

N° D'ORDRE : 807

M 03

THESE

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE PAUL SABATIER DE TOULOUSE (SCIENCES)

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR D'ETAT - SCIENCES

Spécialité : Virologie

PAR

Maurice DALENS

LE VIRUS D'EPSTEIN-BARR EN PATHOLOGIE HUMAINE

ETUDE DE QUELQUES INTER-RELATIONS VIRUS - CELLULE HOTE



Soutenu le 27 Avril 1978 devant la Commission d'Examen

MM. J. ASSELINEAU
G. DE THE
P. BURTIN
M. SICARD
Mme L. ENJALBERT

Président

Examineurs

- SOMMAIRE -

ABREVIATIONS	1
INTRODUCTION	2
- Le virus d'Epstein-Barr (Virus-EB)	
- Les orientations de recherche choisies	
TECHNIQUES	7
P R E M I E R E P A R T I E :	
ETIOPATHOLOGIE DU VIRUS EB	23
CHAPITRE I - INVESTIGATION SERO-EPIDEMIOLOGIQUE	
A - VIRUS-EB ET MONONUCLEOSE INFECTIEUSE	25
- La mononucléose infectieuse (MNI)	
- La réaction de Paul Bunnell et Davidsohn	
A-1 Les anticorps anti-VCA et la MNI	27
- Recherche des anticorps anti-virus EB par Immunofluorescence	
A-1a Distribution des anticorps anti-VCA dans la population normale	29
A-1b Distribution des anticorps anti-VCA chez les sujets présentant des syndromes mononucléosiques	31
A-1b1 Analyse des cas ayant un PBD (+)	32
1) avec AC-EB	
2) sans AC-EB	
A-1b2 Analyse des cas ayant un PBD(-) avec des AC-EB	40
1) clinique en faveur de la MNI	
2) syndromes post-transfusionnels	
A-2 Conclusions	40

B - LES AC-EB DANS LES SYNDROMES LYMPHOPROLIFERATIFS MALINS	43
B-1 Les AC-VCA dans la leucémie lymphoïde chronique	45
B-2 Les AC-VCA dans la maladie de Hodgkin	47
B-3 Conclusions	47
C - NOTION DE PROFIL SEROLOGIQUE DES INFECTIONS A VIRUS-EB	50
C-1 Profil sérologique d'un groupe témoin de sujets sains ..	53
C-2 Profil sérologique dans le cas de MNI typiques à PBD (+)	53
C-3 Profil sérologique dans quelques cas à PBD (+) sans MNI.	58
C-4 Profil sérologique dans les syndromes mononucléosiques post-transfusionnels	58
C-5 Profil sérologique dans les syndromes lymphoprolifératifs malins	58
D - DISCUSSION GENERALE - CONCLUSIONS	62
D-1 Profil de l'infection primaire à virus-EB	62
- dans la MNI	
- hors MNI	
D-2 Profil de la réponse secondaire :	64
- sans réinfection : syndromes post-perfusionnels.	
- avec infection : syndromes lymphoprolifératifs malins.	
D-3 Conclusions	66
 CHAPITRE II - INVESTIGATION EXPERIMENTALE	
A - LE VIRUS-EB EST-IL UN VIRUS ONCOGENE ?	68
A-1 Choix du modèle expérimental	
A-2 Onco-tumorigénicité du virus-EB chez le singe Saïmiri	
A-2a Sources du virus-EB	

A-2b	Protocole d'inoculation	
A-2c	Résultats	
A-3	Conclusions	76

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DE QUELQUES INTER-RELATIONS VIRUS - EB CELLULE - HOTE	81
--	----

CHAPITRE I - VIRUS-EB ET LIGNEES LYMPHOIDES

A - CARACTERISATION DES LIGNEES LYMPHOIDES TRANSFORMEES PAR LE VIRUS-EB	83
---	----

A-1	Introduction :Pouvoir transformant du virus-EB et Ag viro-induits	83
A-2	Transformation des cellules lymphoïdes	86
A-2a	Méthodologie	
A-2b	Résultats	
A-3	Conclusions	94

B - VIRUS EB et LYMPHOTROPISME "B"	97
--	----

B-1	Introduction	97
B-2	Hybride somatique cellulaire "B" x "T" lymphocytes	98

CHAPITRE II -

A - ORIGINE CELLULAIRE DES LIGNEES LYMPHOBLASTOIDES SPONTANEEES	104	
A-1	Introduction	105
A-1a	Immunosurveillance et cellule pré-néoplasique	
A-1b	Répression du génome viral et infection latente	

A-2	Origine cellulaire des lignées lymphoïdes obtenues à partir de cultures mixtes de lymphocytes de sujets mononucléosiques, de sujets atteints de lymphome de Burkitt, ou de sujets sains, avec des lymphocytes de sang de cordon	108
A-2a	Méthodologie	
A-2b	Résultats	
A-3	Conclusions	113

T R O I S I E M E P A R T I E

EXPRESSION DES FONCTIONS VIRALES	115
--	-----

CHAPITRE I

A - LES DIVERS TYPES DE VIRUS EB

A-1	Introduction	117
A-2	Virus-EB type B95.8 et variant P3HR1	118
A-2a	Méthodologie	
A-2b	Résultats	
A-3	Conclusions	123

CHAPITRE II

A - ESSAI DE TRANSFECTION PAR LE DNA VIRAL D'EBV	125	
A-1	Introduction	126
A-2	Essai de transfection par DNA viral du virus B95.8	127
A-2a	Méthodologie	
A-2b	Résultats	
A-3	Conclusions	132

CHAPITRE III

A - EXPRESSION GENIQUE DES DEUX TYPES DE VIRUS-EB, B95.8 ET P3HR1 APRES UV-IRRADIATION	134
A-1 Méthodologie	
A-2 Résultats	
A-3 Conclusions	140
B - EXPRESSION DE LA FONCTION PRECOCE EA PAR LA SOUCHE P3HR1	143
B-1 Influence de la présence du génome viral-EB dans la cellule-cible	143
B-1a Méthodologie	
B-1b Résultats	
B-1c Conclusions	147
B-2 Influence de la quantité du génome viral-EB résidant dans la cellule cible	150
B-3 Influence de la capacité de réactivation de la cellule hôte	151
B-4 Existe-t-il différentes sortes de virus P3HR1 ?	151
C O N C L U S I O N G E N E R A L E	153

Figures hors texte et Planches Photo

BIBLIOGRAPHIE

La constatation d'une association très étroite entre la présence d'AC-EB et certaines maladies bénignes comme la mononucléose infectieuse, ou malignes comme le lymphome de Burkitt et le cancer du nasopharynx, a donné au virus-EB un intérêt majeur en pathologie humaine. Cet intérêt a été d'autant plus avivé que la famille des Herpès-virus, à laquelle appartient le virus-EB, possédait déjà des représentants dont le pouvoir oncogène avait été bien caractérisé : oncoDNAvirus de la maladie de Lucké chez la grenouille et de la maladie de Marek chez la poule. L'EBV apparaissait alors comme le premier virus humain à potentiel oncogène fortement probable. En outre, le pouvoir oncogène était par la suite clairement démontré chez d'autres virus de la famille des herpès (HSV et HVA chez le singe) ou seulement suspecté comme pour l'HSV - type 2 chez l'homme.

Pour tenter de comprendre la nature des relations du virus-EB avec son hôte, il est nécessaire d'une part, de connaître la réponse immunologique de l'hôte dans les infections à virus-EB, d'autre part, d'étudier la biologie du virus au cours d'infections expérimentales tant in-vitro sur les cellules cibles que in-vivo chez le singe.

Notre travail a suivi ces objectifs, puisque nous avons étudié le virus-EB sous trois aspects :

- l'EBV et son hôte ;
- l'EBV et la cellule cible ;
- l'EBV et son génome.

L ' E B V E T S O N H O T E

A) - INFECTION NATURELLE CHEZ L'HOMME

L'EBV infecte très largement la population humaine adulte. La séro-épidémiologie est en faveur d'une transmission horizontale du virus avec présence des AC-EB transmis passivement au nouveau-né, puis décroissance et éventuellement disparition de ces anticorps suivie de leur réapparition, consécutive à l'infection primaire par l'EBV. Le moment de cette infection primaire est très variable selon les groupes sociaux. Alors qu'une infection très précoce n'entraîne généralement pas de signes cliniques, l'infection du jeune adulte peut entraîner parfois l'apparition du syndrome de mononucléose infectieuse.

L'étude de l'apparition des divers types d'AC-EB dans les cas de MNI avec séroconversion en AC-EB a permis à Henlé de définir le profil type des AC-EB lors d'une infection primaire. Partant de ce profil d'infection primaire, nous avons mis en évidence deux points qui nous paraissent importants :

1°)- Malgré la prépondérance du virus-EB dans l'étiologie de la MNI, il n'existe pas une relation absolue à 100% entre MNI à PBD positifs et profil d'infection primaire par le virus-EB. La MNI n'est donc pas une entité sur le plan étiologique mais un syndrome pouvant relever d'autres causes que l'infection à virus-EB.

2°) - Nous avons caractérisé d'autres profils des AC-EB. Ces différents profils traduisent d'autres types de relation existant entre le virus EB et son hôte.

- infection persistante latente chez les sujets sains. Le profil des AC-EB se caractérise ici par l'absence des AC-EA et la présence des AC-NA à des taux résiduels.

- infection persistante active chez les sujets présentant un syndrome lymphoprolifératif malin. La réinfection active par le virus-EB, d'origine probablement endogène, se traduit par l'exacerbation de tous les types d'AC-EB et notamment des AC-EA, avec parfois même la réapparition des AC-VCA de type IgM. La moyenne d'âge assez élevée de ces patients et la longue persistance du taux de ces AC écartent l'éventualité d'une infection primaire.

- récurrence transitoire au cours de maladies aiguës bénignes, comme dans certaines affections neurologiques, fièvres au long cours ou cardiopathies aiguës.

- stimulation antigénique passive sans réinfection virale dans les cas de syndromes post-transfusionnels. Les Ag-viraux d'origine exogène (portés par les lymphocytes transfusés) exacerbent la réponse en AC-VCA et AC-NA. Les AC-EA en particulier, qui traduisent la replication virale, n'apparaissent pas dans ce profil.

L'existence même de ces divers profils des AC-EB traduit bien le caractère de virus persistant qui caractérise les herpès-virus comme l'herpès simplex ou le cytomegalovirus.

B) - INFECTION EXPERIMENTALE CHEZ LE SINGE

Nous avons tenté de démontrer le pouvoir oncogène du virus EB sur des singes Saïmiri. La réinfection chez le singe Saïmiri de cellules autologues préalablement transformées par l'EBV in-vitro, a conduit à l'apparition de nodules tumoraux aux points d'inoculation et sur le médiastin. Les cellules tumorales étaient porteuses du génome viral EB et de l'Ag-EBNA, comme pour les cellules biopsiques tumorales du lymphome de Burkitt. La tumorigénicité des lignées lymphoïdes transformées par l'EBV et l'absence d'oncogénicité du virus-EB par lui-même injecté directement aux hôtes simiens, serait plus favorable à l'hypothèse d'un virus-EB "facteur co-carcinogène",

que d'un virus-EB "agent étiologique" des syndromes lymphoprolifératifs malins avec lesquels on le trouve associé.

L'EBV ET LA CELLULE - CIBLE

L'EBV possède la capacité de transformer, i.e. d'immortaliser les lymphocytes normaux en lignées permanentes. Que la lignée soit induite par infection virale in-vitro, ou spontanée à partir des lymphocytes de sujets à sérologie EB positive, les lignées lymphoïdes ainsi obtenues portent toutes le génome viral-EB et l'Ag-EBNA. Ces lignées se révèlent toujours porteuses de multiples copies du génome viral EB (Pagano 1974). Toutes les lignées porteuses du génome viral-EB sont de type "B" lymphoïde sans exception.

Réciproquement, à de rares exceptions près, toutes les lignées "B" lymphoïdes sont EBV-génome positives.

Nous avons pu vérifier qu'in-vitro le lymphocyte "B" est la seule cellule cible du virus-EB. Le lymphocyte peut être indifféremment d'origine humaine ou simienne. Pour les lymphocytes humains, il peut s'agir de cellules du sang de cordons ou de lymphocytes du sang périphérique d'adultes.

Que la lignée soit obtenue spontanément après explantation directe des lymphocytes in-vitro, ou induite par infection EBV in-vitro, nous avons vu que le degré d'expression du génome viral dépend grandement de la cellule hôte. Les lignées dérivant de sang de cordon sont essentiellement non productrices, les lignées dérivant de lymphocytes d'adultes sont pour moitié productrices, et non productrices, alors que les lignées dérivant de BL et de lymphocytes de singe *Saimiri* sont essentiellement productrices. Toutes les lignées que nous avons obtenues, quelle que fut l'origine du virus-EB utilisé sont de type lymphoblastoïde, même dans le cas des cocultures de cellules tumorales de BL avec les lymphocytes de sang de cordon. Le type lymphoma n'est représenté que par les lignées dérivant directement des cellules tumorales de BL.

Nilsson et Pontèn ont bien souligné le caractère particulier des lignées de type lymphoma, dérivant du BL, qui se distinguent de toutes les autres lignées lymphoïdes qu'ils ont dénommées de type lymphoblastoïde. Les lignées dérivant de BL sont monoclonales et représentatives de cellules biopsiques tumorales (Fialkow et al. 1973), elles portent toujours une translocation sur le chromosome I4 (Manolov et al. 1972). Dans ces lignées, le génome viral est essentiellement présent sous forme épisomale circulaire et fermée, tandis qu'une faible part est intégrée linéairement au DNA cellulaire (Adams et al. 1975a). Le caractère particulier des cellules de lignées de BL et l'existence de lignées "B" lymphoïdes non porteuses de virus-EB soulèvent à nouveau le problème : l'EBV est-il l'agent étiologique du BL, ou n'est-il simplement qu'un "virus de passage" ? Dans l'hypothèse du "virus de passage", on comprend mal pourquoi il n'en serait pas de même pour tous les autres syndromes lymphoprolifératifs, non-Burkitt, survenant chez des sujets porteurs d'AC-EB. Chez ces sujets, on n'a jamais encore trouvé l'association particulière entre le génome EBV et la cellule tumorale identique à l'association décrite dans le cas du BL. Dans l'hypothèse du virus-EB agent étiologique, on est alors surpris par la très large distribution de ce virus dans des conditions bénignes et l'absence de différents sous-types de virus EB. Dans notre étude, nous n'avons pas pu caractériser l'existence de différents sous-types de virus-EB à partir du virus relâché par nos lignées productrices établies spontanément et pourtant d'origines très variées. Ni agent causal, ni virus de passage, l'EBV pourrait être un agent co-carcinogène pour lequel le déterminisme de l'expression génétique de la cellule hôte (ou cellule cible) serait le facteur déterminant.

La connaissance biologique du virus-EB évoluerait plus rapidement si l'on disposait d'un système cellulaire totalement permissif à l'infection virale. Par la génétique somatique, nous envisageons d'étudier l'expression du génome viral dans les hybrides cellulaires entre lymphocytes "B", relativement permissifs et lymphocytes "T" non permissifs, à l'infection virale.

L'EBV ET SON GÉNOME

A) - CAPACITE DE TRANSFORMATION

Alors que pour les autres virus oncogènes à DNA, il a été montré que la capacité de transformation est dépendante d'une très petite partie du génome viral, deux de nos expérimentations nous amènent à penser que la part du génome EB responsable du pouvoir transformant, serait relativement importante.

1°) - Nos essais de transfection par le DNA du virus B95.8 n'ont pas été couronnés de succès. Cet échec nous a amené à penser que la fonction de transformation requiert, peut-être pour s'exprimer l'intégralité de la molécule de DNA-viral, ou en tout cas, l'intégrité d'une large part de ce génome. Le traitement pour préparer ce DNA, si ménagé soit-il, aurait entraîné la perte de cette fonction.

2°) - Lorsque nous avons étudié l'inactivation séquentielle du génome viral par les UV, la fonction de transformation, pour le virus B85.8 est apparue comme relativement sensible aux UV. Cette capacité de transformation disparaissait en même temps que la capacité d'induire l'Ag-EBNA.

B) - CAPACITE D'INDUCTION DE L'Ag-EA

L'inactivation séquentielle du génome viral par les UV a montré que, pour le virus P3HR1, la fonction d'induction de l'Ag-EA sur les cellules Raji était exceptionnellement résistante à l'irradiation.

1°) - Si la cellule cible utilisée est non porteuse du génome viral EB résidant, cette capacité d'induire l'Ag-EA apparaît beaucoup

plus sensible. Nous avons pu estimer que la fonction précoce d'induction de l'Ag-EA sur les cellules cibles EBV-génome négatives, requiert l'intégrité d'au moins la moitié du génome viral infectant.

2°) - D'autre part, l'exceptionnelle résistance aux UV de cette fonction d'induction de l'Ag-EA, lorsque les cellules cibles sont les cellules Raji ou Daudi, est en faveur d'une complémentation entre le génome viral superinfectant et le génome-EB résidant, porté par les cellules de ces lignées.

Si la biologie du virus-EB a rapidement progressé, il n'en reste pas moins que les aspects cliniques des infections à virus-EB restent très flous. La pathogénie de la MNI reste obscure, même si certaines formes peuvent être attribuées incontestablement au virus-EB, et, la question majeure de savoir si le virus-EB est ou non oncogène chez l'homme, c'est-à-dire, responsable du BL africain et du npc, reste encore entièrement posée.

Les nombreux travaux suscités par le virus-EB serviront en outre de modèle à l'étude des autres virus persistants existant chez l'homme et qui ont été délaissés jusqu'à ces derniers temps.

