures FSC et SSC permet la différenciation de types cellulaires dans une population cellulaire hétérogène. Aussi, des sous-populations cellulaires peuvent être différenciées en utilisant les paramètres FSC-SSC.

### **5. Les différentes parties du cytomètre**

Un cytomètre en flux est constitué de trois principaux systèmes : fluïdique, optique, et électronique (figure 12).



**Figure 12 : Schéma représentant les différentes parties d'un cytomètre**

D'après le site : <http://www.bioteach.ubc.ca/MolecularBiology/FlowCytometry/>

#### **a. Le système fluïdique**

Le système fluïdique transporte les particules dans un courant jusqu'au faisceau laser pour inspection. Son rôle est donc l'introduction et le positionnement des cellules à analyser.

La partie du courant fluide où les particules sont localisées est appelée le noyau de l'échantillon (sample core). Pour une illumination optimale, le courant transportant les particules devrait être positionné dans le centre du faisceau laser. Quand les particules passent à travers le faisceau laser, elles dévient la lumière et n'importe quelles molécules fluorescentes présentes sur la particule émettent de la fluorescence. Une seule cellule ou une seule particule devrait passer à travers le faisceau laser à un moment donné.

**b. Le système optique**

Il est constitué d'optiques d'excitation et d'optiques de collection :

- **Les optiques d'excitation**

Elles sont constituées d'un laser et de lentilles qui sont utilisées pour ajuster et focaliser le faisceau laser pour illuminer les particules qui se trouvent dans le noyau d'échantillon.

- **Les optiques de collection**

Les optiques de collection sont formées alors de lentilles de collection pour collecter la lumière émise à partir de l'interaction particule-faisceau laser et d'un système de miroirs et de filtres optiques pour diriger les longueurs d'onde de la lumière collectée vers les détecteurs optiques appropriés.

Il existe deux types de photodétecteurs : chaque fois qu'une cellule ou particule passe à travers le faisceau de lumière laser, les signaux émis sont déviés 1) soit vers des tubes photomultiplicateurs (PMTs) qui sont utilisés pour détecter les signaux les plus faibles générés par le SSC et la fluorescence, 2) soit vers une photodiode qui est moins sensible aux signaux de lumière que les (PMTs) et qui est donc utilisée pour détecter les signaux les plus forts résultants du FSC. Ces détecteurs produisent des signaux électroniques proportionnels aux signaux optiques qui les atteignent.

**c. Le système électronique**

Le rôle du système électronique est donc de convertir les signaux optiques en signaux électroniques et de numériser ces signaux pour une analyse informatique grâce au logiciel CellQuest.

Les données analysées sont représentées sous forme d'histogrammes à un ou deux paramètres.

**6. Application de la cytométrie en flux : étude de la viabilité cellulaire et de l'apoptose**

L'une des applications de la cytométrie en flux est la mesure quantitative du pourcentage des cellules viables ou des cellules apoptotiques et ceci en utilisant un système de marquage spécifique.

**a. Détection des cellules viables**

L'utilisation dans les essais de cytométrie en flux de sondes de marquage tel que le 7-Amino-actinomycine (7-AAD), ou l'iodure de propidium (PI : propidium iodide) permet de distinguer les cellules viables des cellules mortes. La fluorescence de 7-AAD est détectée dans la gamme du spectre à 650 nm, celle du PI est détectée dans l'orange (562-588 nm).

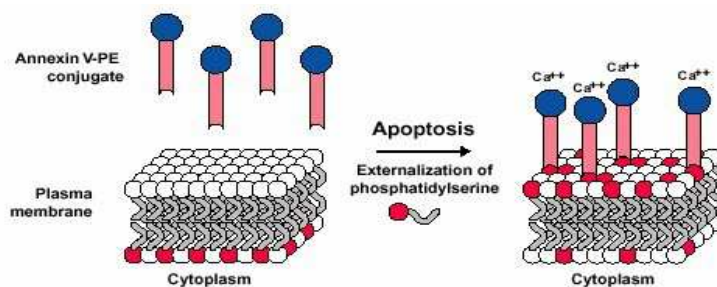
**b. Détection des cellules apoptotiques**

L'apoptose est un processus physiologique normal. Le programme apoptotique est défini par certaines caractéristiques morphologiques notamment la perte de la symétrie de la membrane plasmique, la condensation du cytoplasme et du noyau, et le clivage internucléosomique de l'ADN.

Cependant, les changements dans la membrane plasmique sont l'une des étapes les plus précoces lors de l'apoptose. Au niveau des cellules apoptotiques, le phospholipide de membrane, la phosphatidylsérine (PS), est transloqué de l'intérieur vers l'extérieur de la membrane plasmique, l'exposant donc à l'environnement extracellulaire. L'exploitation de cette caractéristique permet de détecter, à l'aide de sondes comme l'annexine-V, les cellules qui sont en phase d'apoptose.

### c. Rôle de l'annexine-V

L'annexine V est une protéine  $\text{Ca}^{2+}$  dépendante (35-36 kDa) qui se lie aux surfaces chargées négativement des phospholipides. Elle a une haute affinité pour la PS, et se lie aux cellules ayant une PS exposée au milieu extracellulaire (figure 13). Elle pourrait être conjuguée à des fluorochromes comme la phycoérythrine (PE), l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), ou la biotine. Ces formats ont une haute affinité pour la PS et ainsi servent de sondes positives pour l'analyse cytométrique des cellules apoptotiques.



**Figure 13 : Représentation schématique du mode de liaison de l'annexine V**  
D'après le site : <http://www.bdbiosciences.com/pharmingen/products>

### d. Double marquage annexine V-PE / 7-AAD

Le marquage par l'annexine V-PE commence dans les stades précoces de l'apoptose et correspond à l'externalisation de la PS ; il précède la perte de l'intégrité de la

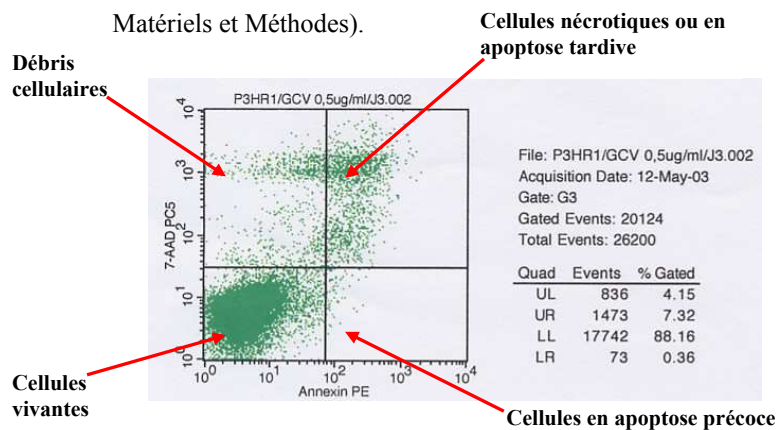
membrane plasmique qui accompagne les stades tardifs de la mort cellulaire résultant des processus apoptotiques ou nécrotiques. Utilisé en conjonction avec une sonde vitale telle que le 7-AAD, il permet d'identifier dans une population cellulaire : 1) les cellules vivantes, 2) les cellules apoptotiques en phase précoce, 3) les cellules mortes par apoptose tardive ou nécrose.

La figure 14 montre l'exemple d'un double marquage annexine V-PE / 7-AAD :

- LL (lower left) : les cellules négatives pour l'annexine V-PE et le 7-AAD sont vivantes et ne sont pas en apoptose mesurable.
- LR (lower right) : les cellules marquées positivement par l'annexine V-PE et négativement par le 7-AAD sont en apoptose précoce.
- UL (upper left) : correspond à un marquage négatif à l'annexine V-PE et positif au 7-AAD. Ce sont les débris cellulaires.
- UR (upper right) : les cellules qui sont positives pour l'annexine V-PE et le 7-AAD sont soit des cellules en apoptose tardive, soit des cellules mortes par nécrose.

Ce double marquage a été utilisé dans notre étude expérimentale (voir

Matériels et Méthodes).



**Figure 14 : Représentation d'un double marquage annexine V-PE / 7-AAD**

## **Etude expérimentale**

## **But du travail**

Le but de notre étude expérimentale est la mise au point d'un modèle de système *in vitro* qui permet d'évaluer de façon quantitative et simple l'effet inhibiteur d'un antiviral sur la multiplication de l'EBV dans une lignée cellulaire.

Après traitement des cellules P3HR-1 (lignée productrice de virions EBV) par trois molécules antivirales connues, le ganciclovir, le cidofovir et le foscarnet, la quantification de l'ADN EBV a été réalisée par PCR en temps réel (LightCycler) qui est une technologie rapide et reproductible. Parallèlement, l'action antivirale a aussi été évaluée par RT-PCR en temps réel sur l'expression de l'ARNm d'une protéine virale "lytique" tardive, la gp350/220.

La spécificité de l'action antivirale a été étudiée par cette technologie en terme d'inhibition de l'ADN (ou de l'ARN) cellulaire. La cytotoxicité des composés antiviraux et leur effet sur l'induction de l'apoptose ont été évalués par la cytométrie en flux.

## **I. Matériels et Méthodes**

### **1. Les composés antiviraux**

Le Ganciclovir (Cymévan<sup>®</sup>) a été obtenu de Roche Pharma (Neuilly-Sur-Seine, France). Le Foscarnet (Foscavir<sup>®</sup>) et le Cidofovir (Vistide<sup>®</sup>) ont été respectivement fournis par les laboratoires AstraZeneca (Rueil Malmaison, France) et Pharmacia & Upjohn (Luxembourg).

### **2. Lignées cellulaires**

La lignée P3HR-1 est une lignée lymphoïde humaine dérivée d'un lymphome de Burkitt qui produit de façon continue des virions EBV (63).

La lignée Namalwa est aussi une lignée lymphoïde humaine dérivée d'un lymphome de Burkitt. Elle contient deux copies du génome EBV par cellule (sous forme intégrée), et ne produit pas de virions.

### **3. Culture cellulaire**

Les cellules (P3HR-1 ou Namalwa) conservées dans du diméthyle sulfoxyde (DMSO), à  $-196^{\circ}\text{C}$  dans de l'azote liquide, ont été décongelées puis cultivées dans des flacons de culture de  $25\text{cm}^2$ , pendant trois à quatre semaines avant utilisation. Les cellules ont été cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), supplémenté avec 10 % de sérum de bovin fœtal inactivé (Cambrex, Emerainville, France), 100 U Pénicilline, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Streptomycine (V.W.R International, Fontenay-sous-Bois, France), 1% L-Glutamine (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), dans un incubateur à  $37^{\circ}\text{C}$  en atmosphère enrichie à 5 % de  $\text{CO}_2$ . Le milieu de culture était changé deux fois par semaine.



#### **4. Etude de l'effet des antiviraux sur la viabilité cellulaire et l'apoptose**

##### **a. Traitement des cellules**

Des cellules P3HR-1 en phase exponentielle de croissance, centrifugées à 600g pendant 10 minutes, puis remises en suspension dans du milieu frais à  $10^6$  cellules/mL ont été réparties dans des plaques de 24 puits. Les cellules ont été cultivées en absence (contrôle) ou en présence de différentes concentrations de GCV (0.5-5-10-20 et 50  $\mu\text{g/mL}$ ) ou de HPMPC (1-2-5-10, 15 et 30  $\mu\text{g/mL}$ ), alors que le PFA a été ajouté à des concentrations de 50, 100, 150, 200 et 300  $\mu\text{g/mL}$  pour 3, 5 et 7 jours. A la fin du traitement, les cellules étaient récoltées, pour être ensuite analysées par cytométrie en flux.

##### **b. Mesure de la viabilité et de l'apoptose par cytométrie en flux**

Dans le but d'évaluer la cytotoxicité du GCV, du HPMPC et du PFA sur les cellules P3HR-1, la viabilité cellulaire a été déterminée par analyse cytométrique, ainsi que l'induction de l'apoptose par ces trois drogues antivirales. Pour cela, un double marquage à l'annexine V-PE et au 7-AAD a été utilisé pour la détection des différentes cellules viables, apoptotiques et nécrotiques.

Brièvement, après traitement, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux en utilisant un kit commercial (Annexin V-PE apoptosis Detection kit I<sup>®</sup>, Becton Dickinson, Pont de Claix, France). Les cellules ont été récoltées, lavées deux fois dans du PBS et puis les culots cellulaires remis en suspension dans 400  $\mu\text{L}$  de tampon d'Annexine V. Ensuite, 5  $\mu\text{L}$  d'Annexine V-PE et 5  $\mu\text{L}$  de 7-AAD ont été ajoutés à 100  $\mu\text{L}$  de cette suspension et le mélange a été incubé pendant 15 minutes dans l'obscurité. Après incubation, 400  $\mu\text{L}$  du tampon de liaison ont été ajoutés, puis les échantillons ont été préparés pour l'analyse par FACS. Tous les résultats sont la moyenne d'analyses effectuées trois fois.

## **5. Etude de l'effet des antiviraux sur la croissance cellulaire**

### **Traitement des cellules :**

Des cellules P3HR-1 en phase exponentielle de croissance ( $5 \times 10^5$  cellules/mL) ont été cultivées pendant 3 et 5 jours, dans des plaques de 24 puits ( $10^6$  cellules/puits) en absence (contrôle) ou présence du GCV (0.5-5-10-20 et 50  $\mu\text{g/mL}$ ), du HPMPC (1-2-5-10 et 15  $\mu\text{g/mL}$ ) ou du PFA (50-100-150-200 et 300  $\mu\text{g/mL}$ ). A la fin du traitement, les cellules récoltées ont été comptées au Coulter Counter. Tous les résultats sont la moyenne d'analyses effectuées trois fois.

## **6. Etude de l'effet des antiviraux sur la réplication de l'ADN viral**

### **a. Essai d'inhibition du virus**

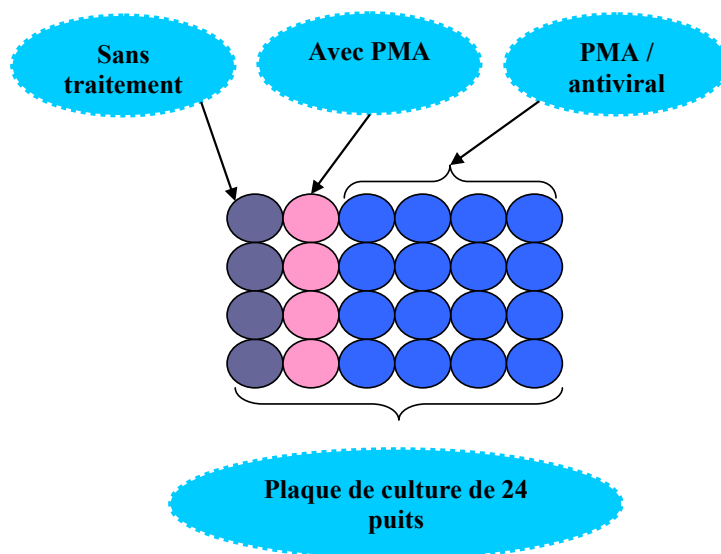
La figure 15 (A et B) représente cet essai,

Des cellules P3HR-1 en phase exponentielle de croissance ont été remises en suspension, puis comptées au microscope optique inversé, après coloration par le bleu de Trypan (v/v). Les suspensions cellulaires ont été récoltées, centrifugées pendant 10 min à 600 g, puis les cellules remises en suspension, dans du milieu neuf à une densité de  $10^6$  cellules/mL et réparties dans des plaques de 24-puits ( $2 \times 10^6$  cellules/puits).

Dans des essais préliminaires, les cellules ont été cultivées en présence de 10  $\mu\text{g/mL}$  de GCV pendant 1, 5, 7, et 10 jours en considérant les cellules non traitées comme contrôle. Ensuite, dans le but d'améliorer la visualisation de l'action antivirale, tous les autres essais ont été réalisés comme suit :

Un inducteur du cycle lytique, le phorbol 12-myristate, 13-acetate (PMA, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) a été ajouté à 30 ng/mL pour augmenter la production de virus. En même temps, les cellules induites par le PMA ont été incubées en absence (contrôle)

ou présence de différentes concentrations d'antiviraux [GCV à 0.1, 0.5, 5 et 10 µg/mL, HPMPC à 0.5, 1, 2, 4 et 6 µg/mL ou PFA à 5, 10, 15, 20 et 25 µg/mL (pour les expériences préliminaires), ou à 25, 50, 75, 100 et 125 µg/mL (pour les autres expériences)]. D'autres cellules P3HR-1 non induites par le PMA, ni traitées par les antiviraux, ont été cultivées en parallèle dans le but de déterminer le niveau basal de l'ADN EBV et servir de contrôle pour les cellules PMA-induites. Après trois jours d'incubation, les suspensions cellulaires ont été récoltées, centrifugées à 600 g pendant 10 minutes, puis les cellules ont été remises en suspension dans du milieu neuf contenant les antiviraux aux concentrations mentionnées ci-dessus mais sans rajouter de PMA. A 7 jours, les suspensions cellulaires ont été dispersées puis récupérées dans des cryotubes (de 5 mL). Après centrifugation à 600 g durant 10 minutes, le surnageant a été jeté et les culots cellulaires lavés deux fois dans du tampon phosphate (PBS) froid pour être finalement stockés à -70°C jusqu'à l'extraction de l'ADN.



**Figure 15-A : Essai d'inhibition du virus : culture des cellules**

**Figure 15-B : Les différentes étapes de l'essai d'inhibition du virus**

Suspension des cellules P3HR-1 ( $10^6$  cellules/mL)



Répartition des cellules dans des plaques de 24-puits ( $2 \times 10^6$  cellules/puits)



Culture :

- 1) Cellules sans traitement
- 2) Cellules cultivées en présence du PMA (30 ng/mL)
- 3) Cellules + PMA : cultivées en présence de différentes concentrations d'un antiviral



Durée de culture :

4 jours pour l'essai d'ARN  
4 et 7 jours pour l'essai d'ADN



Fin du traitement :

Récolter les cellules dans des cryotubes  
Faire deux lavages au PBS froid (600g, 10 min)  
Ecarter le surnageant et conserver les culots cellulaires à  $-70^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation



Extraction de l'ADN total ou de l'ARN total  
à partir des culots cellulaires



Dosage par spectrophotométrie



Quantification de l'ADN (EBV ou  $\beta$ -globine) par PCR en temps réel (LightCycler)  
Quantification de l'ARNm (EBV ou hPBGD) par RT-PCR en temps réel (LightCycler)

### **b. Extraction de l'ADN total**

L'ADN total (cellulaire + viral) a été extrait à partir des culots cellulaires en utilisant un kit Qiagen pour l'extraction d'ADN et ceci en suivant le protocole du fabricant (QIAamp DNA Blood Mini kit<sup>®</sup>, Qiagen, Courtaboeuf, France). Brièvement, chaque culot cellulaire est resuspendu dans 200 µL de PBS, la lyse cellulaire se fait en présence de 20 µL de protéinase K et de 200 µL de tampon de lyse (contenant de la guanidine), par une incubation à 56°C durant 10 minutes. Après ajout de 200 µL d'éthanol absolu, le mélange est transféré à une colonne spin (où l'ADN va adhérer à une membrane en silicium). Après centrifugation, deux lavages successifs sont réalisés. Enfin, l'élution de l'ADN purifié est faite à l'aide de 100 µL de tampon AE (10 mM Tris.Cl ; 0.5 mM EDTA ; pH 9.0) ; l'ADN est ensuite quantifié par spectrophotométrie à A<sub>260</sub>, puis stocké à -20°C jusqu'à utilisation dans les réactions de PCR.

### **c. PCR en temps réel pour quantifier l'ADN EBV**

- **Les amorces**

Les amorces pour l'amplification par PCR, ont été sélectionnées à l'aide du Software Oligo 6.1 (Med Probe, Oslo, Norway). Elles délimitent une séquence de 169 pb au niveau du gène *BXLF1* codant pour la thymidine kinase EBV. Elles ont été synthétisées par Genset Oligos (Paris, France). Les séquences d'amorces sont T1 (5'-GGGGCAAATACTGTGTAG-3') et T2 (5'-CGGGGACACCATAGT-3'), ayant respectivement les positions 143411 et 143579, selon la séquence de la souche prototype B95-8 déterminée par Baer et al., en 1984 (12).

- **Les sondes**

Les deux sondes oligonucléotidiques d'hybridation, spécifiques de séquence, ont été synthétisées par Genset Oligos (Paris, France). LC1 (5'-ATGTTTCCTCCCTCGCTTCTTCAG -3') et LC2 (5'-CGGCGCATGTTCTCCTCCACp-3') ont respectivement été marquées par la fluorescéine (le fluorophore émetteur) à l'extrémité 3' et par le LightCycler-Red 640 (LC-Red 640, le fluorophore accepteur), à l'extrémité 5'. Les signaux de fluorescence sont détectés à la fin de la phase d'hybridation de chaque cycle de PCR. La quantité de la fluorescence mesurée est directement proportionnelle à la quantité d'ADN cible générée durant la PCR.

- **Les conditions de PCR**

L'ADN EBV a été quantifié à partir de 500 ng d'ADN total, par une PCR en temps réel (LightCycler<sup>®</sup>, Roche Diagnostics Meylan, France) qui a été développée dans notre laboratoire (17). Le cocktail de réaction de PCR a été préparé en utilisant un kit commercial (LightCycler-Fast Start DNA Master Hybridization Probes<sup>®</sup> (Roche Diagnostics, Meylan, France) : [(3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 μM de chaque amorce, 0.2 μM de la sonde LC1, 0.4 μM de la sonde LC2, et 2 μL de Fast Start Master mix (contenant les quatre dNTPs et la Taq polymérase)].

Après une étape initiale de dénaturation pendant 10 minutes à 95°C, 45 cycles ont été réalisés chacun incluant 10 secondes à 95°C pour la dénaturation, 10 secondes à 58°C pour l'hybridation et 15 secondes à 72°C pour l'élongation. La PCR a été réalisée dans un volume final de 20 μL par réaction. Un blanc (de l'eau stérile) a été utilisé comme contrôle négatif dans chaque expérience de PCR.

- **Courbe du standard externe (ADN EBV)**

Les cellules de la lignée Namalwa ont été utilisées pour générer la gamme qui sert à tracer la courbe du standard externe (qui permet de calculer le nombre de copies du génome viral) dans chaque expérience de PCR. L'ADN total a été extrait à partir des culots de ces cellules selon ce qui est décrit dans le paragraphe (extraction de l'ADN). Sachant qu'un microgramme d'ADN extrait correspond à  $1,5 \times 10^5$  cellules donc à  $3 \times 10^5$  copies du génome EBV (car on a deux copies d'ADN EBV par cellule Namalwa), le volume correspondant à 50 000 copies d'ADN EBV a été calculé à partir des concentrations d'ADN total dosé. Des dilutions de 10 en 10 ont été réalisées, pour obtenir les différents points de la gamme allant de 50 000 à 5 copies d'ADN EBV.

## **7. Calcul d'EC<sub>50</sub>**

Après quantification de l'ADN EBV, la concentration effective 50 % (EC<sub>50</sub> = la concentration d'antiviral qui réduit de 50 % le nombre de copies d'ADN EBV dans les cellules PMA-induites) de chacun des trois antiviraux a été calculée à 7 jours en utilisant la méthode de régression linéaire.

## **8. Etude de l'effet des antiviraux sur la réplication de l'ADN cellulaire**

### **a. PCR en temps réel pour quantifier l'ADN cellulaire**

- **Les conditions de PCR, les amorces et les sondes**

Un fragment de 110 pb du gène cellulaire humain de la  $\beta$ -globine a été amplifié par PCR en temps réel. La quantification a été faite à partir de 500 ng des mêmes extraits d'ADN total utilisés pour quantifier l'ADN EBV. La PCR a été réalisée selon le protocole du fabricant en utilisant un kit commercial (LightCycler-Control Kit DNA<sup>®</sup>, Roche Diagnostics,

France). Les amorces et les sondes sont fournies dans le kit. Les amorces sont de 20 mer chacune. Les sondes de 35 et 29 mer sont respectivement marquées à la fluorescéine en 3' et au LC-Red 640 en 5'. La PCR a été réalisée dans un volume final de 20  $\mu$ L par réaction. Un contrôle négatif (de l'eau stérile) a été inclus dans chaque expérience de PCR.

- **Courbe du standard externe (ADN  $\beta$ -globine)**

L'ADN génomique humain (fourni dans le kit) a été dilué en raison de 10 fois ( $4 \times 10^4$  à 4 copies d'ADN  $\beta$ -globine), pour générer la courbe du standard externe dans chaque expérience de PCR. Tous les résultats sont la moyenne d'analyses effectuées trois fois.

## **9. Etude de l'effet des antiviraux sur la transcription virale ( ARNm gp350/220)**

### **a. Essai d'inhibition du virus**

Des cellules P3HR-1 en phase exponentielle de croissance ont été comptées au microscope optique inversé après coloration par le bleu de Trypan (v/v). Les suspensions cellulaires, centrifugées à 600 g pendant 10 min, ont été remises en suspension dans du milieu neuf à une densité de  $500 \times 10^5$  cellules/mL, puis réparties dans des plaques de 24 puits (2 mL par puits :  $1 \times 10^6$  cellules). Pour induire le cycle lytique, le phorbol 12-myristate, 13-acetate (PMA, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) a été ajouté à 30 ng/mL.

En même temps, les cellules induites par le PMA ont été incubées en absence (contrôle) ou en présence de différentes concentrations de GCV (0.1, 0.5, 5 et 10  $\mu$ g/mL) pendant 12h ou bien de GCV (10  $\mu$ g/mL) ou de PFA (125  $\mu$ g/mL) pendant 24h-36h-48h-60h- et 72h, pour les expériences préliminaires. Ensuite, les autres essais ont été réalisés à 96h en présence du GCV à 1 et 10  $\mu$ g/mL, du HPMPIC à 0.5 et 6  $\mu$ g/mL, ou du PFA à 50 et 100  $\mu$ g/mL. L' $\alpha$ -amanitine, un inhibiteur de la transcription de l'ARN, a été testé (à 10  $\mu$ g/mL)



parallèlement à chacun de ces trois composés. Dans le but de déterminer le niveau basal de l'ARNm EBV gp350/220 et servir comme contrôle pour l'induction, des cellules P3HR-1 non induites par le PMA ni traitées par les antiviraux, ont été cultivées en parallèle. Aux différents temps d'incubation, les cellules ont été récoltées, centrifugées pendant 10 minutes à 600 g, ensuite lavées deux fois dans du PBS froid, pour être finalement stockées à  $-70^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'extraction de l'ARN total.

#### **b. Extraction de l'ARN total**

L'ARN total (cellulaire + viral) a été extrait à partir des culots cellulaires selon le protocole du kit d'extraction d'ARN High Pure RNA Isolation kit (Roche Diagnostics, Meylan, France). Brièvement, chaque culot cellulaire a été repris dans 200  $\mu\text{L}$  de PBS. Après lyse dans 400  $\mu\text{L}$  de tampon de lyse (4.5 M d'hydrochlorure de guanidine, 50 mM Tris-HCl et 30 % Triton X-100, pH 6.6), le mélange a été transféré dans une colonne à filtre, centrifugé (10 000 rpm, 15 secondes), puis deux traitements à la DNase I (10 000 U) de 20 min chacun (15-25 $^{\circ}\text{C}$ ), ont été réalisés pour éliminer l'ADN résiduel. Ensuite trois lavages successifs ont eu lieu, suivis par une élution dans 50  $\mu\text{L}$  de tampon ; l'ARN a été quantifié par spectrophotométrie, puis stocké à  $-70^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation dans les réactions de RT-PCR.

#### **c. RT-PCR en temps réel pour quantifier l'ARNm gp350/220 de l'EBV**

- **Amorces**

Les amorces pour l'amplification par RT-PCR délimitent une séquence de 200 p.b codant pour la gp350/220 : une protéine structurale "lytique" de l'EBV. Les séquences d'amorces sont gpU2 (antisens) (5'-AGAATCTGGGCTGGGACGTT-3') et gpL2 (sens) (5'-ACATGGAGCCCGGACAAGT-3').

- **La sonde**

La sonde (EBVGPq) utilisée est une sonde d'hydrolyse, TaqMan. La séquence de cette sonde marquée aux deux fluorophores est (5'(6Fam)AGCCCACCACAGATTACGGCGGT(Tamra)(Phosphate)-3' où 6-Fam est le 6-carboxyfluorescéine (le fluorophore "reporter") et Tamra est le 6-carboxytétraméthylrhodamine (le fluorophore "quencher"), position 89761)

- **Les conditions de RT-PCR**

L'ARNm EBV gp350/220 a été quantifié à partir de 100 ng d'ARN total, par une RT-PCR en temps réel (LightCycler<sup>®</sup>, Roche Diagnostics Meylan, France) qui a été développée dans notre laboratoire (49). Le mélange de la réaction de RT-PCR a été préparé dans 20 µL de volume final, en utilisant un kit commercial (LightCycler RNA Master Hybridization Probes<sup>®</sup> (Roche Diagnostics, Meylan, France) : [(3.25 mM de Mn(OAC)I<sub>2</sub>, 0.3 µM de chaque amorce, 0.3 µM de la sonde TaqMan, et 7.5 µL de RNA Master mix]. Après une étape de transcription inverse pendant 30 minutes à 61°C, suivie par une dénaturation pendant 3 minutes à 95°C, 45 cycles ont été réalisés chacun incluant 10 secondes à 95°C, 90 secondes à 60°C. Chaque expérience de RT-PCR contenait un blanc (de l'eau) comme contrôle négatif.

- **Courbe du standard externe (ARNm gp350/220)**

La quantification absolue est réalisée avec une courbe externe de calibrage de l'ARN. Le calibre de l'ARN est obtenu par une transcription *in vitro* de 1 µg d'un plasmide construit pendant 2h à 37 °C (SP6/T7-Transcription kit<sup>®</sup> ; Roche). Le plasmide est obtenu par clonage dans pSPT18 du produit RT-PCR de 200-pb de gpU2/gpL2, obtenu à partir de l'ARN de la lignée B95-8. Des dilutions en série de 10 de l'ARN calibre sont analysées par RT-PCR en

temps réel, et une gamme entre 50 et  $5 \times 10^6$  copies est obtenue, indiquant l'efficacité de l'amplification et la sensibilité de la méthode.

## **10. Etude de l'effet des antiviraux sur la transcription cellulaire (ARNm hPBGD)**

### **a. RT-PCR en temps réel pour quantifier l'ARN cellulaire**

- **Amorces et sonde**

Les amorces délimitent une séquence codant pour le hPBGD (un ARNm cellulaire). La sonde utilisée est une sonde d'hydrolyse, TaqMan. La séquence de cette sonde est marquée aux deux fluorophores : 6Fam (le fluorophore "quencher") et Tamra (le fluorophore "reporter").

- **Les conditions de RT-PCR**

Un fragment du gène cellulaire humain, hPBGD, a été amplifié par RT-PCR en temps réel. La quantification a été faite à partir de 100 ng des mêmes extraits d'ARN total utilisés pour quantifier l'ARN gp350/220. La RT-PCR a été réalisée selon le protocole du fabricant en utilisant un kit commercial (LightCycler-h-PBGD Housekeeping Gene Set, Roche Diagnostics, France). La RT-PCR a été réalisée dans un volume final de 20  $\mu$ L par réaction. Un contrôle négatif (de l'eau stérile) a été inclus dans chaque expérience de RT-PCR.

- **Courbe du standard externe (ARN hPBGD).**

L'ARN génomique humain a été dilué en raison de 10 fois pour générer la courbe du standard externe dans chaque expérience de RT-PCR. Tous les résultats sont la moyenne d'analyses effectuées trois fois.

## **11. Analyse des données fluorométriques**

Les données fluorimétriques ont été analysées par le Software en F2/F1 pour les expériences de PCR et en F1/F2 pour les expériences de RT-PCR.

## **12. Analyse statistique des résultats**

Tous les résultats sont exprimés comme la moyenne de trois déterminations. Les barres d'erreur représentent les déviations standards. Ils ont été testés pour leur signification statistique en utilisant le test de Student (Student's t-test). Les résultats ayant les valeurs de  $p < 0.05$  sont considérés significatifs.

## **13. Expression des résultats**

Les résultats de tous les essais cités ci-dessus sont présentés dans les figures de la partie suivante. Chacun des paramètres mesurés (ex. nombre de cellules) a été tracé (axe des y) en fonction de la concentration de l'antiviral (axe des x). Tous les résultats représentent la moyenne de trois déterminations.

## II. Résultats

### 1. Effets des drogues antivirales sur la viabilité cellulaire

Les trois composés antiviraux GCV, HPMPC et PFA ont été testés à différentes concentrations pour étudier leur effet sur la viabilité des cellules P3HR-1 (voir Matériels et Méthodes). Les figures 16 A-B- et -C et le tableau (9) montrent que pour des concentrations de GCV allant de 0.5 à 20 µg/mL, il n'y a pas d'effet significatif ( $p > 0.1$ ) sur la viabilité cellulaire à 3, 5 et 7 jours de traitement (l'inhibition maximale est de 28 %). A 50 µg/mL, le nombre de cellules viables n'est pas significativement affecté à 3 et 5 jours (18.1 % d'inhibition,  $p > 0.1$ ), alors qu'il est réduit de 53.9 % ( $p < 0.02$ ), après 7 jours d'incubation. En ce qui concerne le HPMPC, on remarque que cet antiviral n'a aucun effet toxique ( $p > 0.1$ ) aux différentes durées et à toutes les concentrations testées jusqu'à 30 µg/mL (concentration correspondant à 100 fois l'EC<sub>50</sub> calculée à 7 jours pour HPMPC).

Le PFA n'affecte pas significativement la viabilité jusqu'à 200 µg/mL ( $p > 0.1$ ) à J3, J5 et J7, l'inhibition maximale ne dépasse pas 22 %. Cependant à 300 µg/mL de PFA (correspondant à 22 fois l'EC<sub>50</sub>), le pourcentage des cellules vivantes est réduit de 37.7 % ( $p < 0.05$ ) pour une durée de 7 jours, alors qu'une faible réduction non significative ( $p > 0.2$ ) de 2.6 et 12.5 % est respectivement obtenue à 3 et 5 jours de traitement.

Ces trois antiviraux n'affectent donc pas la viabilité des cellules P3HR-1 aux concentrations utilisées dans les essais d'inhibition du virus dont les maximales sont 10 µg/mL pour le GCV, 6 µg/mL pour le HPMPC, et 125 µg/mL pour le PFA.

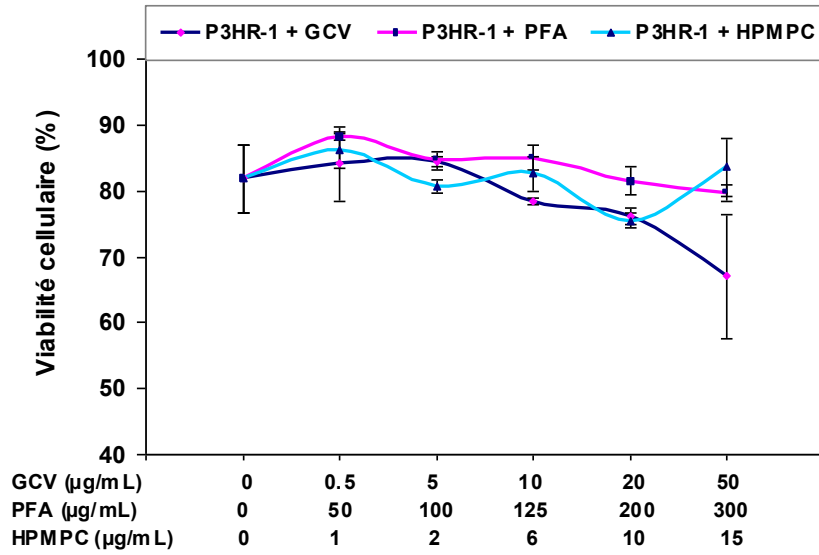


Figure 16-A. Effets du GCV, du HPMPc et du PFA sur la viabilité des cellules P3HR-1 (à 3 jours)

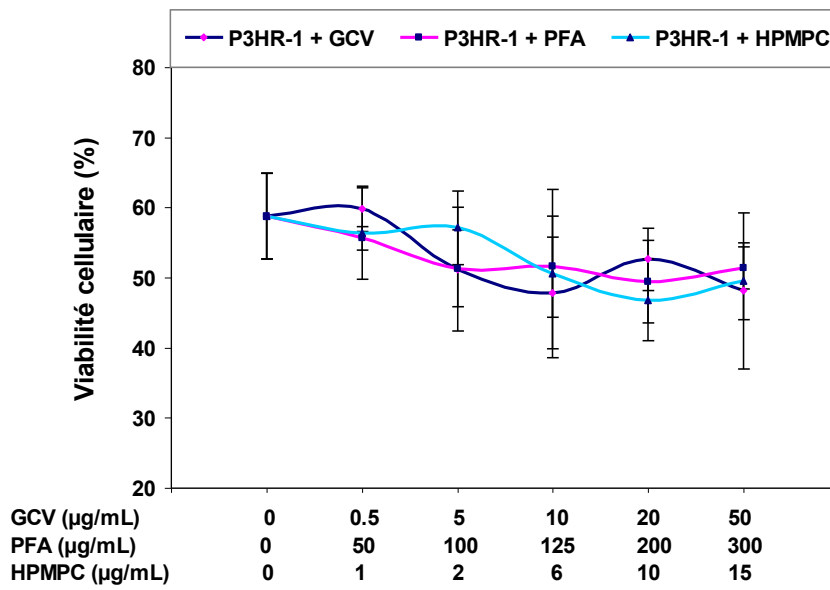
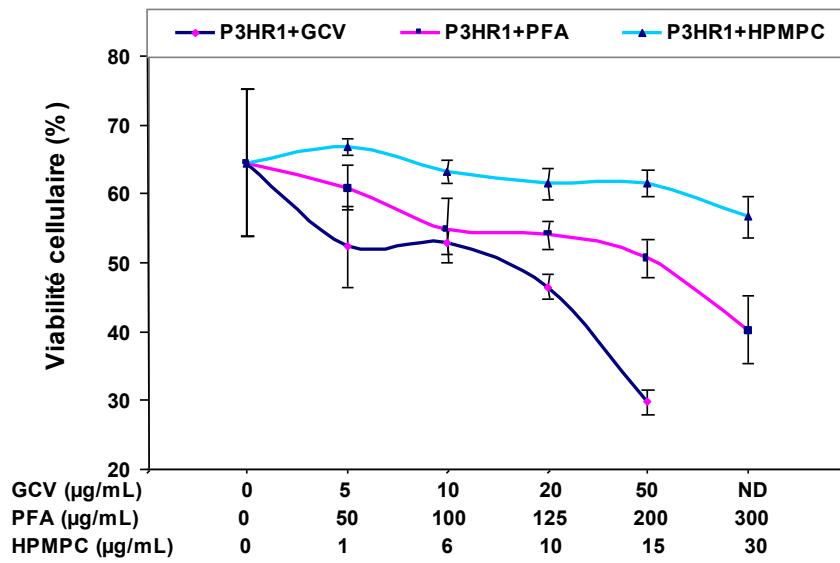


Figure 16-B : Effets du GCV, du HPMPc et du PFA sur la viabilité des cellules P3HR-1 (à 5 jours)



**Figure 16-C : Effets du GCV, du HPMPc et du PFA sur la viabilité des cellules P3HR-1 (à 7 jours)**

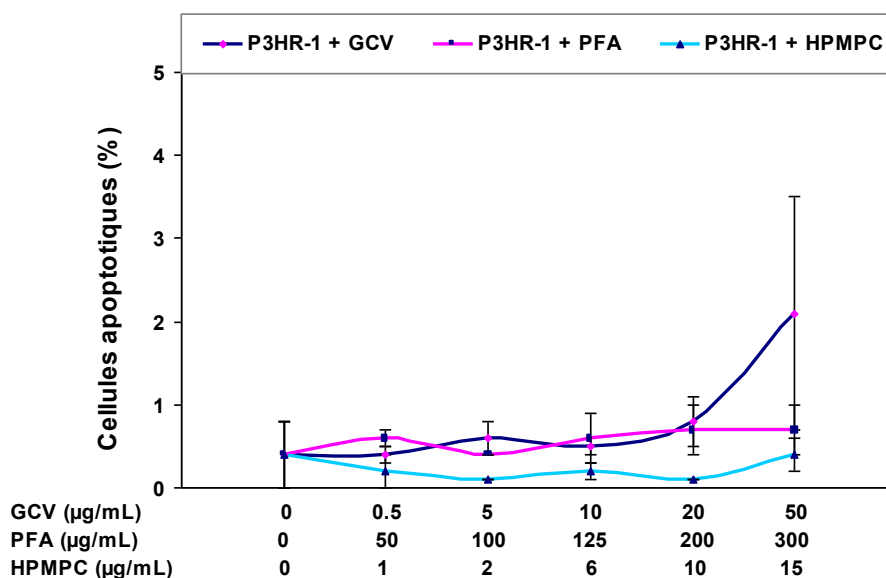
**Tableau 9 : Effets du GCV, du HPMPC et du PFA sur la viabilité des cellules P3HR-1**

Antiviral	Concentration (µg/mL)	J3			J5			J7		
		% des cellules vivantes	% d'inhibition	Significativité (p)	% des cellules vivantes	% d'inhibition	Significativité (p)	% des cellules vivantes	% d'inhibition	Significativité (p)
<b>GCV</b>	0	81.8	Contrôle	Contrôle	58.8	Contrôle	Contrôle	64.5	Contrôle	Contrôle
	0.5	84.1	+2.8	> 0.5	59.8	+1.8	> 0.5	ND	ND	ND
	5	84.5	+3.3	> 0.5	51.2	12.9	> 0.3	52.3	19	> 0.2
	10	78.4	4.2	> 0.5	47.8	18.7	> 0.1	53	17.9	> 0.3
	20	76.2	6.9	> 0.2	52.6	10.6	> 0.3	46.5	28.0	> 0.1
	50	67	18.1	> 0.1	48.1	18.1	> 0.3	29.8	53.9	< 0.02
<b>HPMPC</b>	0	81.8	Contrôle	Contrôle	58.8	Contrôle	Contrôle	64.5	Contrôle	Contrôle
	1	86.1	+5.2	> 0.3	56.3	4.3	> 0.5	66.9	+3.7	> 0.5
	2	80.7	1.4	> 0.5	57.1	2.9	> 0.5	ND	ND	ND
	6	82.6	+1	> 0.5	50.6	14	> 0.3	63.2	2.2	> 0.5
	10	75.5	7.7	> 0.1	46.8	20.3	> 0.1	61.5	4.7	> 0.5
	15	83.6	+2.2	> 0.5	49.5	15.8	> 0.1	61.5	4.8	> 0.5
	30	ND	ND	ND	ND	ND	ND	56.6	12.2	> 0.3
<b>PFA</b>	0	81.8	Contrôle	Contrôle	58.8	Contrôle	Contrôle	64.5	Contrôle	Contrôle
	50	88.3	+7.9	> 0.1	55.6	5.4	> 0.5	60.9	5.6	> 0.5
	100	84.6	+3.4	> 0.5	51.3	12.8	> 0.2	54.7	15.2	> 0.2
	125	85.0	+3.9	> 0.3	51.6	12.2	> 0.3	54	16.4	> 0.2
	200	81.5	0.4	> 0.9	49.4	16	> 0.1	50.6	21.7	> 0.1
	300	79.7	2.6	> 0.5	51.4	12.5	> 0.2	40.2	37.7	< 0.05



## 2. Effets des drogues antivirales sur l'induction de l'apoptose

Dans le même essai de cytométrie, nous avons aussi analysé le pourcentage des cellules apoptotiques (la figure 17 montre un exemple des résultats obtenus). Il est inférieur à 5 % dans toutes les cultures et on ne note pas de différence significative entre les cellules non-traitées (contrôle) et les cellules traitées. Chacun des trois composés antiviraux n'a donc pas d'effet sur l'induction de l'apoptose dans les cellules P3HR-1 à toutes les concentrations testées dans cet essai par conséquent celles utilisées dans l'essai d'inhibition du virus.



**Figure 17 : Effets du GCV, du HPMPIC et du PFA sur l'induction de l'apoptose au niveau des cellules P3HR-1 (à 3 jours).**

### **3. Effets des drogues antivirales sur la croissance cellulaire**

La croissance des cellules P3HR-1 a été étudiée à 3 et 5 jours en présence de chacun des trois composés antiviraux testés (voir Matériels et Méthodes). La croissance cellulaire est concentration-dépendante alors qu'elle est peu affectée par la durée (figures 18 et 19 et tableau 10). Un faible effet cytostatique est obtenu en présence du GCV à 0.5 et 5 µg/mL (13.2 à 28.9 % d'inhibition). A 10 µg/mL cet effet est modéré, le nombre de cellules est respectivement réduit de 37.5 et 40.9 % par rapport au contrôle (cellules non traitées) à 3 et 5 jours de traitement, alors qu'il est nettement plus important à 50 µg/mL (respectivement : 60.9 % et 52.2 d'inhibition).

En ce qui concerne le HPMPC, il a un effet cytostatique très marginal pour des concentrations de 1 à 10 µg/mL (6.3 à 17.6 % d'inhibition), et faible à 15 µg/mL (environ 22 % d'inhibition).

En présence du PFA à 50-125 µg/mL, la réduction de la croissance cellulaire est faible, entre 3.1 et 28.9 %. Elle est plus élevée, de 39.1 et 42.8 % respectifs, après 3 et 5 jours de traitement par 300 µg/mL.

On voit donc que pour les concentrations correspondant à celles utilisées dans les essais d'inhibition du virus, le GCV, le HPMPC et le PFA ont respectivement un effet cytostatique modéré, très marginal et faible. Parmi ces trois antiviraux, le HPMPC est le moins cytostatique pour les cellules P3HR-1.

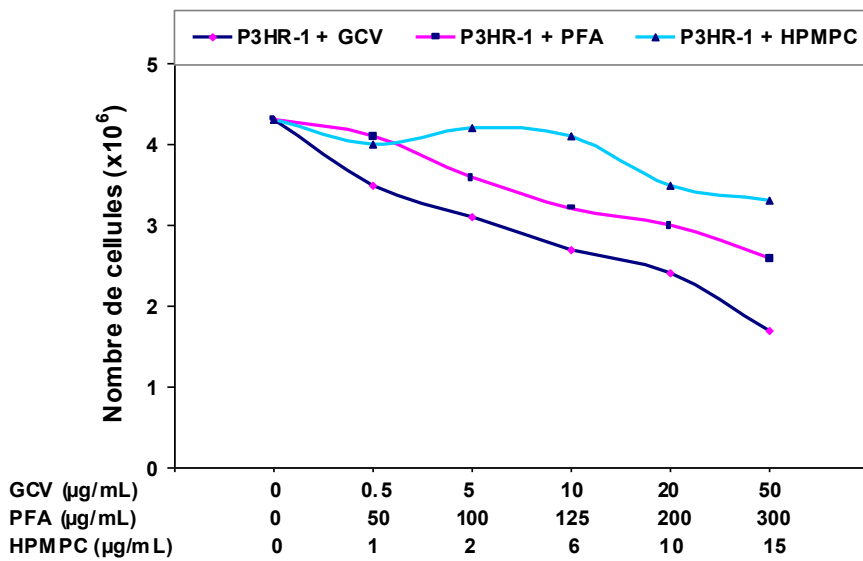


Figure 18 : Effets du GCV, du HPMP et du PFA sur la croissance des cellules P3HR-1 (à 3 jours)

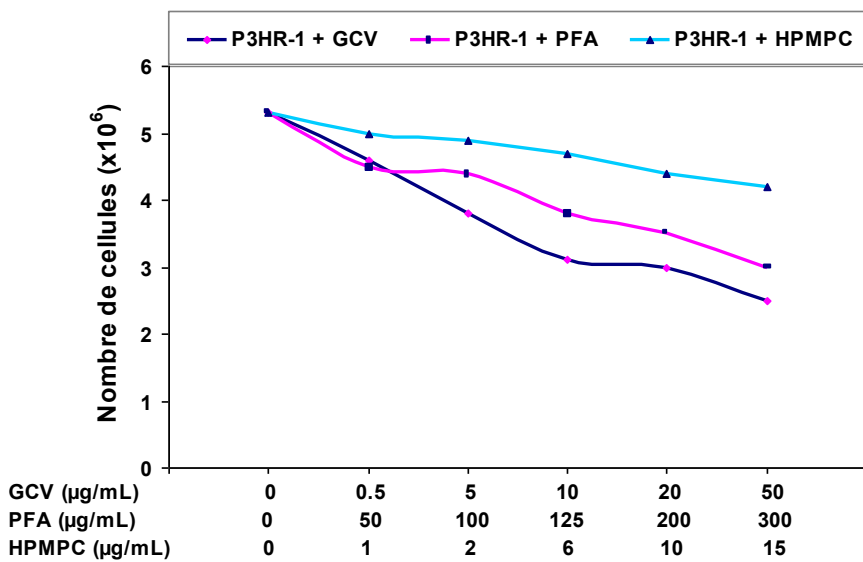


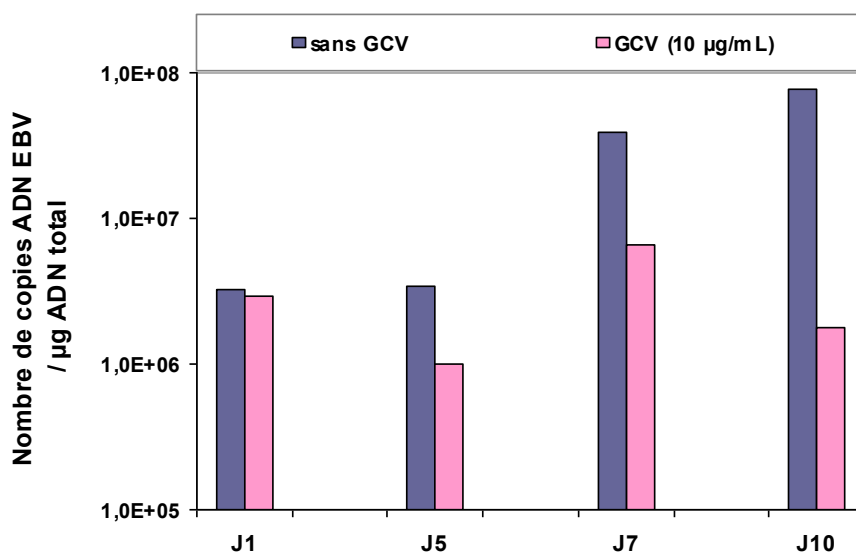
Figure 19 : Effets du GCV, du HPMP et du PFA sur la croissance des cellules P3HR-1 (à 5 jours)

**Tableau 10 : Effets du GCV, du HPMPC et du PFA sur la croissance des cellules P3HR-1**

Antiviral	Concentration (µg/mL)	J3		J5	
		Nombre de cellules	% d'inhibition	Nombre de cellules	% d'inhibition
GCV	0	42.7 x 10 <sup>5</sup>	Contrôle	53 x 10 <sup>5</sup>	Contrôle
	0.5	34.7 x 10 <sup>5</sup>	18.8	46 x 10 <sup>5</sup>	13.2
	5	31.3 x 10 <sup>5</sup>	26.6	37.7 x 10 <sup>5</sup>	28.9
	10	26.7 x 10 <sup>5</sup>	37.5	31.3 x 10 <sup>5</sup>	40.9
	20	24 x 10 <sup>5</sup>	43.8	30 x 10 <sup>5</sup>	43.4
	50	16.7 x 10 <sup>5</sup>	60.9	25.3 x 10 <sup>5</sup>	52.2
HPMPC	0	42.7 x 10 <sup>5</sup>	Contrôle	53 x 10 <sup>5</sup>	Contrôle
	1	40 x 10 <sup>5</sup>	6.3	49.7 x 10 <sup>5</sup>	6.3
	2	42 x 10 <sup>5</sup>	1.6	48.7 x 10 <sup>5</sup>	8.2
	6	40.7 x 10 <sup>5</sup>	4.7	46.7 x 10 <sup>5</sup>	12
	10	35.3 x 10 <sup>5</sup>	17.2	43.7 x 10 <sup>5</sup>	17.6
	15	33.3 x 10 <sup>5</sup>	21.9	41.7 x 10 <sup>5</sup>	21.4
PFA	0	42.7 x 10 <sup>5</sup>	Contrôle	53 x 10 <sup>5</sup>	Contrôle
	50	41.3 x 10 <sup>5</sup>	3.13	45.3 x 10 <sup>5</sup>	14.5
	100	36 x 10 <sup>5</sup>	15.6	44 x 10 <sup>5</sup>	17
	125	32 x 10 <sup>5</sup>	25	37.7 x 10 <sup>5</sup>	28.9
	200	30 x 10 <sup>5</sup>	29.7	35.3 x 10 <sup>5</sup>	33.3
	300	26 x 10 <sup>5</sup>	39.1	30.3 x 10 <sup>5</sup>	42.8

#### **4. Effets des drogues antivirales sur la réplication de l'ADN EBV**

Dans le but d'évaluer les effets inhibiteurs du GCV, du HPMPC et du PFA sur la réplication virale, l'ADN EBV a été quantifié par une PCR en temps réel. D'après nos expériences préliminaires, la figure 20 montre que la diminution du nombre de copies de génomes EBV dépend de la durée d'incubation des cellules en présence de l'antiviral. Le GCV n'a aucun effet à J1, un effet modéré à J5 et J7, et plus important à J10. La différence logarithmique dans le nombre de copies d'ADN viral (par microgramme d'ADN total) entre les cellules traitées par le GCV et les cellules non traitées (contrôle) est respectivement de 0, 0.5, 0.8, et 1.7 log à J1, J5, J7, et J10. Ce qui correspond à des pourcentages d'inhibition respectifs de 8.5, 70.6, 83.1, et 97.7 %.



**Figure 20 : Effets du GCV sur la synthèse de l'ADN EBV à 1, 5, 7, et 10 jours au niveau des cellules P3HR-1**

Dans le but d'augmenter la production virale, le cycle lytique a été induit par le PMA pour le reste des expériences. Ceci avait pour conséquence une meilleure visualisation de l'action antivirale et une réduction du temps d'incubation à 7 jours au lieu de 10.

Sur la figure 21 et le tableau 11, le nombre de génomes EBV dans les cellules PMA-induites a significativement augmenté par rapport aux cellules non induites ( $p < 0.01$ ) [ $\Delta \log$  copies d'ADN EBV /  $\mu\text{g}$  ADN total 1.3 à 1.9]. Après 7 jours de traitement, une inhibition significative ( $p < 0.05$  à  $p < 0.001$ ) de la réplication de l'ADN viral est observée avec chacune des trois molécules antivirales à toutes les concentrations testées à l'exception de 5 et 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de PFA (figures 21 et 22). Cette inhibition est dose-dépendante. Concernant le GCV (figure 21-A), la réplication de l'ADN EBV est légèrement inhibée à 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (29.6 % par rapport

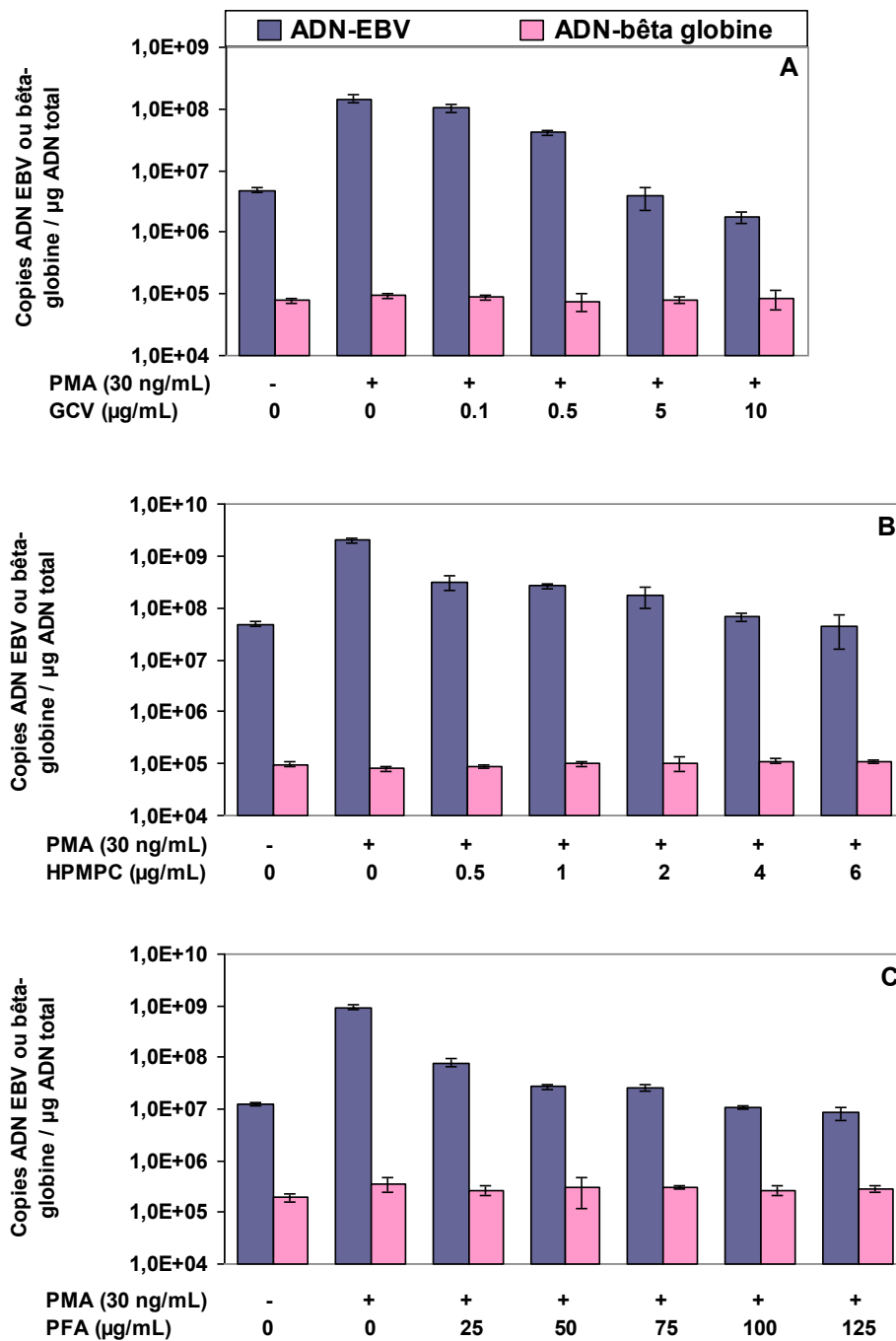
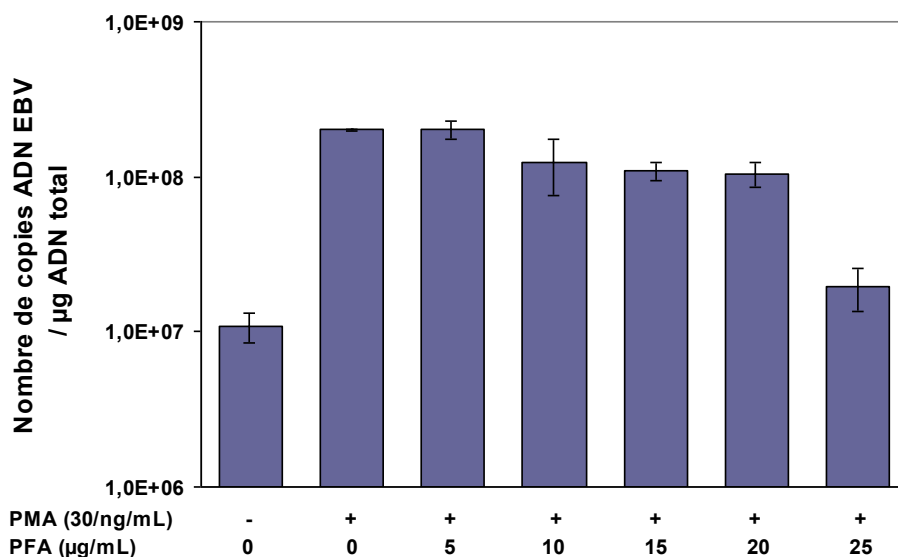


Figure 21 : Effets du GCV, du HPMPC et du PFA sur la réplication virale et cellulaire

aux cellules PMA-induites (contrôle)) par comparaison avec les autres concentrations (0.5, 5, et 10 µg/mL) où l'inhibition est respectivement de 71.9, 97.3, et 98.8 %. La charge virale est de 8.2 log dans les cellules PMA-induites (contrôle) versus 6.2 log ( $p < 0.001$ ) dans les cellules induites traitées par le GCV à 10 µg/mL. Pour toutes les concentrations testées du HPMPC, la réduction du nombre de génomes EBV est supérieure à 84 %. Ce nombre passe de 9.3 log (cellules contrôle) à 7.6 log (97.8 % d'inhibition,  $p < 0.001$ ) dans les cellules traitées par 6 µg/mL de HPMPC (figure 21-B). En ce qui concerne le PFA, des essais préliminaires ont été réalisés avec des concentrations de 5-25 µg/mL. La figure 22 montre un effet concentration-dépendant. On remarque que cet antiviral n'a pas d'effet inhibiteur significatif ( $p > 0.1$ ) à 5 et 10 µg/mL. La diminution du nombre de copies d'ADN viral par rapport au contrôle (cellules induites) est la même (0.3 log) à 15 et 20 µg/mL, concentrations auxquelles une action modérée (45.5 et 47.9 % d'inhibition) est notée. Cependant, cette réduction est plus importante à 25 µg/mL (1 log ; 93.5 %).



**Figure 22 : Effets du PFA sur la synthèse de l'ADN EBV au niveau des cellules P3HR-1**

Dans le but de mieux déterminer l'action antivirale du PFA, des concentrations plus élevées ont été testées. D'après la figure 21-C et le tableau 11, on note que l'effet inhibiteur est nettement plus important que celui montré dans la figure 22. Le PFA a un effet similaire à 50 et 75 µg/mL, ou à 100 et 125 µg/mL ( $\Delta$  log copies d'ADN EBV par rapport au contrôle est respectivement de 1.6 et 2 log). La charge virale mesurée est de 9.0 log dans les cellules contrôle contre 6.9 log (99.1 % d'inhibition,  $p < 0.01$ ) dans les cellules traitées par le PFA à 125 µg/mL.

La concentration effective 50 % ( $EC_{50}$ ) a été calculée pour chacun des trois composés antiviraux testés. Les valeurs obtenues sont respectivement de  $0.28 \pm 0.06$  µg/mL pour le GCV,  $0.29 \pm 0.01$  µg/mL pour le HPMPC, et de  $13,6 \pm 0.17$  µg/mL pour le PFA.



**Tableau 11 : Effets du GCV, du HPMPC et du PFA sur la réplication de l'ADN EBV dans les cellules P3HR-1**

Induction du cycle lytique	Concentration d'antiviral (µg/mL)	Nombre de copies ADN EBV	Log (nombre de copies ADN EBV)	Δ log	% d'inhibition	Significativité (p)
<b>GCV</b>						
<b>Sans PMA</b>	<b>0</b>	<b>48.2 x 10<sup>5</sup></b>	<b>6.7</b>	<b>1.5</b>	<b>ND</b>	<b>&lt; 0.001</b>
<b>PMA</b>	<b>0</b>	<b>14.6 x 10<sup>7</sup></b>	<b>8.2</b>	<b>Contrôle</b>	<b>Contrôle</b>	<b>Contrôle</b>
	<b>0.1</b>	<b>10.3 x 10<sup>7</sup></b>	<b>8.0</b>	<b>0.2</b>	<b>29.6</b>	<b>&lt; 0.05</b>
	<b>0.5</b>	<b>41.1 x 10<sup>6</sup></b>	<b>7.6</b>	<b>0.6</b>	<b>71.9</b>	<b>&lt; 0.001</b>
	<b>5</b>	<b>38.8 x 10<sup>5</sup></b>	<b>6.6</b>	<b>1.6</b>	<b>97.3</b>	<b>&lt; 0.001</b>
	<b>10</b>	<b>17.3 x 10<sup>5</sup></b>	<b>6.2</b>	<b>2</b>	<b>98.8</b>	<b>&lt; 0.001</b>
<b>HPMPC</b>						
<b>Sans PMA</b>	<b>0</b>	<b>49.1 x 10<sup>6</sup></b>	<b>7.7</b>	<b>1.6</b>	<b>ND</b>	<b>&lt; 0.001</b>
<b>PMA</b>	<b>0</b>	<b>20.3 x 10<sup>8</sup></b>	<b>9.3</b>	<b>Contrôle</b>	<b>Contrôle</b>	<b>Contrôle</b>
	<b>0.5</b>	<b>31.5 x 10<sup>7</sup></b>	<b>8.5</b>	<b>0.8</b>	<b>84.5</b>	<b>&lt; 0.01</b>
	<b>1</b>	<b>26.2 x 10<sup>7</sup></b>	<b>8.4</b>	<b>0.9</b>	<b>87.1</b>	<b>&lt; 0.001</b>
	<b>2</b>	<b>17.7 x 10<sup>7</sup></b>	<b>8.2</b>	<b>1.1</b>	<b>91.3</b>	<b>&lt; 0.001</b>
	<b>4</b>	<b>67.5 x 10<sup>6</sup></b>	<b>7.8</b>	<b>1.5</b>	<b>96.7</b>	<b>&lt; 0.001</b>
	<b>6</b>	<b>44.9 x 10<sup>6</sup></b>	<b>7.6</b>	<b>1.7</b>	<b>97.8</b>	<b>&lt; 0.001</b>
<b>PFA → Expérience 1</b>						
<b>Sans PMA</b>	<b>0</b>	<b>10.9 x 10<sup>6</sup></b>	<b>7.0</b>	<b>1.3</b>	<b>ND</b>	<b>&lt; 0.001</b>
<b>PMA</b>	<b>0</b>	<b>20.0 x 10<sup>7</sup></b>	<b>8.3</b>	<b>Contrôle</b>	<b>Contrôle</b>	<b>Contrôle</b>
	<b>5</b>	<b>20.3 x 10<sup>7</sup></b>	<b>8.3</b>	<b>0</b>	<b>+1.7</b>	<b>&gt; 0.9</b>
	<b>10</b>	<b>12.4 x 10<sup>7</sup></b>	<b>8.1</b>	<b>0.2</b>	<b>37.9</b>	<b>&gt; 0.1</b>
	<b>15</b>	<b>10.9 x 10<sup>7</sup></b>	<b>8.0</b>	<b>0.3</b>	<b>45.5</b>	<b>&lt; 0.01</b>
	<b>20</b>	<b>10.4 x 10<sup>7</sup></b>	<b>8.0</b>	<b>0.3</b>	<b>47.9</b>	<b>&lt; 0.01</b>
	<b>25</b>	<b>19.7 x 10<sup>6</sup></b>	<b>7.3</b>	<b>1</b>	<b>93.5</b>	<b>&lt; 0.001</b>
<b>PFA → Expérience 2</b>						
<b>Sans PMA</b>	<b>0</b>	<b>12.7 x 10<sup>6</sup></b>	<b>7.1</b>	<b>1.9</b>	<b>ND</b>	<b>&lt; 0.01</b>
<b>PMA</b>	<b>0</b>	<b>93.5 x 10<sup>7</sup></b>	<b>9.0</b>	<b>Contrôle</b>	<b>Contrôle</b>	<b>Contrôle</b>
	<b>25</b>	<b>78.7 x 10<sup>6</sup></b>	<b>7.9</b>	<b>1.1</b>	<b>91.6</b>	<b>&lt; 0.01</b>
	<b>50</b>	<b>27.1 x 10<sup>6</sup></b>	<b>7.4</b>	<b>1.6</b>	<b>97.1</b>	<b>&lt; 0.01</b>
	<b>75</b>	<b>25.9 x 10<sup>6</sup></b>	<b>7.4</b>	<b>1.6</b>	<b>97.2</b>	<b>&lt; 0.01</b>
	<b>100</b>	<b>10.7 x 10<sup>6</sup></b>	<b>7.0</b>	<b>2</b>	<b>98.9</b>	<b>&lt; 0.01</b>
	<b>125</b>	<b>85.0 x 10<sup>5</sup></b>	<b>6.9</b>	<b>2.1</b>	<b>99.1</b>	<b>&lt; 0.01</b>

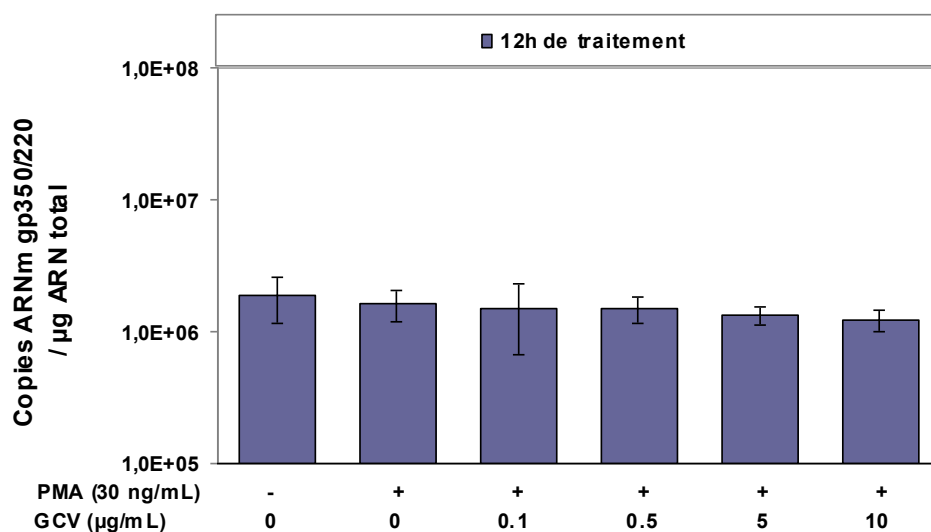
## 5. Effets des drogues antivirales sur la réplication de l'ADN cellulaire

Dans le paragraphe précédent nous avons montré que les trois composés antiviraux GCV, HPMPC et PFA inhibent la réplication de l'ADN EBV. Dans le but de déterminer si ces effets sont spécifiques du virus, le gène cellulaire humain de la β-globine a été amplifié par une PCR en temps réel. La figure 21 montre qu'il n'y a pas de différence significative ( $p > 0.05$ )

entre le nombre de copies de  $\beta$ -globine dans les cellules non-induites, non-traitées, dans les cellules PMA-induites et dans les cellules traitées par les antiviraux. Ce nombre n'est pas affecté même à 10  $\mu\text{g/mL}$ , 6  $\mu\text{g/mL}$  HPMPC, et 125  $\mu\text{g/mL}$  PFA, les plus fortes concentrations utilisées dans l'essai d'inhibition du virus. Le logarithme du nombre de génomes  $\beta$ -globine est similaire (environ 5 log) dans toutes les cultures. La synthèse de l'ADN cellulaire ne dépend donc pas de la concentration d'antiviral.

## **6. Effet des drogues antivirales sur l'expression de l'ARNm de la gp350/220**

Parallèlement à l'étude de l'action antivirale sur la réplication de l'ADN viral, nous avons étudié cette action sur l'expression de l'ARNm d'une protéine "lytique" de l'EBV, la gp350/220, qui a été quantifié par RT-PCR en temps réel. Dans des essais préliminaires, les cellules P3HR-1 ont été traitées par le GCV à différentes concentrations. La figure 23 montre qu'après 12 heures d'incubation, le nombre de copies d'ARNm gp350/220 par microgramme d'ARN total est similaire dans toutes les cultures ( $12.3 \times 10^5$  à  $18.7 \times 10^5$  copies (6.1-6.3 log)). Le cycle lytique n'est pas encore induit : pas de différence significative entre les cellules non traitées, non induites et les cellules induites par le PMA ( $p > 0.5$ ). Aux différentes concentrations utilisées, le GCV n'a aucun effet significatif ( $p > 0.3$ ) sur l'expression de l'ARNm gp350/220.



**Figure 23 : Effets du GCV sur l'expression de l'ARNm gp350/220 de l'EBV au niveau des cellules P3HR-1**

Etant donné qu'à 12 h, nous n'avons pas pu détecter d'effet antiviral, d'autres essais ont été réalisés à des temps plus longs. Sur la figure 24, on remarque que le cycle lytique commence à être induit à partir de 24 heures. Le nombre de copies d'ARNm gp350/220 dans les cellules PMA-induites ( $16.7 \times 10^6$  copies, 7.2 log) augmente de 1 log par rapport à celui des cellules induites à 12h ( $16.2 \times 10^5$  copies, 6.2 log). D'ailleurs, à 24 et 36h, cette induction est faible. La différence entre le nombre de copies d'ARNm gp350/220 dans les cellules induites et celui dans les cellules non induites est de l'ordre de 0.5 log. Pas d'effet antiviral détectable du GCV à 10 µg/mL, ni du PFA à 125 µg/mL. Cependant, à partir de 48 heures, le cycle lytique est efficacement induit (figures 24 et 25), ce qui se traduit par une augmentation du nombre de copies d'ARNm gp350/220 dans les cellules PMA-induites par rapport aux cellules contrôles non-induites ( $\Delta$  log respectivement de 1.2, 1.3, et 1.6 à 48h, 60h et 72h). On note un faible effet antiviral entre 48h et 72h. L'inhibition de l'expression de l'ARNm gp350/220 par rapport au contrôle (cellules induites), est de l'ordre de 0.3-0.4 log (51-54 %)

dans les cellules traitées par 10 µg/mL de GCV. Elle est de l'ordre de 0.2-0.3 log (32 à 44 %) dans les cellules traitées par le PFA à 125 µg/mL.

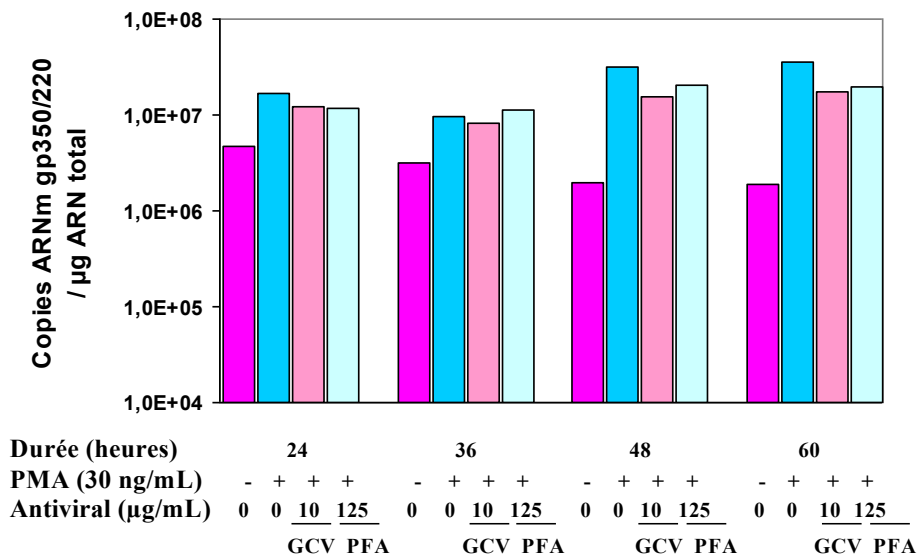


Figure 24 : Effets du GCV et du PFA sur l'expression de l'ARNm gp350/220 de l'EBV au niveau des cellules P3HR-1

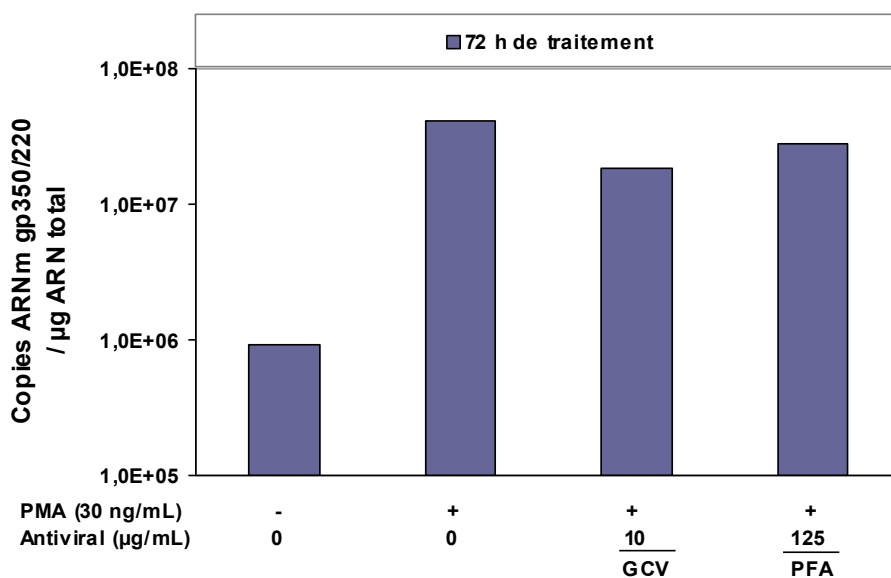
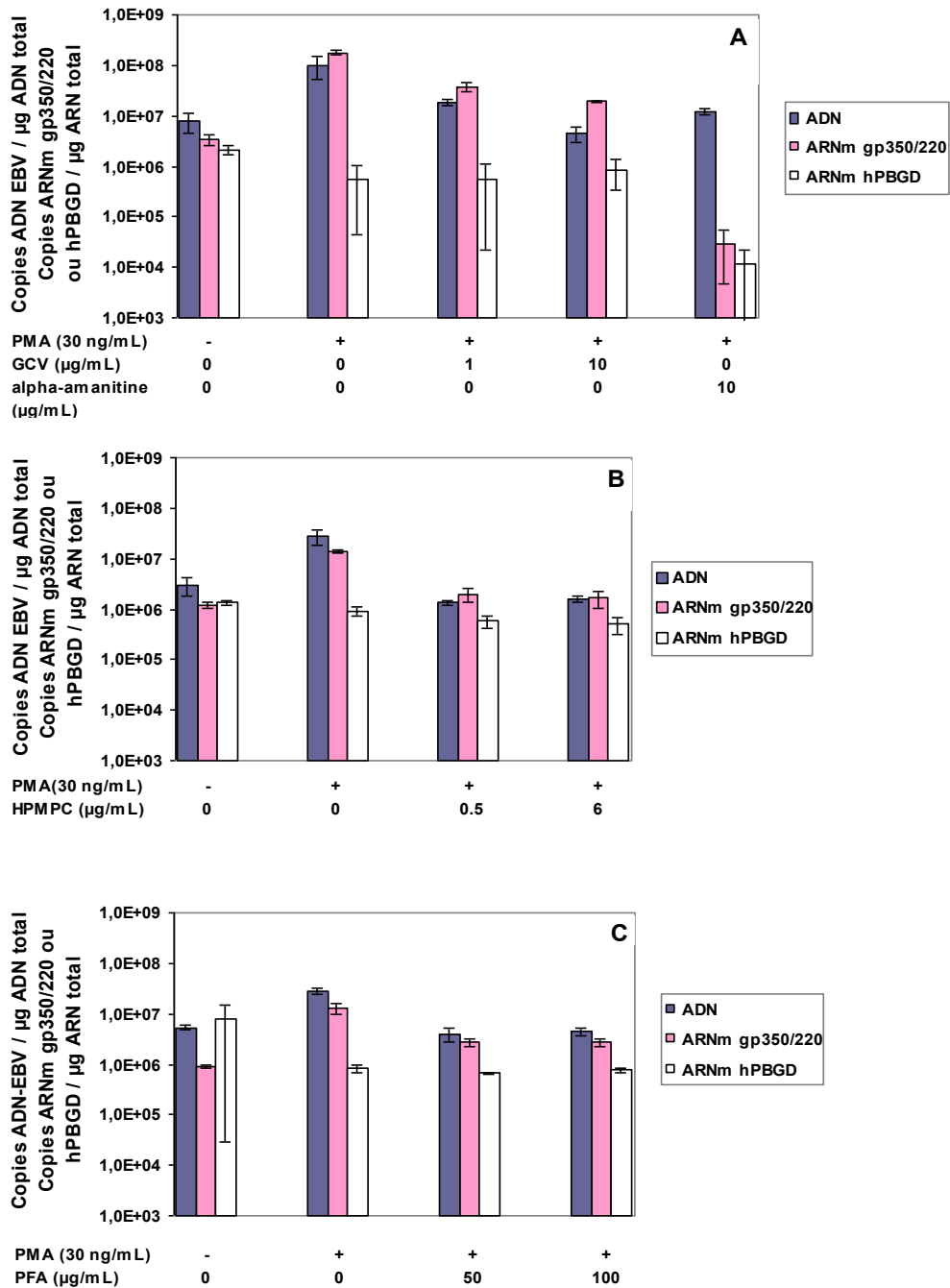


Figure 25 : Effets du GCV et du PFA sur l'expression de l'ARNm gp350/220 de l'EBV au niveau des cellules P3HR-1

Suite à ces expériences préliminaires, nous avons testé l'action antivirale du GCV, du HPMPC et du PFA après incubation des cellules P3HR-1 pour une durée de 96h. L' $\alpha$ -amanitine, un inhibiteur de la transcription de l'ARN, a aussi été testé, parallèlement à ces trois composés.

Sur la figure 26, on remarque que le cycle lytique est significativement induit. L'augmentation du nombre de copies dans les cellules induites par rapport aux cellules non induites (contrôle) est de l'ordre de 1.1-1.7 log (91-98 %). Le GCV et le PFA ont un effet nettement plus important à 96h qu'à 72h de traitement. En ce qui concerne le GCV, à une concentration de 10  $\mu\text{g/mL}$ , il inhibe l'expression de l'ARNm gp350/220 de 89.3 % par rapport au contrôle ( $\Delta\log$  entre cellules induites et cellules traitées est de 0.97). Cette inhibition est de 88.2 % ( $\Delta\log = 0.93$ ) et de 79.2 % ( $\Delta\log = 0.68$ ) respectivement à 6  $\mu\text{g/mL}$  de HPMPC et 100  $\mu\text{g/mL}$  de PFA. Elle est de 99.9 % en présence de 10  $\mu\text{g/mL}$  d' $\alpha$ -amanitine utilisé comme contrôle positif de l'action sur l'ARN. Enfin, les figures 24 à 26, montrent que l'effet antiviral sur l'inhibition de l'ARNm gp350/220 est temps-dépendant et qu'il n'est pas détectable avant 48h de traitement. Cependant, la durée optimale pour détecter l'action antivirale sur l'expression des ARNm EBV est de 96h. Pour la même durée de traitement (96h), l'effet antiviral sur l'ADN EBV a aussi été étudié et comparé à celui sur l'ARN viral. Selon la figure 26, on remarque que l'augmentation ou la diminution du nombre de copies ARNm gp350/220 se fait parallèlement à celle du nombre de copies ADN EBV dans toutes les cellules traitées. Cependant, l'inhibition de l'ARN viral est plus faible que celle de l'ADN viral. A 10  $\mu\text{g/mL}$  GCV, 6  $\mu\text{g/mL}$  HPMPC, et 100  $\mu\text{g/mL}$  PFA, le nombre de génomes viraux dans les cellules traitées est respectivement réduit de 99.5, 94.4, et 84.3 % par rapport aux cellules induites (contrôle). En présence d' $\alpha$ -amanitine à 10  $\mu\text{g/mL}$ , cette réduction est de 87.8 % ( $\Delta\log = 0.92$ ) alors que celle du nombre de copies d'ARNm gp350/220 est beaucoup

plus importante, elle est de l'ordre de 99.9 % ( $\Delta\log = 3.79$ ).



**Figure 26 : Effets du GCV, du HPMPC et du PFA sur l'expression de l'ARNm gp350/220 de l'EBV au niveau des cellules P3HR-1**

## **7. Effets des drogues antivirales sur l'expression de l'ARN cellulaire**

Dans le paragraphe précédent, on a vu que chacun des trois composés GCV, HPMP, et PFA, a un effet inhibiteur significatif sur l'expression de l'ARNm gp350/220 de l'EBV. Cependant, dans le but de savoir si cet effet est virus-spécifique ou non, un ARNm cellulaire, le hPBGD a été amplifié par RT-PCR en temps réel, en parallèle à l'ARNm viral. La figure 26 montre que les trois antiviraux n'ont pas d'effet significatif ( $p > 0.05$ ) sur l'expression de l'ARN cellulaire, alors que l' $\alpha$ -amanitine l'inhibe à 97.9 %. Cette expression est indépendante de la concentration d'antiviral. L'action antivirale des composés testés dans notre étude est donc bien EBV-spécifique puisqu'elle est sans effet sur l'ADN et l'ARN cellulaires.

## **Discussion et perspectives**



Le virus d'Epstein Barr (EBV) est la cause ou associé à de nombreuses maladies notamment chez les immunodéprimés (après transplantation, patients infectés par le VIH). Malgré que l'activité de composés anti-EBV, ait été déterminée *in vitro* et *in vivo* pour certains, aucune de ces molécules n'a été validée pour l'usage clinique contre ce virus.

Ces dernières années il y a eu une croissance du nombre de patients greffés ou infectés par le VIH et par conséquent une augmentation du nombre de patients à risque de développer des maladies associées à l'EBV. Il y a donc une nécessité d'élaborer de nouvelles molécules qui seraient efficaces, stables, avec une toxicité minimale et une bonne biodisponibilité. Cependant, la plupart des systèmes utilisés pour l'évaluation de l'activité antivirale en culture cellulaire sont fastidieux, subjectifs et manquent de sensibilité. D'où la nécessité de développer de nouveaux systèmes permettant de pallier ces inconvénients.

Dans notre étude, nous avons mis au point un système *in vitro* en utilisant la PCR en temps réel qui est quantitative, rapide, et reproductible. Cette technologie a aussi été récemment utilisée pour mesurer l'activité antivirale contre d'autres herpesvirus (HSV, HHV-6, HHV-8) (95, 143, 149).

Nous avons évalué les effets de trois composés antiviraux GCV, HPMPC et PFA au niveau des cellules P3HR-1. Dans des expériences préliminaires réalisées à 1, 5 et 10 jours, avec le GCV, la diminution du nombre de copies ADN EBV par rapport au contrôle était temps-dépendante. Il n'y avait pas d'effet après 1 jour de traitement et il a fallu un traitement de 10 jours pour pouvoir réduire ce nombre de 97.7 % par rapport au contrôle. Ceci est en corrélation avec l'étude de Lin et al. (88). Dans cette étude ils ont montré qu'il n'y a pas de différence significative dans les copies du génome EBV observée à 1 jour après traitement des cellules P3HR-1 par le GCV. Une réduction approximative de 44 % et 77 % dans les copies du génome EBV par cellule a été observée respectivement à 3 et 7 jours. Similairement, dans une autre étude de Lin et al. (91), ils ont montré qu'une incubation de 14 jours des cellules

P3HR-1 en présence du GCV est nécessaire pour éliminer complètement les copies d'ADN viral linéaire (détecté par hybridation ARNc-ADN).

Cependant, la majorité des cellules P3HR-1 est en cycle latent et 10 % approximativement sont infectées de façon productive par l'EBV. Mais, ces drogues antivirales agissent seulement sur les formes linéaires du génome (cycle lytique) qui sont synthétisées par l'ADN polymérase virale. Elles n'ont pas d'effet sur les génomes circulaires (cycle latent) qui sont répliqués par les enzymes de la cellule hôte (29, 34, 71). Il était alors nécessaire dans notre étude d'induire le cycle lytique (par addition de PMA) et donc d'augmenter la production du virus. Cette induction a permis d'augmenter le pourcentage de l'ADN viral linéaire. Ceci avait pour conséquence une meilleure visualisation de l'action antivirale et une réduction du temps d'incubation à 7 jours au lieu de 10.

Après 7 jours de traitement, les trois composés testés avaient un effet concentration-dépendant. La charge virale a été significativement réduite par rapport au contrôle (cellules PMA-induites) : de 2 log pour le GCV (10 µg/mL) et le PFA (125 µg/mL) et de 1.7 log pour le HPMPC (6 µg/mL). Pour une durée d'incubation de 4 jours, l'effet inhibiteur de ces antiviraux a aussi été détecté. Cependant, la diminution du nombre de copies EBV est inférieure à celle obtenue à 7 jours. Ceci est en corrélation avec toutes les études qui ont montré l'effet temps-dépendant de l'action antivirale telles que les études de Lin et al. (85, 91).

La quantification de l'ARNm viral lytique pour le criblage de l'activité antivirale a été rapportée seulement pour le virus herpes simplex (77). Pan et al. (119) ont récemment quantifié par RT-PCR en temps réel l'expression du génome entier de l'EBV au niveau d'une autre lignée productrice (B95-8). Ils ont montré que l'ARNm gp350/220 peut être diminué après traitement par l'hydroxyurée un inhibiteur de la synthèse de nucléotides inhibant la synthèse de l'ADN viral.

Dans notre étude, et parallèlement à la diminution de l'ADN, l'expression de l'ARNm de cette protéine a été réduite de 79 à 89 % après 4 jours d'exposition à ces antiviraux. L'effet antiviral sur cette expression est temps-dépendant. Une durée d'incubation de 12h est insuffisante pour pouvoir détecter un effet antiviral en présence du GCV. Il faut au moins 24h pour pouvoir détecter cet effet, qui atteint un maximum à 96h de traitement. Ceci est en corrélation avec l'étude de Lin et al. (88) réalisée sur le métabolisme intracellulaire de cet antiviral. Les résultats de cette étude indiquent que le GCV triphosphate (GCVTP) s'accumule dans les cellules P3HR-1 (LS) ou les cellules Raji surinfectées (par le virus P3HR-1) en fonction du temps d'exposition à la drogue. Au niveau des cellules P3HR-1 (LS) traitées par le GCV à 30  $\mu$ M, le GCVTP peut être détecté 4h après addition de la drogue et la formation maximale du GCVTP a lieu à 21h. Etant donné que le GCVTP est la forme active de l'antiviral qui agit en inhibant la synthèse de l'ADN viral et par conséquent l'expression de l'ARN viral : à une durée de traitement inférieure à 24h, la drogue n'a pas eu le temps d'agir et par suite il n'y a pas d'effet antiviral mesurable.

La PCR utilisée dans notre système nous a permis de calculer d'une façon précise les  $EC_{50}$ s des trois antiviraux testés. Les valeurs obtenues sont de  $0.28 \pm 0.06$   $\mu$ g/mL pour le GCV, de  $0.29 \pm 0.01$   $\mu$ g/mL pour le HPMPC et de  $13,6 \pm 0.17$   $\mu$ g/mL pour le PFA.

Concernant le GCV, pour une même lignée (P3HR-1 induite) et une même durée de traitement, ces valeurs sont en corrélation avec celles obtenues par Slot blot ( $EC_{50}$  : 0.2-0.4  $\mu$ g/mL) dans les études de Meerbach et al. (102) et de Friedrichs et al. (47), ou bien par PCR en temps réel ( $EC_{50}$  :  $0.14 + 0.07$   $\mu$ g/mL) dans cette dernière étude.

En ce qui concerne le HPMPC, l' $EC_{50}$  calculée dans notre étude est similaire à celles obtenues dans d'autres études ( $EC_{50}$  de 0.1-0.4  $\mu$ g/mL) pour les mêmes durées de traitement et cellules induites mais en utilisant le Slot blot pour la détection de l'ADN viral (47, 102, 111). Par contre, pour ces mêmes conditions (cellules P3HR-1 induites, durée) mais en

utilisant la PCR en temps réel, la valeur d'EC<sub>50</sub> calculée par Friedrichs et al. (47) est de 0.065 + 0.036 µg/mL, inférieure donc aux valeurs citées ci-dessus.

Finalement, il est important de noter que très peu d'études ont évalué l'effet du PFA contre l'EBV. Rares sont les études qui ont calculé une EC<sub>50</sub> pour cet antiviral et aucune n'a calculé cette valeur par PCR en temps réel. L'EC<sub>50</sub> évaluée dans notre étude est similaire aux résultats obtenus dans des études précédentes. Dans Prachova et al. (126), l'EC<sub>50</sub> d'inhibition de l'activité de l'ADN polymérase EBV a été évaluée à 6-7 µg/mL et dans Yao et al. (165) l'EC<sub>90</sub> (de production du virus) a été estimée à 75 µM (22.5 µg/mL).

Il est important de signaler que l'action antivirale mesurée dans notre étude pour chacun de ces trois antiviraux n'est pas totale. Même aux concentrations les plus élevées utilisées dans l'essai d'inhibition du virus il y a un nombre résiduel de génomes EBV par comparaison à celui dans les cellules non-induites, non-traitées. Ceci pourrait être dû 1) d'une part aux formes circulaires du génome EBV qui ne sont pas affectées par ces antiviraux ; 2) d'autre part, aux génomes viraux linéaires qui pourraient être synthétisés avant l'addition des drogues et/ou durant l'exposition à cette drogue. L'inefficacité de composés antiviraux sur les formes circulaires du génome viral a similairement été démontrée dans plusieurs études (85, 87, 89-91).

Contrairement à nos attentes, l'évaluation de l'effet antiviral sur l'expression de l'ARNm lytique, n'a pas permis de résoudre le problème de l'ADN résiduel dû aux formes épisomales ; un nombre résiduel d'ARNm gp350/220 a aussi été détecté. Ceci pourrait être dû 1) à l'expression de l'ARNm à partir de l'ADN viral qui n'a pas été affecté par les antiviraux, 2) à de l'ARNm qui a été synthétisé avant l'action antivirale, 3) ou bien au fait que ces trois antiviraux n'ont pas un effet inhibiteur très important, et peut être qu'avec de nouvelles molécules à forte efficacité, on arriverait à avoir une élimination plus importante voire totale de ces copies résiduelles.

La quantification de l'ARNm tardif n'apparaît pas donc -au moins dans les lignées EBV spontanément productrices- plus informative que le test de quantification de l'ADN viral pour l'évaluation de l'activité antivirale. Alternativement, cette quantification pourrait être utile pour mesurer l'effet antiviral d'inhibiteurs spécifiques de la transcription virale tels que les ARN d'interférence (si RNA) (23). Néanmoins, nous avons récemment démontré que la mesure quantitative de l'ARNm tardif dans des échantillons biologiques pourrait être un marqueur de la réplication lytique. Cette réplication pourrait aider à décider de l'utilisation ou non de drogues antivirales dans les maladies associées à l'EBV.

Sous les mêmes conditions d'essai d'inhibition du virus, nous avons démontré la spécificité de l'action antivirale au niveau moléculaire grâce à la PCR en temps réel. La réplication de l'ADN cellulaire (gène humain de la  $\beta$ -globine) aussi bien que celle de l'ARN cellulaire (hPBGD) n'a pas été affectée aux plus fortes concentrations d'antiviraux testées dans les tests d'inhibition du virus. Par contre, l'expression des ARNms viral et cellulaire a été complètement inhibée sous l'effet de l' $\alpha$ -amanitine, confirmant ainsi la spécificité de l'effet antiviral.

Cette spécificité a aussi été démontrée au niveau cellulaire en utilisant la cytométrie en flux. Contrairement à la mesure subjective et non précise de la viabilité par le bleu de Trypan utilisée dans la majorité des études, cette technologie nous a permis une mesure quantitative, précise et sensible. Après 3, 5 et 7 jours aucun des trois composés n'avait un effet sur la viabilité des cellules P3HR-1 aux concentrations qui inhibent le virus. D'ailleurs, aucun de ces composés n'avait un effet sur l'induction de l'apoptose au niveau de cette lignée. Par contre, dans l'étude de Abdulkarim et al. (1), ils ont montré que le HPMPC induit l'apoptose au niveau des cellules Daudi.

En conclusion, malgré les méthodologies nombreuses décrites pour l'évaluation de l'activité antivirale contre l'EBV, la PCR en temps réel permet une amélioration dans l'évaluation de l'activité antivirale et la rend simple et plus facile.

L'utilité de la quantification de l'ARNm structural tardif pour la mesure de l'effet des drogues sur la réplication lytique devrait être évaluée dans des expériences futures. Il serait d'une grande importance de mettre au point un système *in vitro* qui permettrait d'évaluer séparément et de façon quantitative et simple l'effet antiviral : sur les formes linéaire et circulaire de l'ADN viral.

## Bibliographie

1. **Abdulkarim, B., S. Sabri, D. Zelenika, E. Deutsch, V. Frascogna, J. Klijanienko, W. Vainchenker, I. Joab, and J. Bourhis.** 2003. Antiviral agent cidofovir decreases Epstein-Barr virus (EBV) oncoproteins and enhances the radiosensitivity in EBV-related malignancies. *Oncogene*. **22**:2260-71.
2. **Agut, H., J. M. Huraux, H. Collandre, and L. Montagnier.** 1989. Susceptibility of human herpesvirus 6 to acyclovir and ganciclovir. *Lancet*. **2**:626.
3. **Akihisa, T., E. M. Kithsiri Wijeratne, H. Tokuda, F. Enjo, M. Toriumi, Y. Kimura, K. Koike, T. Nikaido, Y. Tezuka, and H. Nishino.** 2002. Eupha-7,9(11),24-trien-3beta-ol ("antiquol C") and other triterpenes from *Euphorbia antiquorum* latex and their inhibitory effects on Epstein-Barr virus activation. *J Nat Prod*. **65**:158-62.
4. **Akihisa, T., H. Tokuda, M. Ukiya, T. Suzuki, F. Enjo, K. Koike, T. Nikaido, and H. Nishino.** 2004. 3-epicabraleahydroxylactone and other triterpenoids from camellia oil and their inhibitory effects on Epstein-Barr virus activation. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. **52**:153-6.
5. **Albrecht, H., H. J. Stellbrink, D. Brewster, and H. Greten.** 1994. Resolution of oral hairy leukoplakia during treatment with foscarnet. *Aids*. **8**:1014-6.
6. **Alfieri, C., A. C. Allison, and E. Kieff.** 1994. Effect of mycophenolic acid on Epstein-Barr virus infection of human B lymphocytes. *Antimicrob Agents Chemother*. **38**:126-9.
7. **Allday, M. J., and D. H. Crawford.** 1988. Role of epithelium in EBV persistence and pathogenesis of B-cell tumours. *Lancet*. **1**:855-7.

8. **Anagnostopoulos, I., M. Hummel, C. Kreschel, and H. Stein.** 1995. Morphology, immunophenotype, and distribution of latently and/or productively Epstein-Barr virus-infected cells in acute infectious mononucleosis: implications for the interindividual infection route of Epstein-Barr virus. *Blood*. **85**:744-50.
9. **Andersson, J., S. Britton, I. Ernberg, U. Andersson, W. Henle, B. Skoldenberg, and A. Tisell.** 1986. Effect of acyclovir on infectious mononucleosis: a double-blind, placebo-controlled study. *J Infect Dis*. **153**:283-90.
10. **Andersson, J., B. Skoldenberg, W. Henle, J. Giesecke, A. Ortqvist, I. Julander, E. Gustavsson, B. Akerlund, S. Britton, and I. Ernberg.** 1987. Acyclovir treatment in infectious mononucleosis: a clinical and virological study. *Infection*. **15**:S14-20.
11. **Bacon, T. H., and M. R. Boyd.** 1995. Activity of penciclovir against Epstein-Barr virus. *Antimicrob Agents Chemother*. **39**:1599-602.
12. **Baer, R., A. T. Bankier, M. D. Biggin, P. L. Deininger, P. J. Farrell, T. J. Gibson, G. Hatfull, G. S. Hudson, S. C. Satchwell, C. Seguin, and et al.** 1984. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*. **310**:207-11.
13. **Baykurt, C., K. Caglar, N. Ceviz, C. Akyuz, and G. Secmeer.** 1999. Successful treatment of Epstein-Barr virus infection associated with myocarditis. *Pediatr Int*. **41**:389-91.
14. **Beauchamp, L. M., B. L. Serling, J. E. Kelsey, K. K. Biron, P. Collins, J. Selway, J. C. Lin, and H. J. Schaeffer.** 1988. Effect of acyclic pyrimidines related to 9-[(1,3-dihydroxy-2-propoxy)methyl]guanine on herpesviruses. *J Med Chem*. **31**:144-9.
15. **Borer, A., J. Gilad, H. Haikin, K. Riesenber, A. Porath, and F. Schlaeffer.** 1999. Clinical features and costs of care for hospitalized adults with primary Epstein-Barr virus infection. *Am J Med*. **107**:144-8.



16. **Borza, C. M., and L. M. Hutt-Fletcher.** 2002. Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nat Med.* **8**:594-9.
17. **Brengel-Pesce, K., P. Morand, A. Schmuck, M. J. Bourgeat, M. Buisson, G. Bargues, M. Bouzid, and J. M. Seigneurin.** 2002. Routine use of real-time quantitative PCR for laboratory diagnosis of Epstein-Barr virus infections. *J Med Virol.* **66**:360-9.
18. **Brockmeyer, N. H., G. Pohl, and L. Mertins.** 1997. Combination of chemotherapy and antiviral therapy for Epstein-Barr virus-associated non-Hodgkin's lymphoma of high grade malignancy in cases of HIV infection. *Eur J Med Res.* **2**:133-5.
19. **Burkitt, D.** 1958. A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg.* **46**:218-23.
20. **Callan, M. F., L. Tan, N. Annels, G. S. Ogg, J. D. Wilson, C. A. O'Callaghan, N. Steven, A. J. McMichael, and A. B. Rickinson.** 1998. Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus In vivo. *J Exp Med.* **187**:1395-402.
21. **Chang, L. K., T. T. Wei, Y. F. Chiu, C. P. Tung, J. Y. Chuang, S. K. Hung, C. Li, and S. T. Liu.** 2003. Inhibition of Epstein-Barr virus lytic cycle by (-)-epigallocatechin gallate. *Biochem Biophys Res Commun.* **301**:1062-8.
22. **Chang, R. S., and H. D. Golden.** 1971. Transformation of human leucocytes by throat washing from infectious mononucleosis patients. *Nature.* **234**:359-60.
23. **Chang, Y., S. S. Chang, H. H. Lee, S. L. Doong, K. Takada, and C. H. Tsai.** 2004. Inhibition of the Epstein-Barr virus lytic cycle by Zta-targeted RNA interference. *J Gen Virol.* **85**:1371-9.
24. **Choi, Y., L. Li, S. Grill, E. Gullen, C. S. Lee, G. Gumina, E. Tsujii, Y. C. Cheng, and C. K. Chu.** 2000. Structure-activity relationships of (E)-5-(2-bromovinyl)uracil

- and related pyrimidine nucleosides as antiviral agents for herpes viruses. *J Med Chem.* **43**:2538-46.
25. **Chu, C. K., T. Ma, K. Shanmuganathan, C. Wang, Y. Xiang, S. B. Pai, G. Q. Yao, J. P. Sommadossi, and Y. C. Cheng.** 1995. Use of 2'-fluoro-5-methyl-beta-L-arabinofuranosyluracil as a novel antiviral agent for hepatitis B virus and Epstein-Barr virus. *Antimicrob Agents Chemother.* **39**:979-81.
  26. **Coker-Vann, M., and R. Dolin.** 1977. Effect of adenine arabinoside on Epstein-Barr virus in vitro. *J Infect Dis.* **135**:447-53.
  27. **Crawford, D. H., A. J. Swerdlow, C. Higgins, K. McAulay, N. Harrison, H. Williams, K. Britton, and K. F. Macsween.** 2002. Sexual history and Epstein-Barr virus infection. *J Infect Dis.* **186**:731-6. Epub 2002 Aug 20.
  28. **Crumpacker, C. S.** 1992. Mechanism of action of foscarnet against viral polymerases. *Am J Med.* **92**:3S-7S.
  29. **Datta, A. K., and R. E. Hood.** 1981. Mechanism of inhibition of Epstein-Barr virus replication by phosphonoformic acid. *Virology.* **114**:52-9.
  30. **Datta, A. K., and J. S. Pagano.** 1983. Phosphorylation of acyclovir in vitro in activated Burkitt somatic cell hybrids. *Antimicrob Agents Chemother.* **24**:10-4.
  31. **Davis, C. L., K. L. Harrison, J. P. McVicar, P. J. Forg, M. P. Bronner, and C. L. Marsh.** 1995. Antiviral prophylaxis and the Epstein Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disorder. *Clin Transplant.* **9**:53-9.
  32. **De Clercq, E.** 1997. Acyclic nucleoside phosphonates in the chemotherapy of DNA virus and retrovirus infections. *Intervirology.* **40**:295-303.
  33. **De Clercq, E.** 2001. Antiviral drugs: current state of the art. *J Clin Virol.* **22**:73-89.
  34. **De Clercq, E.** 1993. Antivirals for the treatment of herpesvirus infections. *J Antimicrob Chemother.* **32**:121-32.

35. **De Clercq, E.** 2003. Potential of acyclic nucleoside phosphonates in the treatment of DNA virus and retrovirus infections. *Expert Rev Anti Infect Ther.* **1**:21-43.
36. **De Clercq, E.** 1996. Therapeutic potential of Cidofovir (HPMPC, Vistide) for the treatment of DNA virus (i.e. herpes-, papova-, pox- and adenovirus) infections. *Verh K Acad Geneeskd Belg.* **58**:19-47; discussion 47-9.
37. **DelleMijn, P. L., A. Brandenburg, H. G. Niesters, M. J. van den Bent, P. H. Rothbarth, and L. T. Vlasveld.** 1995. Successful treatment with ganciclovir of presumed Epstein-Barr meningo-encephalitis following bone marrow transplant. *Bone Marrow Transplant.* **16**:311-2.
38. **Diallo, B., M. Vanhaelen, R. Vanhaelen-Fastre, T. Konoshima, M. Kozuka, and H. Tokuda.** 1989. Studies on inhibitors of skin-tumor promotion. Inhibitory effects of triterpenes from *Cochlospermum tinctorium* on Epstein-Barr virus activation. *J Nat Prod.* **52**:879-81.
39. **Drago, F., E. Ranieri, A. Pastorino, S. Casazza, F. Crovato, and A. Rebora.** 1996. Epstein-Barr virus-related primary cutaneous amyloidosis. Successful treatment with acyclovir and interferon-alpha. *Br J Dermatol.* **134**:170-4.
40. **Epstein, M. A., B. G. Achong, and Y. M. Barr.** 1964. Virus Particles in Cultured Lymphoblasts From Burkitt'S Lymphoma. *Lancet.* **15**:702-3.
41. **Fafi-Kremer, S., P. Morand, J. P. Brion, P. Pavese, M. Baccard, R. Germi, O. Genoulaz, S. Nicod, M. Jolivet, R. W. Ruigrok, J. P. Stahl, and J. M. Seigneurin.** 2005. Long-term shedding of infectious epstein-barr virus after infectious mononucleosis. *J Infect Dis.* **191**:985-9. Epub 2005 Feb 7.
42. **Falk, K. I., and I. Ernberg.** 1999. Demethylation of the Epstein-barr virus origin of lytic replication and of the immediate early gene BZLF1 is DNA replication independent. Brief report. *Arch Virol.* **144**:2219-27.

43. **Farber, I., C. Klinger, P. Wutzler, K. D. Thiel, J. Reefschlager, and G. Herrmann.** 1987. Effect of (E)-5-(2-bromovinyl)- and 5-vinyl-1-beta-D-arabinofuranosyluracil on Epstein-Barr virus antigen expression in P3HR-1 cells: comparison with acyclovir. *Acta Virol.* **31**:13-8.
44. **Farmer, D. G., S. V. McDiarmid, D. Winston, H. Yersiz, G. Cortina, S. Dry, A. J. Maxfield, B. Vandenbogaart, M. Correa, A. Kroeber, S. Geevarghese, and R. W. Busuttil.** 2002. Effectiveness of aggressive prophylactic and preemptive therapies targeted against cytomegaloviral and Epstein-Barr viral disease after human intestinal transplantation. *Transplant Proc.* **34**:948-9.
45. **Faulkner, G. C., A. S. Krajewski, and D. H. Crawford.** 2000. The ins and outs of EBV infection. *Trends Microbiol.* **8**:185-9.
46. **Field, A. K., M. E. Davies, C. DeWitt, H. C. Perry, R. Liou, J. Germershausen, J. D. Karkas, W. T. Ashton, D. B. Johnston, and R. L. Tolman.** 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**:4139-43.
47. **Friedrichs, C., J. Neyts, G. Gaspar, E. De Clercq, and P. Wutzler.** 2004. Evaluation of antiviral activity against human herpesvirus 8 (HHV-8) and Epstein-Barr virus (EBV) by a quantitative real-time PCR assay. *Antiviral Res.* **62**:121-3.
48. **Gardella, T., P. Medveczky, T. Sairenji, and C. Mulder.** 1984. Detection of circular and linear herpesvirus DNA molecules in mammalian cells by gel electrophoresis. *J Virol.* **50**:248-54.
49. **Germi, R., P. Morand, K. Brengel-Pesce, S. Fafi-Kremer, O. Genoulaz, C. Ginevra, M. Ballout, G. Bargues, and J. M. Seigneurin.** 2004. Quantification of gp350/220 Epstein-Barr virus (EBV) mRNA by real-time reverse transcription-PCR in EBV-associated diseases. *Clin Chem.* **50**:1814-7.

50. **Gershburg, E., and J. S. Pagano.** 2002. Phosphorylation of the Epstein-Barr virus (EBV) DNA polymerase processivity factor EA-D by the EBV-encoded protein kinase and effects of the L-riboside benzimidazole 1263W94. *J Virol.* **76**:998-1003.
51. **Gomyo, H., M. Shimoyama, K. Minagawa, K. Yakushijin, N. Urahama, A. Okamura, K. Yamamoto, M. Ito, K. Chihara, and T. Matsui.** 2003. Effective anti-viral therapy for hemophagocytic syndrome associated with B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma.* **44**:1807-10.
52. **Greenspan, D., Y. G. De Souza, M. A. Conant, H. Hollander, S. K. Chapman, E. T. Lennette, V. Petersen, and J. S. Greenspan.** 1990. Efficacy of desciclovir in the treatment of Epstein-Barr virus infection in oral hairy leukoplakia. *J Acquir Immune Defic Syndr.* **3**:571-8.
53. **Greenspan, D., J. S. Greenspan, M. Conant, V. Petersen, S. Silverman, Jr., and Y. de Souza.** 1984. Oral "hairy" leucoplakia in male homosexuals: evidence of association with both papillomavirus and a herpes-group virus. *Lancet.* **2**:831-4.
54. **Gruhn, B., A. Meerbach, R. Egerer, H. J. Mentzel, R. Hafer, F. Ringelmann, M. Sauer, J. Hermann, and F. Zintl.** 1999. Successful treatment of Epstein-Barr virus-induced transverse myelitis with ganciclovir and cytomegalovirus hyperimmune globulin following unrelated bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **24**:1355-8.
55. **Gustafson, E. A., A. C. Chillemi, D. R. Sage, and J. D. Fingerroth.** 1998. The Epstein-Barr virus thymidine kinase does not phosphorylate ganciclovir or acyclovir and demonstrates a narrow substrate specificity compared to the herpes simplex virus type 1 thymidine kinase. *Antimicrob Agents Chemother.* **42**:2923-31.
56. **Gustafson, E. A., R. F. Schinazi, and J. D. Fingerroth.** 2000. Human herpesvirus 8 open reading frame 21 is a thymidine and thymidylate kinase of narrow substrate

specificity that efficiently phosphorylates zidovudine but not ganciclovir. *J Virol.* **74**:684-92.

57. **Haan, K. M., W. W. Kwok, R. Longnecker, and P. Speck.** 2000. Epstein-Barr virus entry utilizing HLA-DP or HLA-DQ as a coreceptor. *J Virol.* **74**:2451-4.
58. **Hallee, T. J., A. S. Evans, J. C. Niederman, C. M. Brooks, and H. Voegtly.** 1974. Infectious mononucleosis at the United States Military Academy. A prospective study of a single class over four years. *Yale J Biol Med.* **47**:182-95.
59. **Hanel, M., F. Fiedler, and C. Thorns.** 2001. Anti-CD20 monoclonal antibody (Rituximab) and Cidofovir as successful treatment of an EBV-associated lymphoma with CNS involvement. *Onkologie.* **24**:491-4.
60. **Hanto, D. W., G. Frizzera, K. J. Gajl-Peczalska, K. Sakamoto, D. T. Purtilo, H. H. Balfour, Jr., R. L. Simmons, and J. S. Najarian.** 1982. Epstein-Barr virus-induced B-cell lymphoma after renal transplantation: acyclovir therapy and transition from polyclonal to monoclonal B-cell proliferation. *N Engl J Med.* **306**:913-8.
61. **Hanto, D. W., G. Frizzera, K. J. Gajl-Peczalska, and R. L. Simmons.** 1985. Epstein-Barr virus, immunodeficiency, and B cell lymphoproliferation. *Transplantation.* **39**:461-72.
62. **Henle, W., and G. Henle.** 1985. Epstein-Barr virus and blood transfusions. *Prog Clin Biol Res.* **182**:201-9.
63. **Hinuma, Y., M. Konn, J. Yamaguchi, D. J. Wudarski, J. R. Blakeslee, Jr., and J. T. Grace, Jr.** 1967. Immunofluorescence and herpes-type virus particles in the P3HR-1 Burkitt lymphoma cell line. *J Virol.* **1**:1045-51.
64. **Hochberg, D., T. Souza, M. Catalina, J. L. Sullivan, K. Luzuriaga, and D. A. Thorley-Lawson.** 2004. Acute infection with Epstein-Barr virus targets and

overwhelms the peripheral memory B-cell compartment with resting, latently infected cells. *J Virol.* **78**:5194-204.

65. **Hocqueloux, L., F. Agbalika, E. Oksenhendler, and J. M. Molina.** 2001. Long-term remission of an AIDS-related primary effusion lymphoma with antiviral therapy. *Aids.* **15**:280-2.
66. **Ishida, Y., Y. Yokota, H. Tauchi, M. Fukuda, T. Takaoka, M. Hayashi, and H. Matsuda.** 1993. Ganciclovir for chronic active Epstein-Barr virus infection. *Lancet.* **341**:560-1.
67. **Ito, C., M. Itoigawa, Y. Mishina, V. C. Filho, T. Mukainaka, H. Tokuda, H. Nishino, and H. Furukawa.** 2002. Chemical constituents of *Calophyllum brasiliensis*: structure elucidation of seven new xanthenes and their cancer chemopreventive activity. *J Nat Prod.* **65**:267-72.
68. **Iwase, Y., Y. Takemura, M. Ju-ichi, S. Kawaii, M. Yano, Y. Okuda, T. Mukainaka, A. Tsuruta, M. Okuda, J. Takayasu, H. Tokuda, and H. Nishino.** 1999. Inhibitory effect of Epstein-Barr virus activation by Citrus fruits, a cancer chemopreventor. *Cancer Lett.* **139**:227-36.
69. **Kapadia, G. J., S. C. Sharma, H. Tokuda, H. Nishino, and S. Ueda.** 1996. Inhibitory effect of iridoids on Epstein-Barr virus activation by a short-term in vitro assay for anti-tumor promoters. *Cancer Lett.* **102**:223-6.
70. **Karajannis, M. A., M. Hummel, I. Anagnostopoulos, and H. Stein.** 1997. Strict lymphotropism of Epstein-Barr virus during acute infectious mononucleosis in nonimmunocompromised individuals. *Blood.* **89**:2856-62.
71. **Keating, M. R.** 1999. Antiviral agents for non-human immunodeficiency virus infections. *Mayo Clin Proc.* **74**:1266-83.

72. **Kimura, H., Y. Hoshino, H. Kanegane, I. Tsuge, T. Okamura, K. Kawa, and T. Morishima.** 2001. Clinical and virologic characteristics of chronic active Epstein-Barr virus infection. *Blood*. **98**:280-6.
73. **Kimura, H., M. Morita, I. Tsuge, Y. Hoshino, N. Tanaka, Y. Ito, and T. Morishima.** 2001. Vidarabine therapy for severe chronic active Epstein-Barr virus infection. *J Pediatr Hematol Oncol*. **23**:294-9.
74. **Kira, T., S. P. Grill, G. E. Dutschman, J. S. Lin, F. Qu, Y. Choi, C. K. Chu, and Y. C. Cheng.** 2000. Anti-Epstein-Barr virus (EBV) activity of beta-L-5-iododioxolane uracil is dependent on EBV thymidine kinase. *Antimicrob Agents Chemother*. **44**:3278-84.
75. **Konoshima, T., M. Takasaki, H. Tokuda, K. Masuda, Y. Arai, K. Shiojima, and H. Ageta.** 1996. Anti-tumor-promoting activities of triterpenoids from ferns. I. *Biol Pharm Bull*. **19**:962-5.
76. **Kumar, R., L. I. Wiebe, and E. E. Knaus.** 1993. Synthesis and antiviral activity of novel 5-(1-azido-2-haloethyl) and 5-(1-azido-, amino-, or methoxyethyl) analogs of 2'-deoxyuridine. *J Med Chem*. **36**:2470-4.
77. **Kuo, Y. C., L. C. Lin, W. J. Tsai, C. J. Chou, S. H. Kung, and Y. H. Ho.** 2002. Samarangenin B from *Limonium sinense* suppresses herpes simplex virus type 1 replication in Vero cells by regulation of viral macromolecular synthesis. *Antimicrob Agents Chemother*. **46**:2854-64.
78. **Kushner, N. L., S. L. Williams, C. B. Hartline, E. A. Harden, D. J. Bidanset, X. Chen, J. Zemlicka, and E. R. Kern.** 2003. Efficacy of methylenecyclopropane analogs of nucleosides against herpesvirus replication in vitro. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. **22**:2105-19.



79. **Lerner, A. M., S. H. Beqaj, R. G. Deeter, H. J. Dworkin, M. Zervos, C. H. Chang, J. T. Fitzgerald, J. Goldstein, and W. O'Neill.** 2002. A six-month trial of valacyclovir in the Epstein-Barr virus subset of chronic fatigue syndrome: improvement in left ventricular function. *Drugs Today (Bare)*. **38**:549-61.
80. **Lerner, A. M., M. Zervos, C. H. Chang, S. Beqaj, J. Goldstein, W. O'Neill, H. Dworkin, T. Fitzgerald, and R. G. Deeter.** 2001. A small, randomized, placebo-controlled trial of the use of antiviral therapy for patients with chronic fatigue syndrome. *Clin Infect Dis*. **32**:1657-8.
81. **Lewin, N., P. Aman, B. Akerlund, E. Gustavsson, C. Carenfelt, L. Lejdeborn, G. Klein, and E. Klein.** 1990. Epstein-Barr virus-carrying B cells in the blood during acute infectious mononucleosis give rise to lymphoblastoid lines in vitro by release of transforming virus and by proliferation. *Immunol Lett*. **26**:59-65.
82. **Li, J. S., and Y. C. Cheng.** 1988. Interaction of Epstein-Barr virus DNA polymerase with aphidicolin, phosphonoformate and 5'-GMP. *Virus Genes*. **1**:369-75.
83. **Lietman, P. S.** 1992. Clinical pharmacology: foscarnet. *Am J Med*. **92**:8S-11S.
84. **Lin, J. C.** 2003. Mechanism of action of glycyrrhizic acid in inhibition of Epstein-Barr virus replication in vitro. *Antiviral Res*. **59**:41-7.
85. **Lin, J. C., E. De Clercq, and J. S. Pagano.** 1991. Inhibitory effects of acyclic nucleoside phosphonate analogs, including (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine, on Epstein-Barr virus replication. *Antimicrob Agents Chemother*. **35**:2440-3.
86. **Lin, J. C., E. DeClercq, and J. S. Pagano.** 1987. Novel acyclic adenosine analogs inhibit Epstein-Barr virus replication. *Antimicrob Agents Chemother*. **31**:1431-3.
87. **Lin, J. C., and H. Machida.** 1988. Comparison of two bromovinyl nucleoside analogs, 1-beta-D-arabinofuranosyl-E-5-(2-bromovinyl)uracil and E-5-(2-

- bromovinyl)-2'-deoxyuridine, with acyclovir in inhibition of Epstein-Barr virus replication. *Antimicrob Agents Chemother.* **32**:1068-72.
88. **Lin, J. C., D. J. Nelson, C. U. Lambe, and E. I. Choi.** 1986. Metabolic activation of 9([2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy]methyl)guanine in human lymphoblastoid cell lines infected with Epstein-Barr virus. *J Virol.* **60**:569-73.
89. **Lin, J. C., M. C. Smith, Y. C. Cheng, and J. S. Pagano.** 1983. Epstein-Barr virus: inhibition of replication by three new drugs. *Science.* **221**:578-9.
90. **Lin, J. C., M. C. Smith, and J. S. Pagano.** 1985. Comparative efficacy and selectivity of some nucleoside analogs against Epstein-Barr virus. *Antimicrob Agents Chemother.* **27**:971-3.
91. **Lin, J. C., M. C. Smith, and J. S. Pagano.** 1984. Prolonged inhibitory effect of 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine against replication of Epstein-Barr virus. *J Virol.* **50**:50-5.
92. **Lin, J. S., T. Kira, E. Gullen, Y. Choi, F. Qu, C. K. Chu, and Y. C. Cheng.** 1999. Structure-activity relationships of L-dioxolane uracil nucleosides as anti-Epstein Barr virus agents. *J Med Chem.* **42**:2212-7.
93. **Liu, M. Y., H. K. Yen, J. W. Chern, C. H. Tsai, C. S. Yang, and J. Y. Chen.** 1996. Screening of drugs inhibiting Epstein-Barr virus replication. *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi.* **29**:80-9.
94. **Long, M. C., D. J. Bidanset, S. L. Williams, N. L. Kushner, and E. R. Kern.** 2003. Determination of antiviral efficacy against lymphotropic herpesviruses utilizing flow cytometry. *Antiviral Res.* **58**:149-57.
95. **Mace, M., C. Manichanh, P. Bonnafous, S. Precigout, D. Boutolleau, A. Gautheret-Dejean, and H. Agut.** 2003. Real-time PCR as a versatile tool for

- investigating the susceptibility of human herpesvirus 6 to antiviral agents. *Antimicrob Agents Chemother.* **47**:3021-4.
96. **MacGinley, R., P. B. Bartley, T. Sloots, and D. W. Johnson.** 2001. Epstein-Barr virus encephalitis in a renal allograft recipient diagnosed by polymerase chain reaction on cerebrospinal fluid and successfully treated with ganciclovir. *Nephrol Dial Transplant.* **16**:197-8.
97. **Malouf, M. A., P. N. Chhajed, P. Hopkins, M. Plit, J. Turner, and A. R. Glanville.** 2002. Anti-viral prophylaxis reduces the incidence of lymphoproliferative disease in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant.* **21**:547-54.
98. **Mar, E. C., Y. C. Cheng, and E. S. Huang.** 1983. Effect of 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine on human cytomegalovirus replication in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* **24**:518-21.
99. **Mar, E. C., C. K. Chu, and J. C. Lin.** 1995. Some nucleoside analogs with anti-human immunodeficiency virus activity inhibit replication of Epstein-Barr virus. *Antiviral Res.* **28**:1-11.
100. **Margalith, M., D. Manor, V. Usieli, and N. Goldblum.** 1980. Phosphonoformate inhibits synthesis of Epstein-Barr virus (EBV) capsid antigen and transformation of human cord blood lymphocytes by EBV. *Virology.* **102**:226-30.
101. **Medveczky, M. M., T. A. Sherwood, T. W. Klein, H. Friedman, and P. G. Medveczky.** 2004. Delta-9 tetrahydrocannabinol (THC) inhibits lytic replication of gamma oncogenic herpesviruses in vitro. *BMC Med.* **2**:34.
102. **Meerbach, A., A. Holy, P. Wutzler, E. De Clercq, and J. Neyts.** 1998. Inhibitory effects of novel nucleoside and nucleotide analogues on Epstein-Barr virus replication. *Antivir Chem Chemother.* **9**:275-82.

103. **Meerbach, A., R. Klocking, C. Meier, A. Lomp, B. Helbig, and P. Wutzler.** 2000. Inhibitory effect of cycloSaligenyl-nucleoside monophosphates (cycloSal-NMP) of acyclic nucleoside analogues on HSV-1 and EBV. *Antiviral Res.* **45**:69-77.
104. **Meier, C., A. Lomp, A. Meerbach, and P. Wutzler.** 2002. CycloSal-BVDUMP pronucleotides: how to convert an antiviral-inactive nucleoside analogue into a bioactive compound against EBV. *J Med Chem.* **45**:5157-72.
105. **Meier, C., A. Lomp, A. Meerbach, and P. Wutzler.** 2001. cycloSaligenyl-5-[(E)-2-bromovinyl]-2'-deoxyuridine monophosphate (cycloSal-BVDUMP) pronucleotides active against Epstein-Barr virus. *Chembiochem.* **2**:283-5.
106. **Meier, C., A. Lomp, A. Meerbach, and P. Wutzler.** 2001. Synthesis, hydrolysis and anti-EBV activity of a series of 3'-modified cycloSal-BVDUMP pronucleotides. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* **20**:307-14.
107. **Minami, T., S. Wada, H. Tokuda, G. Tanabe, O. Muraoka, and R. Tanaka.** 2002. Potential antitumor-promoting diterpenes from the cones of *Pinus luchuensis*. *J Nat Prod.* **65**:1921-3.
108. **Mozzanica, N., A. Cattaneo, N. Fracchiolla, V. Boneschi, E. Berti, E. Gronda, M. Mangiavacchi, A. F. Finzi, and A. Neri.** 1997. Posttransplantation cutaneous B-cell lymphoma with monoclonal Epstein-Barr virus infection, responding to acyclovir and reduction in immunosuppression. *J Heart Lung Transplant.* **16**:964-8.
109. **Naesens, L., and E. De Clercq.** 2001. Recent developments in herpesvirus therapy. *Herpes.* **8**:12-6.
110. **Neyts, J., and E. De Clercq.** 1994. Mechanism of action of acyclic nucleoside phosphonates against herpes virus replication. *Biochem Pharmacol.* **47**:39-41.

111. **Neyts, J., L. Naesens, C. Ying, L. De Bolle, and E. De Clercq.** 2001. Anti-herpesvirus activity of (1'S,2'R)-9-[[1',2'-bis(hydroxymethyl)-cycloprop-1'-yl]methyl] x guanine (A-5021) in vitro and in vivo. *Antiviral Res.* **49**:115-20.
112. **Niedobitek, G., A. Agathangelou, N. Steven, and L. S. Young.** 2000. Epstein-Barr virus (EBV) in infectious mononucleosis: detection of the virus in tonsillar B lymphocytes but not in desquamated oropharyngeal epithelial cells. *Mol Pathol.* **53**:37-42.
113. **Nyormoi, O., D. A. Thorley-Lawson, J. Elkington, and J. L. Strominger.** 1976. Differential effect of phosphonoacetic acid on the expression of Epstein-Barr viral antigens and virus production. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **73**:1745-8.
114. **Oberg, B.** 1989. Antiviral effects of phosphonoformate (PFA, foscarnet sodium). *Pharmacol Ther.* **40**:213-85.
115. **Oertel, S. H., M. S. Ruhnke, I. Anagnostopoulos, A. A. Kahl, A. F. Frewer, W. O. Bechstein, M. W. Hummel, and H. B. Riess.** 1999. Treatment of Epstein-Barr virus-induced posttransplantation lymphoproliferative disorder with foscarnet alone in an adult after simultaneous heart and renal transplantation. *Transplantation.* **67**:765-7.
116. **Oettle, H., F. Wilborn, C. A. Schmidt, and W. Siegert.** 1993. Treatment with ganciclovir and Ig for acute Epstein-Barr virus infection after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood.* **82**:2257-8.
117. **Okano, M., N. Fukamiya, K. Tagahara, H. Tokuda, A. Iwashima, H. Nishino, and K. H. Lee.** 1995. Inhibitory effects of quassinoids on Epstein-Barr virus activation. *Cancer Lett.* **94**:139-46.
118. **Pagano, J. S., J. W. Sixbey, and J. C. Lin.** 1983. Acyclovir and Epstein-Barr virus infection. *J Antimicrob Chemother.* **12**:113-21.

119. **Pan, Y. R., C. Y. Fang, Y. S. Chang, and H. Y. Chang.** 2005. Analysis of Epstein-Barr virus gene expression upon phorbol ester and hydroxyurea treatment by real-time quantitative PCR. *Arch Virol.* **150**:755-70. Epub 2004 Nov 18.
120. **Pannuti, C. S., R. P. Carvalho, A. S. Evans, L. C. Cenabre, V. Amato Neto, M. Camargo, M. J. Angelo, and S. Takimoto.** 1980. A prospective clinical study of the mononucleosis syndrome in a developing country. *Int J Epidemiol.* **9**:349-53.
121. **Pereira, M. S., A. M. Field, J. M. Blake, F. G. Rodgers, L. A. Bailey, and J. R. Davies.** 1972. Evidence for oral excretion of E.B. virus in infectious mononucleosis. *Lancet.* **1**:710-1.
122. **Perkkio, M., P. Riikonen, R. Seuri, and M. Vornanen.** 1999. Successful treatment of monoclonal, aggressive Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disorder in a child with acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol.* **32**:447-9.
123. **Pfleger, A., E. Eber, H. Popper, and M. S. Zach.** 2000. Chronic interstitial lung disease due to Epstein-Barr virus infection in two infants. *Eur Respir J.* **15**:803-6.
124. **Pirsch, J. D., R. J. Stratta, H. W. Sollinger, G. R. Hafez, A. M. D'Alessandro, M. Kalayoglu, and F. O. Belzer.** 1989. Treatment of severe Epstein-Barr virus-induced lymphoproliferative syndrome with ganciclovir: two cases after solid organ transplantation. *Am J Med.* **86**:241-4.
125. **Pitot, H. C., and Y. P. Dragan.** 1991. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *Faseb J.* **5**:2280-6.
126. **Prachova, K., J. Roubal, V. Vonka, B. Brichacek, and M. Reifova.** 1983. Induction of Epstein-Barr virus antigens and DNA-polymerase activities in P3HR-1 cell line and its subline passaged in the presence of phosphonoformate. *Acta Virol.* **27**:329-36.

127. **Purtilo, D. T., C. K. Cassel, J. P. Yang, and R. Harper.** 1975. X-linked recessive progressive combined variable immunodeficiency (Duncan's disease). *Lancet*. **1**:935-40.
128. **Qiu, Y. L., A. Hempel, N. Camerman, A. Camerman, F. Geiser, R. G. Ptak, J. M. Breitenbach, T. Kira, L. Li, E. Gullen, Y. C. Cheng, J. C. Drach, and J. Zemlicka.** 1998. (R)-(-)- and (S)-(+)-Synadenol: synthesis, absolute configuration, and enantioselectivity of antiviral effect. *J Med Chem*. **41**:5257-64.
129. **Qiu, Y. L., R. G. Ptak, J. M. Breitenbach, J. S. Lin, Y. C. Cheng, E. R. Kern, J. C. Drach, and J. Zemlicka.** 1998. (Z)- and (E)-2-(hydroxymethylcyclopropylidene)-methylpurines and pyrimidines as antiviral agents. *Antivir Chem Chemother*. **9**:341-52.
130. **Raab-Traub, N., and K. Flynn.** 1986. The structure of the termini of the Epstein-Barr virus as a marker of clonal cellular proliferation. *Cell*. **47**:883-9.
131. **Rahman, S., N. Fukamiya, N. Ohno, H. Tokuda, H. Nishino, K. Tagahara, K. H. Lee, and M. Okano.** 1997. Inhibitory effects of quassinoid derivatives on Epstein-Barr virus early antigen activation. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. **45**:675-7.
132. **Rajappan, V., S. W. Schneller, S. L. Williams, and E. R. Kern.** 2002. The enantiomers of carbocyclic 5'-norguanosine: activity towards Epstein-Barr virus. *Bioorg Med Chem*. **10**:883-6.
133. **Rea, T. D., J. E. Russo, W. Katon, R. L. Ashley, and D. S. Buchwald.** 2001. Prospective study of the natural history of infectious mononucleosis caused by Epstein-Barr virus. *J Am Board Fam Pract*. **14**:234-42.
134. **Reusser, P.** 1996. Herpesvirus resistance to antiviral drugs: a review of the mechanisms, clinical importance and therapeutic options. *J Hosp Infect*. **33**:235-48.

135. **Rosenfeld, E., B. Salimi, M. R. O'Gorman, C. Lawyer, and B. Z. Katz.** 1996. Potential in vitro activity of Kutapressin against Epstein-Barr virus. *In Vivo*. **10**:313-8.
136. **Sacau, E. P., A. Estevez-Braun, A. G. Ravelo, E. A. Ferro, H. Tokuda, T. Mukainaka, and H. Nishino.** 2003. Inhibitory effects of lapachol derivatives on epstein-barr virus activation. *Bioorg Med Chem*. **11**:483-8.
137. **Sawyer, R. N., A. S. Evans, J. C. Niederman, and R. W. McCollum.** 1971. Prospective studies of a group of Yale University freshmen. I. Occurrence of infectious mononucleosis. *J Infect Dis*. **123**:263-70.
138. **Sayos, J., C. Wu, M. Morra, N. Wang, X. Zhang, D. Allen, S. van Schaik, L. Notarangelo, R. Geha, M. G. Roncarolo, H. Oettgen, J. E. De Vries, G. Aversa, and C. Terhorst.** 1998. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature*. **395**:462-9.
139. **Schmidt, W., I. Anagnostopoulos, and H. Scherubl.** 2000. Virostatic therapy for advanced lymphoproliferation associated with the Epstein-Barr virus in an HIV-infected patient. *N Engl J Med*. **342**:440-1.
140. **Schneider, U., M. Ruhnke, H. J. Delecluse, H. Stein, and D. Huhn.** 2000. Regression of Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders in patients with acquired immunodeficiency syndrome during therapy with foscarnet. *Ann Hematol*. **79**:214-6.
141. **Schooley, R. T., R. W. Carey, G. Miller, W. Henle, R. Eastman, E. J. Mark, K. Kenyon, E. O. Wheeler, and R. H. Rubin.** 1986. Chronic Epstein-Barr virus infection associated with fever and interstitial pneumonitis. Clinical and serologic features and response to antiviral chemotherapy. *Ann Intern Med*. **104**:636-43.



142. **Schramm, C., J. F. Schlaak, and P. R. Galle.** 2000. Rapid development of Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease after cessation of foscarnet therapy in an HIV-infected patient. *Int J STD AIDS.* **11**:609-10.
143. **Sergerie, Y., and G. Boivin.** 2003. Evaluation of susceptibility of human herpesvirus 8 to antiviral drugs by quantitative real-time PCR. *J Clin Microbiol.* **41**:3897-900.
144. **Sixbey, J. W., S. M. Lemon, and J. S. Pagano.** 1986. A second site for Epstein-Barr virus shedding: the uterine cervix. *Lancet.* **2**:1122-4.
145. **Sixbey, J. W., J. G. Nedrud, N. Raab-Traub, R. A. Hanes, and J. S. Pagano.** 1984. Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *N Engl J Med.* **310**:1225-30.
146. **Smee, D. F., J. C. Martin, J. P. Verheyden, and T. R. Matthews.** 1983. Anti-herpesvirus activity of the acyclic nucleoside 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine. *Antimicrob Agents Chemother.* **23**:676-82.
147. **Smith, K. O., K. S. Galloway, W. L. Kennell, K. K. Ogilvie, and B. K. Radatus.** 1982. A new nucleoside analog, 9-[[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy]methyl]guanine, highly active in vitro against herpes simplex virus types 1 and 2. *Antimicrob Agents Chemother.* **22**:55-61.
148. **Starzl, T. E., M. A. Nalesnik, K. A. Porter, M. Ho, S. Iwatsuki, B. P. Griffith, J. T. Rosenthal, T. R. Hakala, B. W. Shaw, Jr., R. L. Hardesty, and et al.** 1984. Reversibility of lymphomas and lymphoproliferative lesions developing under cyclosporin-steroid therapy. *Lancet.* **1**:583-7.
149. **Stranska, R., A. M. van Loon, M. Polman, and R. Schuurman.** 2002. Application of real-time PCR for determination of antiviral drug susceptibility of herpes simplex virus. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**:2943-7.

150. **Sullivan, J. L., K. S. Byron, F. E. Brewster, K. Sakamoto, J. E. Shaw, and J. S. Pagano.** 1982. Treatment of life-threatening Epstein-Barr virus infection with acyclovir. *Am J Med.* **73**:262-6.
151. **Summers, W. C., and G. Klein.** 1976. Inhibition of Epstein-Barr virus DNA synthesis and late gene expression by phosphonoacetic acid. *J Virol.* **18**:151-5.
152. **Swinnen, L. J., G. M. Mullen, T. J. Carr, M. R. Costanzo, and R. I. Fisher.** 1995. Aggressive treatment for postcardiac transplant lymphoproliferation. *Blood.* **86**:3333-40.
153. **Takasaki, M., T. Konoshima, T. Shingu, H. Tokuda, H. Nishino, A. Iwashima, and M. Kozuka.** 1990. Structures of euglobal-G1, -G2, and -G3 from *Eucalyptus grandis*, three new inhibitors of Epstein-Barr virus activation. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* **38**:1444-6.
154. **Takasaki, M., T. Konoshima, H. Tokuda, K. Masuda, Y. Arai, K. Shiojima, and H. Ageta.** 1999. Anti-carcinogenic activity of *Taraxacum* plant. II. *Biol Pharm Bull.* **22**:606-10.
155. **Takemura, Y., M. Ju-ichi, C. Ito, H. Furukawa, and H. Tokuda.** 1995. Studies on the inhibitory effects of some acridone alkaloids on Epstein-Barr virus activation. *Planta Med.* **61**:366-8.
156. **Tattevin, P., A. C. Cremieux, D. Descamps, and C. Carbon.** 2002. Transfusion-related infectious mononucleosis. *Scand J Infect Dis.* **34**:777-8.
157. **Thorley-Lawson, D., and J. L. Strominger.** 1976. Transformation of human lymphocytes by Epstein-Barr virus is inhibited by phosphonoacetic acid. *Nature.* **263**:332-4.
158. **Torre, D., and R. Tambini.** 1999. Acyclovir for treatment of infectious mononucleosis: a meta-analysis. *Scand J Infect Dis.* **31**:543-7.

159. **Tung, P. P., and W. C. Summers.** 1994. Substrate specificity of Epstein-Barr virus thymidine kinase. *Antimicrob Agents Chemother.* **38**:2175-9.
160. **van Baarle, D., E. Hovenkamp, N. H. Dukers, N. Renwick, M. J. Kersten, J. Goudsmit, R. A. Coutinho, F. Miedema, and M. H. van Oers.** 2000. High prevalence of Epstein-Barr virus type 2 among homosexual men is caused by sexual transmission. *J Infect Dis.* **181**:2045-9. Epub 2000 May 24.
161. **van der Horst, C., J. Joncas, G. Ahronheim, N. Gustafson, G. Stein, M. Gurwith, G. Fleisher, J. Sullivan, J. Sixbey, S. Roland, and et al.** 1991. Lack of effect of peroral acyclovir for the treatment of acute infectious mononucleosis. *J Infect Dis.* **164**:788-92.
162. **van der Horst, C. M., J. C. Lin, N. Raab-Traub, M. C. Smith, and J. S. Pagano.** 1987. Differential effects of acyclovir and 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine on herpes simplex virus and Epstein-Barr virus in a dually infected human lymphoblastoid cell line. *J Virol.* **61**:607-10.
163. **Williams, S. L., C. B. Hartline, N. L. Kushner, E. A. Harden, D. J. Bidanset, J. C. Drach, L. B. Townsend, M. R. Underwood, K. K. Biron, and E. R. Kern.** 2003. In vitro activities of benzimidazole D- and L-ribonucleosides against herpesviruses. *Antimicrob Agents Chemother.* **47**:2186-92.
164. **Yang, M., and S. W. Schneller.** 2005. Amino substituted derivatives of 5'-amino-5'-deoxy-5'-noraristeromycin. *Bioorg Med Chem.* **13**:877-82.
165. **Yao, G. Q., S. Grill, W. Egan, and Y. C. Cheng.** 1993. Potent inhibition of Epstein-Barr virus by phosphorothioate oligodeoxynucleotides without sequence specification. *Antimicrob Agents Chemother.* **37**:1420-5.

166. **Yao, G. Q., S. H. Liu, E. Chou, M. Kukhanova, C. K. Chu, and Y. C. Cheng.** 1996. Inhibition of Epstein-Barr virus replication by a novel L-nucleoside, 2'-fluoro-5-methyl-beta-L-arabinofuranosyluracil. *Biochem Pharmacol.* **51**:941-7.
167. **Yao, Q. Y., P. Ogan, M. Rowe, M. Wood, and A. B. Rickinson.** 1989. The Epstein-Barr virus:host balance in acute infectious mononucleosis patients receiving acyclovir anti-viral therapy. *Int J Cancer.* **43**:61-6.
168. **Yeo, H., Y. Li, L. Fu, J. L. Zhu, E. A. Gullen, G. E. Dutschman, Y. Lee, R. Chung, E. S. Huang, D. J. Austin, and Y. C. Cheng.** 2005. Synthesis and antiviral activity of helioxanthin analogues. *J Med Chem.* **48**:534-46.
169. **Young, L., C. Alfieri, K. Hennessy, H. Evans, C. O'Hara, K. C. Anderson, J. Ritz, R. S. Shapiro, A. Rickinson, E. Kieff, and et al.** 1989. Expression of Epstein-Barr virus transformation-associated genes in tissues of patients with EBV lymphoproliferative disease. *N Engl J Med.* **321**:1080-5.
170. **Zacny, V. L., E. Gershburg, M. G. Davis, K. K. Biron, and J. S. Pagano.** 1999. Inhibition of Epstein-Barr virus replication by a benzimidazole L-riboside: novel antiviral mechanism of 5, 6-dichloro-2-(isopropylamino)-1-beta-L-ribofuranosyl-1H-benzimidazole. *J Virol.* **73**:7271-7.
171. **Zhou, S., E. R. Kern, E. Gullen, Y. C. Cheng, J. C. Drach, S. Matsumi, H. Mitsuya, and J. Zemlicka.** 2004. (Z)- and (E)-[2-Fluoro-2-(hydroxymethyl)cyclopropylidene]methylpurines and -pyrimidines, a new class of methylenecyclopropane analogues of nucleosides: synthesis and antiviral activity. *J Med Chem.* **47**:6964-72.
172. **zur Hausen, H., H. Schulte-Holthausen, G. Klein, W. Henle, G. Henle, P. Clifford, and L. Santesson.** 1970. EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature.* **228**:1056-8.

**Articles publiés ou soumis**

**Article n° 1.**

**Le travail expérimental présenté dans cette thèse a été soumis à la revue**

**Journal of Antimicrobial Chemotherapy sous la forme suivante**

**Article n° 2.**

**Dans le cadre de la mise au point de la RT-PCR en temps réel pour la  
détection des ARNms EBV ; cet article fait état de ma participation à ce  
sujet**

**Annexe : Article n° 3.**

**Participation au travail du Laboratoire de Virologie sur le suivi des cas de  
mononucléose infectieuse**



## Résumé

Un système d'évaluation *in vitro* de l'activité de médicaments anti-EBV a été mis au point en utilisant la PCR/RT-PCR quantitative en temps réel. Trois composés appartenant à différentes classes antivirales ont été testés : un analogue nucléosidique, le ganciclovir (GCV), un analogue nucléotidique, le cidofovir (HPMPC), et un analogue du pyrophosphate, le foscarnet (PFA). Après 7 jours de traitement des cellules P3HR-1 productrices de virions, les concentrations inhibant de 50 % la réplication de l'ADN viral sont respectivement de 0.28 µg/mL, 0.29 µg/mL et 13.6 µg/mL pour le GCV, le HPMPC et le PFA. L'expression de l'ARNm de la glycoprotéine tardive gp350/220 est réduite de 79 à 89 % après 4 jours. Nous avons aussi démontré la spécificité de l'effet antiviral en mesurant les taux d'ADN ( $\beta$ -globine) ou d'ARN (hPBGD) cellulaires. En conclusion, notre système permet l'évaluation de l'effet antiviral contre l'EBV de façon quantitative, simple et précise.

Mots clés : EBV, PCR, antiviral, traitement, maladie

## Summary

A system for the *in vitro* evaluation of the anti-EBV drugs activity was developed using a quantitative real-time PCR/RT-PCR. Three compounds, belonging to different antiviral classes, were tested: a nucleoside analogue, ganciclovir (GCV), a nucleotide analogue, cidofovir (HPMPC), and a pyrophosphate analogue, foscarnet (PFA). After a 7-day treatment of P3HR-1 virion-producing cells, the calculated concentrations inhibiting viral DNA replication by 50 % were 0.28 µg/mL, 0.29 µg/mL and 13.6 µg/mL for GCV, HPMPC and PFA respectively. The expression of the late viral glycoprotein gp350/220 mRNA, was reduced by 79 to 89 % after 4 days. We have also shown the specificity of the antiviral effect by measuring the amount of cellular DNA ( $\beta$ -globin) or RNA (hPBGD).

In conclusion, our system permits the evaluation of the antiviral effect against EBV in a quantitative, simple and accurate manner.

Keywords: EBV, PCR, antiviral, treatment, disease