

Projet CS-17 : Étude de l'activation de la réplication de l'EBV en mesurant le facteur de transcription circulant du virus d'Epstein-Barr (ZEBRA), en tant que prédicteur des événements péjoratifs chez les patients HSC (syndromes viraux, GvHD, PTLD).

Dans le cadre de ses missions, CRYOSTEM met à la disposition des scientifiques du monde entier, une collection de ressources biologiques unique en Europe pour accélérer le développement de projets de recherche et d'innovation médicale sur la greffe de moelle osseuse et ses complications.

Entretien avec le Dr Emmanuel DROUET, porteur du projet de recherche CS-17 : “Étude de l'activation de la réplication de l'EBV en mesurant le facteur de transcription circulant du virus d'Epstein-Barr (ZEBRA), en tant que prédicteur des événements péjoratifs chez les patients HSC (syndromes viraux, GvHD, PTLD)”¹

Question 1 : pouvez-vous vous présenter et nous parler de votre projet de recherche ?

J'enseigne la microbiologie pour des étudiants de la Faculté de pharmacie et de la Faculté des Sciences de Grenoble (UGA, [Université Grenoble Alpes](#)). Rattaché au [Département de Biologie Structurale](#) de l'Unité Mixte de Recherche (UMR UGA-CNRS), je dirige une équipe sur les virus

¹ Présentation du projet CS-17 : <https://www.cryostem.org/fr/recherche/projets-soutenus/>

persistants chez l'homme (virus à ARN et à ADN) et l'équilibre avec le système immunitaire de l'hôte.

L'essentiel de nos travaux de recherche sont réalisés depuis 10 ans dans le cadre de notre affiliation avec le CHU de Grenoble; c'est dans ces mêmes conditions qu'ont été publiés en 2022 dans la revue *Pathogens*,² les résultats d'une étude menée en collaboration avec les Centres hospitaliers de Strasbourg et de Nantes, l'Association CRYOSTEM et le Département de Microbiologie, UMC Utrecht localisé aux Pays-Bas .

Nous travaillons sur le virus Epstein–Barr (EBV) depuis le début des années 90, et plus particulièrement sur sa physiopathologie associée au cycle lytique du virus. En préambule, il est important de rappeler que, comme tous les Herpèsvirus, l'EBV existe sous deux formes : une forme latente relativement neutre et une forme lytique où l'on observe la production de virions et donc d'un grand répertoire de protéines par la cellule infectée. J'explique souvent à mes élèves qu'en phase de latence, le virus restreint son expression à une dizaine de protéines, un chiffre multiplié par 8 en phase lytique lorsqu'il exprime l'ensemble de son répertoire génétique. Ces deux formes sont étroitement liées à un stade précis de la pathologie : l'induction de la transformation cellulaire lors du cycle latent et progression tumorale lors du cycle lytique.

Une autre caractéristique très problématique de l'EBV, c'est qu'il est persistant : une fois contracté dans la petite enfance ou dans l'adolescence, il est impossible de l'éradiquer.

Question 2 : existe-t-il un vaccin contre l'EBV ?

L'EBV est connu depuis les années 1960, les premiers essais vaccinaux ont débuté très vite après la découverte du virus. Aujourd'hui, il existe de nombreux essais vaccinaux en cours mais aucun vaccin n'est efficace contre les maladies associées à l'EBV. L'une des raisons qui peut expliquer cette situation, est la difficulté rencontrée par les chercheurs et les cliniciens à cibler la pathologie qui doit être contrôlée, plus précisément les marqueurs de l'expression virale qui ne sont pas les mêmes selon qu'il s'agisse d'une maladie inflammatoire, d'une maladie auto-immune ou d'un cancer. Nous savons protéger les patients contre la sévérité de la maladie, mais nous n'avons rien trouvé de concluant pour contrôler l'activité du virus dans l'organisme.

Question 3 : par quelle approche scientifique comptez-vous limiter la progression du virus ?

Le point de départ à toute démarche en vaccinologie est de cibler les protéines d'enveloppe du virus qui lui servent à s'attacher aux cellules cibles. Or, il existe 6 protéines d'enveloppe dans le

² *Pathogens* 2022, 11(8), 928; <https://doi.org/10.3390/pathogens11080928>

cas d'EBV dont certaines facilitent l'entrée du virus dans le lymphocyte B par exemple, mais il en existe d'autres dans les cellules épithéliales, ce qui complexifie la stratégie vaccinale³.

“Nos travaux de recherche ciblent une protéine impliquée dans le cycle de réplication du virus en forme lytique.”

Il est techniquement très simple de répliquer le virus *in vitro* dans des lignées cellulaires particulières qui le maintiendront dans sa forme de latence. Si nous stimulons l'activation de la réplication virale lytique et du cycle lytique de l'EBV, 100% de la population cellulaire se retrouve alors en cycle lytique. Pour activer cette transformation, nous nous servons de la protéine ZEBRA comme d'un interrupteur pour passer d'une forme à l'autre.

En conditions réelles ou *in vivo*, nos observations sont beaucoup plus complexes. En effet, il est fréquent d'observer au même moment, chez tous les individus, la présence de populations de cellules en phase de latence, au niveau des lymphocytes B mémoires circulants dans le sang ou présents dans les ganglions lymphoïdes, et celle de populations de cellules infectées par des virus en phase lytique au niveau des amygdales par exemple.

“Dans le cas de patients pris en charge avec des traitements immunosuppresseurs, comme dans la greffe de moelle, les risques de développer une forme de lymphome sont importants.”

Il faut rappeler que l'EBV infecte de 95 à 99 % de la population mondiale. Chez les personnes affectées, on observe la présence des deux formes du virus décrites plus haut. Ce que l'on peut ajouter ici, c'est que dans sa forme latente le virus exprime des oncoprotéines, c'est-à-dire des protéines qui ont un pouvoir transformant (oncogène) : ces oncoprotéines vont transformer les lymphocytes B “hôtes” en lymphoblastes exprimant un petit répertoire de protéines (une dizaine d'antigènes nucléaires et membranaires) qui seront heureusement contrôlées par l'immunité.

Dans le cas d'une greffe de moelle osseuse par contre, pour les patients traités avec des immunosuppresseurs, la situation est plus problématique car les risques de développer un lymphome sont alors très importants.

Question 4 : quel est l'intérêt de cibler la protéine ZEBRA ?

“ZEBRA est une protéine très précoce jouant comme un facteur de transcription. Elle est considérée comme un facteur de virulence, démontré de par son rôle dans l'expression de gènes stratégiques, mais également par sa présence dans le sang circulant.”

³ Drouet, Emmanuel. 2021. 'Epstein-Barr Virus: Should We Still Invest in Vaccines or Focus on Predictive Tests?' Infectious Diseases. IntechOpen. doi:10.5772/intechopen.101094.

ZEBRA est un facteur de transcription impliqué dans la progression tumorale. Nous avons pu montrer dans nos travaux récents⁴ que cette protéine ne restait pas dans les cellules, une situation qui est assez semblable à celle observée dans le cas du virus HIV (protéine Tat) : Tat et ZEBRA sont des facteurs de transcription viraux ayant la capacité d'être excrétés dans le sang circulant où ils agissent comme une toxine (protéines toxoides). Il est important de noter qu'il devient alors possible de les doser, ce qui en fait des biomarqueurs d'intérêt comme nous le verrons plus loin⁵.

ZEBRA suit exactement ce schéma. En traversant les membranes cellulaires sans être dégradée, elle peut pénétrer dans le cytoplasme des lymphocytes B ou des cellules épithéliales avant de traverser la membrane nucléaire pour activer des gènes stratégiques : il s'agit des gènes qui codent pour les cytokines IL-6 ou IL-10 au pouvoir B lymphotrope, mais aussi pour des métalloprotéinases, autant de facteurs qui vont renforcer l'immunosuppression chez les transplantés et entraîner l'angiogenèse des tumeurs.

« C'est un peu comme si ZEBRA préparait le terrain pour un pool de lymphocyte B en facilitant leur infection par le virus . »

Décrite comme une protéine très précoce du cycle lytique, il serait intéressant de pouvoir utiliser ZEBRA soit comme cible thérapeutique^{6 7} pour bloquer la progression du virus, soit comme un biomarqueur prédictif dans l'évaluation du risque de survenue de complications chez les patients.

Question 5 : quels bénéfices avez-vous tirés des ressources biologiques mises à disposition par CRYOSTEM ?

⁴ Germini D, Sall FB, Shmakova A, Wiels J, Dokudovskaya S, Drouet E, Vassetzky Y. Oncogenic Properties of the EBV ZEBRA Protein. *Cancers (Basel)*. 2020 Jun 5;12(6):1479. doi: 10.3390/cancers12061479. PMID: 32517128; PMCID: PMC7352903.

⁵ Habib M, Buisson M, Lupo J, Agbalika F, Socié G, Germi R, Baccard M, Imbert-Marcille BM, Dantal J, Morand P, Drouet E. Lytic EBV infection investigated by detection of Soluble Epstein-Barr virus ZEBRA in the serum of patients with PTLD. *Sci Rep*. 2017 Sep 5;7(1):10479. doi: 10.1038/s41598-017-09798-7. PMID: 28874674; PMCID: PMC5585268.

⁶ Bilger A, Plowshay J, Ma S, Nawandar D, Barlow EA, Romero-Masters JC, Bristol JA, Li Z, Tsai MH, Delecluse HJ, Kenney SC. Leflunomide/teriflunomide inhibit Epstein-Barr virus (EBV)- induced lymphoproliferative disease and lytic viral replication. *Oncotarget*. 2017 Jul 4;8(27):44266-44280. doi: 10.18632/oncotarget.17863. PMID: 28574826; PMCID: PMC5546479.

⁷ Drouet, Emmanuel. 2020. 'The Role of the Epstein-Barr Virus Lytic Cycle in Tumor Progression: Consequences in Diagnosis and Therapy'. *Human Herpesvirus Infection - Biological Features, Transmission, Symptoms, Diagnosis and Treatment*. IntechOpen. doi:10.5772/intechopen.88607.

C'est par l'intermédiaire des médecins hématologues du service de greffe de l'Hôpital Saint-Louis, les Professeurs Gérard Socié et Régis Peffault de Latour, spécialistes de la GvH, que nous avons eu accès à la collection de CRYOSTEM. Dans un premier temps, nous avons testé les caractéristiques de la protéine ZEBRA grâce à une technique développée sur l'utilisation de sérum puis de plasma. Nous souhaitons désormais pouvoir mener les mêmes travaux sur du sang total et des tests bandelettes

Grâce à ces ressources biologiques, nous avons entrepris de valider nos hypothèses sur l'intérêt de ce biomarqueur en mobilisant un réseau international pour accélérer les développements d'un nouveau candidat médicament. Nous souhaitons clairement proposer une alternative robuste aux pratiques actuelles des cliniciens qui s'appuient essentiellement sur l'étude de la charge virale pour prévenir les lymphomes dans le cadre du suivi d'une greffe de moelle osseuse par exemple.

Dans la plupart des cas, cette démarche consiste à effectuer une PCR (pour Polymerase Chain Reaction en anglais) sur du sang total du patient pour détecter de l'ADN d'EBV présent dans les lymphocytes B mémoires. Or, cette donnée, comme nous l'avons expliqué précédemment, représente une valeur prédictive assez faible car l'EBV est un virus persistant affectant de 95 à 99 % de la population mondiale. De plus, comme cela a été noté par d'autres équipes de recherche⁸, nous avons constaté que certains patients greffés pouvaient développer des formes de lymphomes graves, voire fatales, en présentant des charges virales indétectables, alors que d'autres patients présentant des charges virales de plus de 100 000 copies par millilitre ne présentaient aucun symptôme. Si en moyenne la charge virale des populations de patients asymptomatiques est basse, chez les patients greffés, la situation est plus complexe. Dans le contexte d'une greffe de moelle osseuse, les charges virales sont généralement corrélées dans 60 à 70 % des cas avec la survenue d'un lymphome, alors que le dosage de la protéine ZEBRA semble beaucoup plus précis avec des corrélations de l'ordre de 95 %, voire davantage.

Il est également important de rappeler que l'utilisation du Rituximab⁹ comme traitement préventif du lymphome lors d'une augmentation de la charge virale chez le patient greffé, peut engendrer des situations dramatiques pour des individus qui ne sont pas forcément enclins à développer la maladie. Ce traitement peut entraîner des lymphopénies (avec hypogammaglobulinémies) et multiplie donc les risques de surinfection^{10 11}.

⁸ Oertel S, Trappe RU, Zeidler K, Babel N, Reinke P, Hummel M, et al. Epstein-Barr viral load in whole blood of adults with posttransplant lymphoproliferative disorder after solid organ transplantation does not correlate with clinical course. *Annals of Hematology*. 2006;85:478-484

⁹Rituximab - https://www.has-sante.fr/jcms/p_3145051/fr/mabthera-rituximab

¹⁰ Pavanello, F.; Zucca, E.; Ghielmini, M. Rituximab: 13 Open Questions after 20 years of Clinical Use. *Cancer Treat Rev*. **2017**, 53, 38–46.

¹¹ Barmettler, S.; Ong, M.-S.; Farmer, J.R.; Choi, H.; Walter, J. Association of Immunoglobulin Levels, Infectious Risk, and Mortality With Rituximab and Hypogammaglobulinemia. *JAMA Netw. Open* **2018**,

Afin de démontrer l'intérêt de ZEBRA comme biomarqueur prédictif, nous avons mené une étude ancillaire avec des échantillons de patients atteints de GvH dont nous avons partagé les résultats lors du congrès EBV en 2020¹². Nous publierons ces données dans les prochains mois, mais nous avons déjà pu établir des corrélations entre le dosage de cette protéine ZEBRA et la survenue de lymphomes tardifs après la greffe d'organes solides.

Emmanuel DROUET

Université Grenoble-Alpes

Pharmacien biologiste, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Grenoble-Alpes (UGA)

¹² Lupo J et a. (2021) Prognostic value of the soluble ZEBRA (Zta) protein in transplant patients with PTLD and Graft versus Host Disease (GVHD). 19th international Symposium on EBV and associated diseases. Tokyo, (Japan)

A propos de CRYOSTEM

Lancé dans le cadre des Investissements d'Avenir par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR), inscrit au cœur du Plan Cancer du Gouvernement Français et soutenu par l'Institut National Contre le Cancer (INCa), le projet CRYOSTEM a été initié en 2011 sous l'égide la Société Francophone de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire (SFGM-TC) afin d'accélérer la recherche sur les complications de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (HSCT pour Hematopoietic Stem Cell Transplantation en anglais) ou greffe de moelle osseuse. CRYOSTEM réunit aujourd'hui l'ensemble des unités de greffe françaises, 28 Centres de Ressources Biologiques (CRB) ainsi que plus de 400 acteurs français de la recherche et des soins dans le domaine des maladies graves du sang.