



**HAL**  
open science

# Points de contrôle inhibiteurs de la réponse immune exprimés par les lymphocytes B en latence III de l'EBV et fucoïdanes : exemple de PD-L1

Jennifer Saliba

## ► To cite this version:

Jennifer Saliba. Points de contrôle inhibiteurs de la réponse immune exprimés par les lymphocytes B en latence III de l'EBV et fucoïdanes : exemple de PD-L1. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2022. Français. NNT : 2022LIMO0123 . tel-04087049

**HAL Id: tel-04087049**

**<https://theses.hal.science/tel-04087049>**

Submitted on 2 May 2023

**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.

ED652 OMEGALIM – Biologie, Chimie, Santé (BCS)

UMR CNRS 7276 – CRIBL

Contrôle de la Réponse Immune B et Lymphoproliférations

Equipe « Molecular Mechanisms of B Cell Cancerogenesis »

THÈSE

pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Limoges**

Discipline : Biologie, Chimie, Santé

Spécialité : Immunologie, Oncologie, Inflammation et Infectiologie

Présentée et soutenue par

**Jennifer SALIBA**

Le 15 décembre 2022

**Points de contrôle inhibiteurs de la réponse immune  
exprimés par les lymphocytes B en latence III  
de l'EBV et fucoïdanes :  
exemple de PD-L1**

Thèse co-dirigée par le Professeur Jean FEUILLARD et le Professeur Mona TANNOURY

**JURY :**

Rapporteurs

M. Daniel Olive, PU-PH, CNRS, Marseille

Mme Joëlle Wiels, DR, CNRS, Villejuif

Examineurs

Mme Ingrid Arnaudin, PU, CNRS, La Rochelle

Mme Mona Tannoury, PU, Université Libanaise, Liban

M. Jean Feuillard, PU-PH, CNRS, Limoges

Mme Chantal Jayat-Vignoles, MCU, CNRS, Limoges

Invités

M. Hugo Groult, CR, CNRS, La Rochelle



*À mes parents, à mes sœurs,*

*À ton âme Téta Hassouna,*

*À toi Julie*

*C'est à vous ma chère famille que je dédie ce travail de trois ans*

*qui n'aurait pas été possible sans vous !*

*À ton âme ma chère mamie, j'aurais beaucoup aimé que tu sois présente avec moi ce jour-là,*

*toi qui m'as toujours encouragée à suivre mes rêves jusqu'au bout,*

*je te porterai toujours dans mes pensées et mon cœur.*

*À toi Julie, notre petite guerrière, tu y arriveras.*

*J'espère que ce travail contribuera à l'avancement de la recherche*

*et te donnera un peu plus d'espoir dans ton combat pour la vie !*





Try to leave this world a little better than you found it and,  
when your turn comes to die, you can die happy  
in feeling that at any rate you have not wasted your time  
but have done your best

*Robert Baden Powell*





*Durant les trois années de ma thèse, j'avais une bourse de l'organisation « Hariri Foundation for Sustainable Development ».*

*J'ai réalisé l'ensemble le travail dans le laboratoire CRIBL (Contrôle de la Réponse Immune B et Lymphoproliférations – UMR CNRS 7276 INSERM 1262) à l'Université de Limoges (France).*

*Le travail au sein du laboratoire était soutenu par les crédits du CNRS et de l'INSERM.*

*Mon projet de thèse était particulièrement financé par la Ligue régionale contre le Cancer – LIMOUSIN (Corrèze, Creuse, Haute-Vienne) dans le cadre Appel à projet Recherche.*





## Remerciements

Et moi qui croyais que rédiger une thèse est difficile, j'aperçois que trouver les mots pour exprimer tous mes remerciements est le plus dur. Je n'arrive pas à réaliser que trois années soient déjà passées, un nouveau chapitre commence, et ceci n'aurait pas pu être possible sans vous !

Je commencerai par exprimer mes profondes gratitude à M. Daniel OLIVE et Mme. Joëlle WIELS d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse.

J'aimerais, dans un second temps, remercier tous les membres du laboratoire CRIBL : sans vous le travail n'aurait jamais été accompli !

Je vous remercie Dr. Eric PINAUD pour m'avoir accueillie dans le laboratoire et pour toutes les questions et discussions pertinentes lors des réunions du laboratoire.

Je tiens également à remercier le Pr. Jean FEUILLARD : merci de m'avoir accueillie dans votre équipe de recherche, j'apprécie toutes les réunions, les discussions, les grandes questions qui ont toujours fait avancer le projet.

Je vous remercie Pr. Mona TANNOURY d'avoir participé au co-encadrement de projet de thèse, d'être présente et de suivre – malgré la distance - l'avancement du travail. Je vous ai connue pendant mes études universitaires, engagée et passionnée pour la recherche, et je garde aussi après ma thèse cette remarquable image de vous, de laquelle j'ai beaucoup appris.

Un gigantesque MERCI au Dr. Chantal JAYAT-VIGNOLES, vous êtes beaucoup plus qu'une co-encadrante de thèse. Les mots ne peuvent pas exprimer ma reconnaissance. Je vous remercie en premier pour votre humanité et aussi pour toutes les discussions scientifiques, les discussions de la vie et de la carrière, les partages des histoires de nos familles. Merci pour votre présence dans les hauts et les bas, pour célébrer et pour chercher les solutions. J'ai toujours dit que je suis dans le paradis, et voilà que j'avoue que votre encadrement et bienveillance étaient une des raisons. À côté de tout cela, je vous remercie pour l'excellent exemple de CHERCHEUSE que vous m'aviez montré : la passion, la curiosité, l'intégrité, la patience, la persévérance et l'humilité. Avec toutes ces qualités, tous les conseils et tout ce que j'ai appris de vous, vous avez marqué ma vie !

Durant mon projet de thèse, nous avons eu la chance de collaborer avec le laboratoire LIENSs (UMR 7266 – La Rochelle), pour cela, je souhaiterais vous remercier Pr. Ingrid ARNAUDIN, Dr. Hugo GROULT et Chanez MANSEUR pour cette chance. Cette collaboration était très porteuse pour l'avancement du projet, et également pour moi avec toutes les discussions scientifiques enrichissantes durant les réunions. La pandémie a fait que nous ne nous sommes pas rencontrés qu'à ce jour-là, mais nous avons bien réussi à dépasser tous les obstacles. Merci Chanez pour tous les échanges et le travail, je te souhaite une bonne continuation.

Faisant partie de l'équipe JF durant mon arrivée en thèse, je te remercie Hussein A. pour tous les conseils, les astuces techniques et l'encouragement. Tu as été toujours présent, à la paillasse, dans la salle de culture, dans le bureau, pour discuter, trouver des réponses, partager l'actuel de notre pays, les aventures de Lily-Rose, et ceci était toujours fructueux. Je te souhaite, à toi et ta famille, les meilleurs vœux.

Je tiens aussi à remercier toute l'équipe JF : merci Danielle pour toutes les discussions, les conseils et la lecture de mon introduction de thèse ; merci Nathalie pour l'esprit scientifique et les questions toujours aboutissantes ; merci Ahmad et Christelle VF pour vos présences et discussions lors des réunions de l'équipe ; merci Sophie pour l'échange culturel, la bonté, l'attention et la passion pour comprendre et savoir plus, et...merci Robin pour les questions et les discussions toujours intéressantes, les idées proposées, et encore merci les M&M's, ton avis sur les desserts et pour les discussions culturelles. Je te remercie aussi Cathy pour toute l'aide que tu as offerte pour les manips, les protocoles et solutions proposées.

En lisant tout cela, vous pouvez imaginer dans quelle agréable ambiance j'ai travaillé, attendez pour savoir qui étaient mes collègues !

Je tiens à remercier tous les doctorants qui sont déjà docteurs ou en cours de l'être : Dr Dina bonne chance dans tes projets, Nader bon courage, c'est toi le suivant et bonne continuation à toi Milène. Ma chère Kenza, je te souhaite le meilleur, tu le mérites ! Merci pour toute la gentillesse, la sagesse, les pas calculés, le grand sourire et la générosité, j'ai hâte de te voir Docteur !

Et la cerise sur le gâteau, la famille du FAMEUX BUREAU 138, le bureau des grands-parents, j'ai les larmes aux yeux. C'est ce bureau qui était une des principales raisons qui me faisaient venir tous les jours au laboratoire. Lilian, Israa, Stécy, Léa et Quentin, les meilleurs collègues et amis de tous les temps. Plus de 120 semaines, 600 jours, 5600 heures, 336000 minutes, je ne regrette aucune seconde, ni en quantité ni en qualité.

Lilian, merci déjà pour l'accueil et tous les conseils, toi qui à mon arrivée avais déjà franchi la moitié du parcours. Merci pour les moments partagés, les sorties et les rires. Je te souhaite encore plus de réussite et de succès.

Stécy, oh...désolée, Dr. Chollet, de toute ma vie je n'ai rencontré personne spontanée et franche comme toi, et c'est contagieux ! Je me rappelle très bien que c'était toi qui avait initié cette ambiance au bureau, et je t'en suis reconnaissante. Je te remercie pour ta gentillesse et ton attention et pour tous les bons moments inoubliables, les manips, les réussites, les larmes, les fous rires, les ... flambés. Je suis sûre que dans ta nouvelle aventure tu vas assurer, et je suis fière d'avoir une amie comme toi.

Toi aussi Léa, le dynamo du bureau ! Je me rappelle que j'ai fait ta connaissance quand tu m'as emmenée de la gare, avec Israa et Dina, sans même me connaître ! Et après nous avons partagé le même bureau, et l'histoire a commencé. Je te remercie Léa pour ta présence toujours active, motivante, chaleureuse et rayonnante et les taxis. J'ai de la chance de te connaître et de t'avoir comme amie, et je te souhaite tout le succès, dans tous les axes de ta vie.

M. Lemasson, tu nous as manqué ! L'ambiance était trop différente sans toi, je te souhaite un bon retour en forme pour ta dernière année de thèse et toute la chance pour ta carrière après. Je te remercie Quentin, M. le galant, pour tous les bons moments partagés, et ce plaisir à discuter du travail et de nos cultures. Ta gentillesse et sincérité ont bien complété l'ambiance du bureau et ont aussi fait l'équilibre !!!

Madame Israa, la référence pour nous tous ! Merci pour ton amour, ta gentillesse et ta générosité. Tu es une amie à vie, merci pour ta présence et ton aide, toujours remarquables. Je te souhaite une bonne continuation dans ton poste et beaucoup de succès.

Chers amis, c'est trop dur de vous quitter, je n'oublierai jamais nos comités pour résoudre les problèmes de manips, nos aventures, nos longues discussions confidentielles interminables, nos conseils partagés, nos gourmandises, nos grill-in... Vous seriez pour la vie mes dégustateurs préférés. La vie continue, chacun de nous fait son chemin, certains l'ont déjà commencé, mais vous savez très bien que ce n'est qu'un au revoir, je vous aime beaucoup ! Ophélie, c'était aussi très sympa de pouvoir faire ta connaissance, je te souhaite une bonne continuation dans ton poste, et beaucoup de succès.

Je remercie aussi du fond du cœur tout le groupe libanais que j'ai fait connaissance au laboratoire : Nour, Imane, Hassan, Batoul, Zeinab, Hussein I. et Leena. Merci pour votre chaleureux accueil !

Hassan, merci pour tous les trajets, merci pour tous les moments partagés et les discussions du travail et de la vie, je te souhaite le meilleur.



Zeinab, tu me manques beaucoup, je suis très heureuse pour toi et ta famille. Merci pour ta douceur, ton calme et ta générosité. J'espère que nous nous verrons prochainement.

Batoul, Lady Batoul, tu sais maintenant très bien pourquoi ! Tu es l'exemple de la bonté et la délicatesse, je te remercie beaucoup pour ces qualités qui m'ont beaucoup marqué, et je te souhaite de très beaux jours dans l'avenir, tu le mérites bien !

Hussein I., le calme et la sagesse, je me rappelle très bien de l'ambiance de la bibliothèque que tu aimais toujours, shhhhhh. Merci pour les conseils, les moments partagés et les discussions lors du déjeuner. Bonne continuation dans ton poste !

Et voilà que je perde les mots...Leena et Israa, je vais faire de mon mieux pour choisir les mots qui expriment bien tous mes remerciements.

Leena, the strong independent woman! Tu caches en toi une bonté qui suffit au monde entier, et si tout le monde avait ta sincérité, nous vivions déjà en paix. Je n'ai pas connu une personne comme toi, c'est impossible de ne pas être soi-même avec toi ! Tu es beaucoup plus qu'une amie pour moi, tu es une sœur de cœur.

Israa, non, je n'ai pas encore fini avec toi ! Dans le labo, hors du labo, dans la semaine, les weekends, les vacances, les longs trajets, les courts trajets, impossibles sans ta compagnie ! Je n'imaginai pas que la fille qui a pris l'initiative de me récupérer de la gare et me poser chez moi, sans même me connaître, est aujourd'hui une sœur de cœur pour moi. Une sœur aimable, généreuse, attentionnée, présente et prête à tout pour sa famille.

Leena et Israa, j'ai de la chance de vous connaître, de faire toutes ces longues discussions du travail, de la vie, de nos familles avec vous. Vous êtes la preuve que ce n'est ni la quantité ni les similarités qui font les vrais amis, mais les valeurs communes, je vous souhaite plus que le meilleur et vous aime fort !

J'ajoute aussi à la liste une personne adorable, qui a également marqué mon parcours. Merci Lara, je suis très heureuse de faire ta connaissance, ce caractère discret mais marquant, toujours présent pour offrir l'aide, le sourire et la bonté. Merci pour la motivation et le support !

Je remercie aussi Roussine et Catherine pour tous les repas partagés, les moments de rires et de colère parfois, je vous souhaite une très bonne continuation.

J'accorde un spécial merci à toi Claire, pour ta présence rayonnante, ton humour et ton amour pour le Houmous, aucun français qui se régale comme toi ! Tu étais toujours prête à écouter, à aider, à expliquer et à dépanner le fameux kit, merciiii !

Et voilà que j'arrive au fond du cœur, Baba Miled et Mama Laure, je ne peux pas passer à côté de votre amour, support et sacrifice, et ne rien dire. J'ai de la chance d'avoir des parents comme vous, des amis comme vous. Je sais qu'aujourd'hui mon rêve se réalise grâce à vos prières, et j'espère que vous êtes fière de moi et que je serai un jour un parent comme vous. Mes chères sœurs, cette aventure n'a pu nous séparer qu'en distance ! Joussayca (Jessica), tu seras toujours ma moitié, ce n'est pas évident de te voir exprimer tes sentiments, mais tu as très bien su être présente et motivante même à distance, merci d'avoir tout fait CAPITAINE pour que je ne me sens pas très loin de vous! J'aurais aimé que tu sois présente aujourd'hui avec moi. Nessa (Jeunessa), te rappelles-tu comment tu m'as prise dans tes bras sans me relâcher quand je parlais à l'aéroport ? Eh bien regardes ! Tu es là aujourd'hui avec moi pour célébrer ces trois ans, et je suis fière de tout le progrès que tu as fait au travail. Joyito (Joy), c'était dur pour moi de te voir grandir de loin, je suis très fière de toi, de ta réussite, des projets que tu planifies pour ta vie, suis tes rêves et tu y arriveras. Merci pour toute l'aide « technologique » que tu as offerte à ta vieille sœur ! Nous ferions la fête à ma rentrée !

J'aimerais bien remercier une personne bien spéciale pour toute ma famille Em Jozz (Josette), c'est rare de trouver encore ces jours-là des personnes qui ont toutes tes qualités, tu es une personne extraordinaire. Merci de m'avoir gâtée quand je rentrais pour les vacances, et pour toutes les randonnées et tours touristiques. Je te souhaite tout le meilleur pour le restant de la vie.

Je remercie aussi ma grande famille pour son support, son amour, et sa motivation, vous êtes irremplaçables : mes tantes, mes oncles, mes cousins, mes cousines et mes grands-parents, j'ai hâte de rentrer et vous voir.

Je tiens à remercier infiniment une personne, qui sans elle, ce rêve n'existait même pas ! Merci Marwan, ange gardien, pour tout le support que tu as apporté, et toute l'aide, je continuerai ma vie entière à te remercier et tu seras toujours dans mes prières. Je te souhaite la santé, le bonheur, la joie et beaucoup d'amour, je t'aimeeee, je t'aimeeee, je t'aimeeee !

Je clôture avec ma deuxième famille qui m'a appris et prouvé que la distance est incapable de briser des vraies amitiés, vous étiez pour moi un vrai support.

Merci Nicolas et Dona pour votre amitié sincère, vos conseils et votre encouragement perpétuel, j'ai hâte de voir le petit prince.

Merci Jul et Joan pour tous les moments partagés, les weekends spéciaux, les discussions profondes sur les bulbes d'orchidées !

Merci Rebecca pour ton encouragement et ton admiration, cela m'a fait toujours du bien.

Merci Ramram de m'avoir gardée la place dans la famille MIDADE que j'aime beaucoup, merci pour ta confiance et ton bon cœur !

Merci Kamz, le pro bro, pour tout ton support, ta motivation, et ta présence dans les moments les plus difficiles, toi qui m'appelait depuis longtemps Docteure, me voilà !

Merci Ramez, M. Helo, nous avons partagé des moments de nostalgie pour notre pays et nos familles, nous avons vécu en même temps l'expérience de l'étranger, et nous voilà en train de réussir, je te remercie pour tout le support que tu as apporté !

James, merci pour tous les moments exceptionnels et inoubliables, tu as parfaitement marqué ma vie ! Merci pour l'encouragement dans tous les moments difficiles à gérer et d'avoir participer à réaliser un rêve qui était rangé dans le tiroir.

Charboul, tu es une personne exceptionnelle, avec toutes tes qualités et ta personnalité, je ne peux que t'aimer. Merci pour l'encouragement et la motivation interminables.

Rit, cousine, amie, « chrik », tu es ma source d'énergie avec The one and Only Lallous et le petit prince adoré Michael, merci pour votre amour, les weekends de folies, les soirées et les longues discussions.

La guerrière Amo, c'était plus facile de se rencontrer au Liban qu'en France ! Mais ça n'a jamais été difficile de trouver le temps pour de longs appels et discussions ; merci pour tous les conseils pour la vie, la thèse et la carrière ma très chère amie.

Vous tous, avez bien su me faire tenir jusqu'au bout. Merci pour votre amour, je vous aime tous très fort et vous souhaite de réaliser tous vos rêves. J'ai hâte de vous retrouver !

Je finis avec deux dernières personnes que j'aime beaucoup, Vicky, un Grand MERCI à toi qui m'a aidé à initier la réalisation du premier pas de mon livre, en parallèle avec la thèse, tu étais une source d'inspiration, et une grande partie du travail était impossible sans ton aide.

Et toi, Georges (Dimitrios) Faraj, le CEO, source de joie et de confiance, je te remercie pour ta présence toujours active et remarquable et tes prières. Je ne pourrai jamais te remercier pour tout, à très bientôt !

Enfin, je remercie Dieu qui m'a comblée de toutes ses grâces, et qui m'a donné la santé, la patience et le courage pour accomplir tout ce travail, entourée de vous tous !

## Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>





## Liste des illustrations

Figure 1. Structure des Herpès virus .....	40
Figure 2. Enchaînement des infections causées par la famille des Herpesviridae.....	42
Figure 3. Cellules infectées par le virus d'Epstein Barr (EBV).....	42
Figure 4. Schéma du génome linéaire de l'EBV .....	44
Figure 5. Schéma du génome de l'EBV sous sa forme épisomale .....	45
Figure 6. Les étapes d'entrée de l'EBV dans les cellules épithéliales .....	47
Figure 7. Les étapes d'entrée de l'EBV dans les lymphocytes B .....	48
Figure 8. Représentation schématique du cycle lytique de l'EBV .....	52
Figure 9. Cycle de la latence virale après infection par l'EBV : exemple des lymphocytes B.....	52
Figure 10. Etapes de l'infection primaire et persistance de l'EBV chez les individus immunocompétents .....	58
Figure 11. Structure de la protéine virale EBNA1.....	60
Figure 12. Structure de la protéine virale EBNA2.....	61
Figure 13. Structure de la famille des protéines EBNA3.....	63
Figure 14. Structure de la protéine EBNA-LP .....	64
Figure 15. Structure de la protéine LMP1 .....	65
Figure 16. Structure de la protéine LMP2 .....	67
Figure 17. Les mirARNs de l'EBV régulent les réponses immunitaires de l'hôte.....	71
Figure 18. Activation de NF- $\kappa$ B par LMP1 mimant CD40 .....	73
Figure 19. Activation de la voie PI3K/Akt par LMP1 .....	75
Figure 20. Activation de STAT3 par l'EBV dans les cellules B.....	76
Figure 21. Réponse immunitaire innée anti-EBV médiée par les monocytes via la reconnaissance de TLR2. ....	80
Figure 22. Reconnaissance immunitaire innée anti-EBV par les cellules dendritiques via les ligands TLRs.....	81
Figure 23. Mécanisme d'action des NKT pour limiter la réplication du virus d'Epstein-Barr.....	84
Figure 24. Cinétique d'expression des immunoglobulines anti-EBV lors de la primo-infection, la convalescence et la réactivation du virus.....	91
Figure 25. Structure des molécules du CMH-I et II et présentation des peptides antigéniques aux lymphocytes.....	101
Figure 26. Ligands et molécules de signalisation impliqués dans la synapse immunologique des lymphocytes T.....	102

<b>Figure 27. L'EBV module la présentation antigénique au T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> via les molécules du CMH durant le cycle lytique .....</b>	<b>103</b>
<b>Figure 28. L'échappement à l'immunosurveillance des cellules B en latence III de l'EBV via l'axe PD-1/PD-L1 .....</b>	<b>107</b>
<b>Figure 29. Principaux points de contrôle inhibiteurs des cellules tumorales impliqués dans l'échappement à l'immunosurveillance et leurs récepteurs sur les lymphocytes T ou les cellules NK.....</b>	<b>117</b>
<b>Figure 30. Pr Suédois Harald Kylin, premier chimiste ayant décrit et isolé le film visqueux de .....</b>	<b>124</b>
<b>Figure 31. Chronologie de l'histoire des fucoïdanes .....</b>	<b>125</b>
<b>Figure 32. Chaînes de structure squelettique des fucoïdanes.....</b>	<b>126</b>
<b>Figure 33. Structure typique des fucoïdanes de différentes espèces d'algues brunes .....</b>	<b>127</b>
<b>Figure 34. Mécanisme d'action des fucoïdanes dans l'activation des macrophages, des lymphocytes T et des cellules NK.....</b>	<b>134</b>
<b>Figure 35. Mécanisme d'action des fucoïdanes combinés avec l'anticorps anti-PD-1 pour l'activation des lymphocytes T.....</b>	<b>136</b>
<b>Figure 36. Mode d'action des fucoïdanes dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose .....</b>	<b>141</b>
<b>Figure 37. Mécanismes soulignant les propriétés (A) antiprolifératives, anti-métastatiques et (B) pro-apoptotiques des fucoïdanes dans les cellules tumorales..</b>	<b>149</b>
<b>Figure 38. Expression relative des ARNm de PD-L1 et de PD-L2 pour les LCLs.....</b>	<b>208</b>
<b>Figure 39. Expression relative des ARNm de CD80 et de CD86 pour les LCLs .....</b>	<b>209</b>
<b>Figure 40. Expression relative des ARNm de B7-H3 et de B7-H4 pour les LCLs.....</b>	<b>210</b>
<b>Figure 41. Expression relative des ARNm de CD112 et de CD155 pour les LCLs .....</b>	<b>210</b>
<b>Figure 42. Expression relative des ARNm de CEACAM-1 pour les LCLs.....</b>	<b>211</b>
<b>Figure 43. Expression relative des ARNm de HVEM pour les LCLs .....</b>	<b>211</b>
<b>Figure 44. Expression relative des ARNm de Galectine-3 et de Galectine-9 pour les LCLs .....</b>	<b>212</b>
<b>Figure 45. Expressions totales et membranaires des HLA-ABC, -E, -DR par les cellules B en latence III de l'EBV (LCLs).....</b>	<b>214</b>
<b>Figure 46. Schéma présentant la régulation possible des cellules NK et T par les cellules B en latence III de l'EBV via les CMH de classes I et II. ....</b>	<b>216</b>
<b>Figure 47. Expressions totales et membranaires des points de contrôle de la famille des protéines B7 par les cellules B en latence III de l'EBV (LCLs) .....</b>	<b>218</b>

<b>Figure 48. Expressions totales et membranaires des points de contrôle de la famille des Nectines par les cellules B en latence III de l'EBV (LCLs).....</b>	<b>219</b>
<b>Figure 49. Expressions totales et membranaires de CEACAM-1 de la famille des CEA par les cellules B en latence III de l'EBV (LCLs) .....</b>	<b>220</b>
<b>Figure 50. Expressions totales et membranaires de HVEM de la famille des TNFR par les cellules B en latence III de l'EBV (LCLs).....</b>	<b>221</b>
<b>Figure 51. Expressions totales et membranaires des points de contrôle de la famille des Lectines par les cellules B en latence III de l'EBV (LCLs) .....</b>	<b>222</b>
<b>Figure 52. Schéma représentant les points de contrôle inhibiteurs surexprimés par les cellules B en latence III de l'EBV vis-à-vis des réponses immunes T et NK .....</b>	<b>224</b>
<b>Figure 53. Effet des formules vLMW-F sur l'expression de surface des points de contrôle de la famille des protéines B7 chez les cellules B en latence III de l'EBV (LCLs).....</b>	<b>225</b>
<b>Figure 54. Effet des formules vLMW-F sur l'expression de surface des points de contrôle de la famille des Lectines chez les cellules B en latence III de l'EBV (LCLs).....</b>	<b>226</b>
<b>Figure 55. Concentrations (ELISA) des galectine-3 et galectine-9 dans les surnageants de culture des LCLs .....</b>	<b>238</b>



## Liste des tableaux

<b>Tableau 1. Sous-familles des herpès virus humains et pathologies associées .....</b>	<b>41</b>
<b>Tableau 2. Expression des protéines virales de l'EBV en fonction des différents programmes de latence .....</b>	<b>53</b>
<b>Tableau 3. Mécanismes d'action des fucoïdanes sur les cellules tumorales.....</b>	<b>145</b>
<b>Tableau 4. Applications peu courantes et nouvelles des extraits de fucoïdanes de différentes espèces d'algues.....</b>	<b>146</b>
<b>Tableau 5. Conditions expérimentales et résultats attendus sur la potentialisation du traitement anti-PD-1 par les formules vLMW-F .....</b>	<b>237</b>

## Liste des abréviations

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique

**AH** : Anticorps Hétérophiles

**ARN** : Acide RiboNucléique

**BARTs** : BamHI-A Rightward Transcripts

**BCR** : B Cell Receptor

**Btk** : Bruton tyrosine kinase

**CCL3** : Chemokine (C-C motif) Ligand 3

**CCL4** : Chemokine (C-C motif) Ligand 4

**CD** : Cellule Dendritique

**CDc** : Cellule Dendritique conventionnelle

**CDp** : Cellule Dendritique plasmacytoïde

**CG** : Carcinome Gastrique

**CIRC** : Centre International de Recherche sur le Cancer

**CMH-I** : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I

**CMH-II** : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II

**CMV** : CytoMégaloVirus

**CNP** : Carcinome NasoPharyngé

**COX-2** : CycloOXYgénase-2

**CS** : Cancer des Seins

**CXCR7** : CX Chemokine Receptor 7

**DLBCL** : Diffuse Large B Cell Lymphoma

**DLBCL ABC** : DLBCL Activated B Cell

**DLBCL GCB** : DLBCL Germinal Center

**EA** : Early Antigen

**EBERs** : Epstein-Barr virus-Encoded small RNAs

**EBNA** : Epstein-Barr virus Nuclear Antigen

**EBV** : Epstein Barr Virus

**GM-CSF** : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

**HGAL** : Human Germinal center Associated Lymphoma

**HHV** : Human Herpes Virus

**HLA** : Human Leucocyte Antigen

**HLA-DR** : Human Leucocyte Antigen-D-Related

**HMWF** : High Molecular Weight Fucoidan

**IFN- $\alpha$ , - $\beta$  et - $\gamma$**  : InterFéroN  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$

**Ig (A, G, M)** : Immunoglobuline (A, G, M)

**IL** : InterLeukine

**IRAK** : Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase

**IRF4** : Interferon Regulatory Factor 4

**ITAM** : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif

**JAK/STAT3** : JAnus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription 3

**KIR** : Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors

**LB** : Lymphome de Burkitt

**LCL** : Lymphoblastoid Cell Line

**LMP** : Latent Membrane Protein

**LMWF** : Low Molecular Weight Fucoidan

**LTC** : Lymphocyte T Cytotoxique

**MA** : Membrane Antigen

**MAPK** : Mitogen-Activated Protein Kinases

**MCP-1** : Monocyte Chemoattractant Protein-1

**MI** : Mononucléose Infectieuse

**miARNs** : microARNs

**MICB** : MHC class I Chain-related molecule B

**MMWF** : Medium Molecular Weight Fucoidan

**MyD88** : Myeloid Differentiation primary response 88

**NF-κB** : Nuclear Factor kappa-light-chain- enhancer of activated B cells

**NK** : Natural Killer

**NKG2** : Natural Killer Group 2

**NKp** : Natural Killer protein

**NKT** : Natural Killer T cells

**NLS** : Nuclear Localization Sequence

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**ORFs**: Open Reading Frames

**PAL** : Pyothorax Associated Lymphoma

**PBMCs** : Peripheral Blood Mononuclear Cells

**PBS** : Phosphate-Buffered Saline

**PCNA** : Proliferating Cell Nuclear Antigen

**PDGFR** : Platelet Derived Growth Factor Receptor

**PD-L1** : Program Death Ligand 1

**PI3** : PhosphoInositide 3

**PRRs** : Pattern Recognition Receptors

**PTLD** : Post-Transplantation Lymphoproliferative Diseases

**ROS** : Reactive Oxygen Species

**RS** : cellules Reed-Sternberg

**Rta** : R transactivator

**SAPK** : Stress-Activated Protein Kinase

**SIH** : Système Immunitaire Humain

**TAD** : TransActivation Domain

**TAP1**: Transport Antigen Protein 1

**Th** : helper T cells

**TLRs** : Toll-Like Receptors

**TNFRs** : Tumor Necrosis Factor Receptor

**TNF- $\alpha$**  : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$

**TRAF6** : Tumor necrosis factor Receptor- Associated Factor 6

**TRAIL** : TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand

**Trégs** : T régulateurs

**TRIF** : TIR-domain-containing adapter-inducing Interferon- $\beta$

**USP7** : Ubiquitin Specific Processing Protease 7

**VCA** : Viral Capside Antigens

**VIH** : Virus d'Immunodéficience Humaine

**VZV** : Varicella Zoster Virus

**ZEBRA**: BamHI Z Epstein-Barr virus Replication Activator



## Table de matières

Avant-propos.....	31
Introduction bibliographique.....	35
Partie 1. Le virus d'Epstein Barr : structure et cycle biologique .....	37
I- Historique du virus .....	39
II- Structure et génome.....	43
III- Cycle biologique.....	46
III-1. Entrée dans les cellules cibles .....	46
III-1. a) Cibles conventionnelles.....	46
III-1. a) i- Les cellules épithéliales .....	46
III-1. a) ii- Les lymphocytes B.....	47
III-1. b) Cellules cibles non conventionnelles .....	49
III-1. b) i- Les monocytes .....	49
III-1. b) ii- Les lymphocytes T .....	50
III-1. b) iii- Les cellules NK .....	50
III-2. Cycle lytique.....	51
III-3. Latence virale.....	52
III-3. a) Latence III.....	53
III-3. b) Latence II.....	54
III-3. c) Latence I.....	54
III-3. d) Latence 0.....	55
III-3. e) Latence atypique .....	55
III-3. f) Réactivation : cycle latent/ cycle lytique .....	55
IV- Infection et persistance virale.....	56
V- Cellules B en latence III de l'EBV.....	59
V-1. Phénotype des cellules B en latence III .....	59
V-2. Protéines virales exprimées lors de la latence III .....	60
V-2. a) Protéines nucléaires .....	60
V-2. a) i- EBNA1 .....	60
V-2. a) ii- EBNA2 .....	61
V-2. a) iii- EBNA3.....	62
V-2. a) iv- EBNA-LP .....	64
V-2. b) Protéines membranaires.....	65

V-2. b) i- LMP1.....	65
V-2. b) ii- LMP2.....	67
V-4. Facteurs et voies de signalisation impliqués en latence III.....	71
V-4. a) Facteur NF- $\kappa$ B .....	71
V-4. b) Facteur c-Myc.....	73
V-4. c) Voie P38/MAPK .....	74
V-4. d) Voie PI3K/AKT.....	74
V-4. e) Voie des STATs.....	75
Partie 2. Surveillance immune de l'infection par l'EBV et échappement tumoral .....	77
I- Surveillance immune de l'infection par l'EBV.....	79
I-1. Immunité innée .....	80
I-1. a) Rôle des monocytes.....	80
I-1. b) Rôle des cellules dendritiques.....	81
I-1. c) Rôle des cellules NK .....	82
I-1. d) Rôles des cellules NKT .....	83
I-1. e) Rôle de quelques autres facteurs.....	85
I-2. Immunité adaptative .....	85
I-2. a) Immunité adaptative à médiation cellulaire.....	85
I-2. a) i- Rôle des lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> .....	85
I-2. a) ii- Rôle des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> .....	87
I-2. a) iii- Rôle des lymphocytes T $\gamma\delta$ .....	89
I-2. b) Immunité adaptative à médiation humorale.....	90
II- Échappement à l'immunosurveillance et tumeurs associées à l'EBV .....	92
II-1. Mononucléose infectieuse .....	92
II-2. Tumeurs solides .....	93
II-2. a) Carcinome nasopharyngé (CNP) .....	93
II-2. b) Carcinome gastrique (CG) .....	94
II-2. c) Cancer du sein (CS).....	94
II-3. Lymphoproliférations .....	95
II-3. a) Lymphoprolifération post-transplantation.....	95
II-3. b) Lymphome de Hodgkin .....	96
II-3. c) Lymphome de Burkitt .....	97
II-3. d) Lymphome B Diffus à grandes cellules .....	98
II-3. e) Lymphomes NK/T .....	99

III- Echappement à l'immunosurveillance et émergence des tumeurs : CMH et points de contrôle inhibiteurs.....	100
III-1. Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH).....	100
III-2. Points de contrôle immuns inhibiteurs.....	104
III-2. a) Famille des protéines B7.....	104
III-2. a) i- PD-L1 (B7-H1).....	104
III-2. a) i-1/ Formes solubles et stockage intracellulaire .....	105
III-2. a) i-2/ PD-L1 et pathologies associées à l'EBV.....	106
III-2. a) i-3/ Immunothérapie visant l'axe PD-L1/PD-1.....	107
III-2. a) ii- PD-L2 (B7-DC) .....	108
III-2. a) iii- CD80 (B7-1).....	109
III-2. a) iv- CD86 (B7-2).....	110
III-2. a) v- B7-H3.....	110
III-2. a) vi- B7-H4 .....	111
III-2. b) Famille des Nectines : Nectin-2 (CD112) et Necl5 (CD155) .....	112
III-2. c) Famille des CEA (CarcinoEmbryonic Antigen) : CEACAM1 .....	113
III-2. d) Famille des TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) : HVEM.....	113
III-2. e) Famille des lectines : galectines -3 et -9.....	114
III-2. e) i- Galectine-3 .....	115
III-2. e) ii- Galectine-9 .....	116
III-3. Cytokines immunosuppressives et infection par l'EBV .....	118
III-3. a) Interleukine-10 .....	118
III-3. b) TGFβ .....	119
III-3. c) Interleukine-35 .....	120
Partie 3. Fucoïdane : polysaccharide thérapeutique.....	121
I- Historique.....	123
II- Structure et composition chimique.....	126
III- Facteurs influençant les activités biologiques des fucoïdanes .....	127
IV- Dose et voies d'administration .....	129
V- Toxicité .....	130
VI- Métabolisme et internalisation cellulaire.....	131
VII- Effets biologiques des fucoïdanes.....	133
VII-1. Action sur les cellules immunes.....	133
VII-1. a) Cellules dendritiques .....	133



VII-1. b) Lymphocytes T et cellules NK.....	135
VII-2. Actions sur les cellules tumorales.....	137
VII-2. a) Tumeurs solides .....	138
VII-2. a) i- Induction de la mort cellulaire.....	138
VII-2. a) ii- Effets immunomodulateurs .....	141
VII-2. a) iii- Effets inhibiteurs de la métastase, la migration .....	142
et l'invasion.....	142
VII-2. a) iv- Effets anti-angiogéniques .....	143
VII-2. b) Tumeurs liquides .....	143
VIII- Fucoïdanes et voies de signalisation.....	146
IX- Recherche clinique .....	149
IX-1. Immunothérapie .....	149
IX-2. Co-traitement avec les fucoïdanes .....	150
Résultats .....	151
Résultats I : Article scientifique .....	157
Conclusion .....	199
Résultats II.....	201
1- Avant-propos.....	203
2- Matériels et Méthodes .....	204
2-1. Culture cellulaire .....	204
2-2. Extraction d'ARN au trizol .....	204
2-3. Rétrotranscription des ARNs.....	205
2-4. Analyse du niveau de transcription par PCR quantitative en temps réel (RT- qPCR).....	205
2-5. Analyse des expressions de surface et totale par cytométrie en flux.....	206
2-6. Traitement des cellules par les formules vLMW-F.....	207
3- Résultats .....	207
3-1. Expression transcriptionnelle des points de contrôle inhibiteurs.....	207
3-1. a) Etude de l'expression transcriptionnelle des points de contrôle inhibiteurs.....	207
3-1. a) i- Famille des protéines B7 .....	208
3-1. a) i- 1. PD-L1 et PD-L2 : ligands pour PD-1.....	208
3-1. a) i- 2. CD80 et CD86 : ligands pour CTLA-4 .....	209
3-1. a) i- 3. B7-H3 et B7-H4.....	210

3-1. a) ii- Famille des Nectines : CD112 et CD155 ligands communs pour TIGIT .....	210
3-1. a) iii- Famille des CEA : CEACAM-1 ligand pour TIM-3 .....	211
3-1. a) iv- Famille des TNFR : HVEM ligand pour BTLA.....	211
3-1. a) v- Famille des Lectines : .....	212
Galectine-3 ligand pour LAG-3 et Galectine-9 ligand pour TIM-3 .....	212
3-1. b) Analyse des expressions transcriptionnelles .....	212
3-2. Expressions protéiques totale et membranaire des CMH et points de contrôle inhibiteurs.....	213
3-2. A- a) Etude des expressions protéiques totale et membranaire des CMH.....	214
3-2. A- b) Analyse des expressions protéiques totale et membranaire des CMH..	215
3-2. B- a) Etude des expressions protéiques totale et membranaire des points de contrôle inhibiteurs.....	217
3-2. B- a) i- Famille des protéines B7 .....	217
3-2. B- a) ii- Famille des Nectines : CD112 et CD155 ligands communs pour TIGIT.....	219
3-2. B- a) iii- Famille des CEA : CEACAM-1 ligand pour TIM-3 .....	220
3-2. B- a) iv- Famille des TNFR : HVEM ligand pour BTLA.....	221
3-2. B- a) v- Famille des Lectines : .....	222
Galectine-3 ligand pour LAG-3 et Galectine-9 ligand pour TIM-3.....	222
3-2. B- b) Analyse des expressions protéiques totale et membranaire des points de contrôle inhibiteurs.....	223
3-3. Effet des formules vLMW-F (F1 ou F2) sur les points de contrôle inhibiteurs : résultats préliminaires.....	224
3-3. a) Etude de l'effet des formules vLMW-F (F1 ou F2) sur les points de contrôle inhibiteurs.....	225
3-3. a) i- Famille des protéines B7 .....	225
3-3. a) ii- Famille des Lectines .....	226
3-3. b) Analyse de l'effet des formules vLMW-F (F1 ou F2) sur les points de contrôle inhibiteurs.....	227
4- Discussion.....	227
Conclusion et Perspectives .....	233
Références bibliographiques .....	243



## Avant-propos

Le virus d'Epstein Barr (EBV) est un virus oncogénique qui infecte 95% de la population mondiale et persiste de manière latente dans l'organisme. Il est associé à plusieurs maladies dont les lymphomes B, où les cellules peuvent notamment être en programme de latence III du virus (programme de prolifération cellulaire). Plusieurs groupes étudient la physiologie des cellules B infectées et transformées par l'EBV. Le laboratoire UMR CNRS 7276 INSERM 1262 (CRIBL – Contrôle de la Réponse Immune B et des Lymphoproliférations) a mis en évidence le rôle modulateur de la réponse immune par les lymphocytes B en latence III de l'EBV. Les premiers travaux avaient mis en évidence une surexpression du récepteur pro-apoptotique Fas (médié par la signalisation NF- $\kappa$ B constitutivement activée par LMP1), ce qui permettait de les sensibiliser à la réponse immune T CD8<sup>+</sup> (Le Cloennec et al., 2006).

Cependant, l'émergence de lymphomes B associés à l'EBV chez des sujets immunocompétents a conduit le laboratoire à s'intéresser à leur échappement à la surveillance par le système immunitaire. Les premiers travaux ont concerné le point de contrôle inhibiteur PD-L1, après la mise en évidence de sa surexpression au niveau transcriptionnel. Il a été démontré que PD-L1 est stocké dans les lysosomes sécrétoires, dont la fusion à la membrane plasmique est potentialisée par le programme de latence III de l'EBV, aboutissant à sa surexpression à la surface des cellules (Durand-Panteix et al., 2012). L'étude du rôle fonctionnel de PD-L1 a mis en évidence que par sa liaison avec le récepteur PD-1 des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> il y a expansion de cellules T régulatrices anergiques, conventionnelles (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>) et non conventionnelles (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> Foxp3<sup>+</sup>), et que ces dernières sont responsables de l'inhibition de la prolifération des cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> effectrices suite à la production de TGF- $\beta$ . L'expression de PD-L1, associée à la production de cytokines immunosuppressives (IL-10, IL-35 et TGF- $\beta$ ), a permis de montrer que ces cellules étaient des mimétiques de cellules B régulatrices et fortement impliquées dans l'inhibition de la réponse T anti-tumorale par surexpression de PD-L1 (Auclair et al., 2019).

La surexpression de PD-L1 dans de nombreux types de tumeur et son rôle immuno-inhibiteur a eu pour conséquence qu'il soit ciblé par des traitements d'immunothérapie (anti-PD-L1 ou anti-PD-1) (Martorelli et al., 2012). Toutefois, ces derniers présentent des limites, car la rupture de la tolérance induite par les inhibiteurs de points de contrôle ne se limite pas à la tumeur. La lyse des cellules tumorales aboutit à la libération de médiateurs pro-inflammatoires et de signaux de danger pouvant entraîner des réactions auto-immunes, fatigue, problèmes de peau ou digestifs (Su et al., 2020). D'où l'intérêt de chercher de nouvelles molécules thérapeutiques et/ou méthodes de traitement.

Une stratégie peut être de baisser l'expression de PD-L1 afin de limiter les doses d'anticorps thérapeutiques employées lors des immunothérapies. Parmi les molécules candidates se trouvent les fucoïdanes, des polysaccharides sulfatés qui ont gagné beaucoup d'attention dans les dernières décennies en raison de leur non toxicité et de leurs nombreuses propriétés biologiques, telles que leurs activités antiprolifératives, pro-apoptotiques, antitumorales et immunomodulatrices. Il est indispensable de noter l'importance du poids moléculaire dans l'efficacité de ces polysaccharides : d'une manière générale, plus il est bas, plus ils sont efficaces (Jin et al., 2021; Luthuli et al., 2019; Oliveira et al., 2020; J. Yang et al., 2021), bien qu'aucune limite de taille ne soit actuellement clairement définie.

Mon projet de thèse a été réalisé dans la continuité des travaux portant sur l'étude des lymphocytes B en latence III de l'EBV et leur rôle inhibiteur de la réponse anti-tumorale.

Dans un premier temps je me suis intéressée à PD-L1, avec une nouvelle ouverture : celle d'étudier l'impact des fucoïdanes en terme de toxicité, ainsi que vis-à-vis de l'expression de ce point de contrôle, quelques données de la littérature montrant une baisse de son expression transcriptionnelle dans le cas de tumeurs solides (Teruya et al., 2019; Xue et al., 2017). Les travaux ont été réalisés dans le cadre d'une collaboration entre l'Université de Limoges, le Pr Tannoury (co-direction) et le laboratoire CNRS 7266 LIENSs (Litorral Environnement et Sociétés, La Rochelle) pour la préparation des formules de fucoïdanes dépolymérisés de l'algue brune *Fucus vesiculosus*. Ce travail s'intègre dans le projet collaboratif MOLNAT « Nouvelles MOLécules NATurelles pharmacomodulatrices de cibles en cancérologie » de l'Oncosphère Nouvelle Aquitaine. Deux formules d'oligosaccharides d'ultra bas poids moléculaire de fucoïdane (vLMW-F : very Low Molecular Weight – Fucoïdan) ont été étudiées (leur caractérisation chimique fait l'objet des travaux de thèse en cours de Chanez Manseur). Notre étude a également été élargie à un autre type de cellules de lymphome, les DLBCLs (Diffuse Large B cell Lymphomas).

De nombreux points de contrôle, autres que PD-L1, ont également un rôle inhibiteur de la réponse immune antitumorale, en particulier celle mettant en jeu les cellules T et NK. La seconde partie de notre travail a consisté à étudier le profil des cellules B en latence III de l'EBV en terme d'expression des Complexes Majeurs d'Histocompatibilité (CMH) et des points de contrôle actuellement pris en compte lors des traitements par immunothérapies de routine, ou en cours de développement. Nous avons également réalisé une étude préliminaire de l'impact des vLMW-F sur les points de contrôle trouvés comme étant surexprimés.

Ma thèse se découpe en trois chapitres : 1/ Etude bibliographique, 2/ Objectifs, résultats obtenus et discussions et 3/ Conclusion générale et perspectives.

**L'étude bibliographique** se découpe elle-même en trois parties :

- La première est consacrée au **virus d'Epstein Barr et son cycle biologique**. Nous exposons brièvement l'historique du virus, sa structure et son génome, son entrée dans les cellules, les cycles lytique et latent, son tropisme et la persistance virale, puis les gènes de latence exprimés par les lymphocytes B en latence III de l'EBV.
- La seconde partie est consacrée à la **surveillance immune de l'infection par l'EBV et l'échappement tumoral**. Elle porte sur le rôle de l'immunité innée et adaptative, l'échappement à l'immunosurveillance et les tumeurs associées à l'EBV puis sur l'échappement à l'immunosurveillance et l'émergence des tumeurs en lien avec l'EBV, en s'intéressant en particulier au CMH et aux points de contrôle inhibiteurs.
- La troisième partie concerne le **fucoïdane : polysaccharide thérapeutique**. Après un bref historique, nous présentons la structure chimique, les facteurs qui influencent son activité, les doses et voies d'administration, la toxicité, son internalisation et les effets biologiques sur les cellules de l'immunité et les cellules tumorales et enfin quelques données de recherche clinique.

**Le second chapitre** présente les objectifs du travail et les résultats obtenus. Il se divise en deux parties :

- D'une part un **article scientifique** soumis à *Journal of Clinical Immunology* qui s'intéresse aux **effets des fractions dépolymérisées** de très bas poids moléculaire de fucoïdane (vLMW-F : very Low Molecular Weight Fucoïdane) sur les lymphocytes B en latence III de l'EBV et sur les cellules de DLBCLs : rôle **sur la prolifération, l'apoptose et l'expression de PD-L1**. Les interrogations faisant suite à cette étude sont abordées à la suite de l'article.
- Dans la seconde partie sont présentés les résultats concernant les **molécules inhibitrices de la réponse immune exprimées par les cellules B en latence III de l'EBV** (CMH et points de contrôle inhibiteurs des réponses immunes T et NK). Les résultats préliminaires concernant l'effet des vLMW-F sur l'expression des points de contrôle inhibiteurs surexprimés, autres que PD-L1 sont également présentés. Les conclusions et discussion des résultats sont présentées par la suite.

**Le troisième chapitre** résume les **résultats majeurs et points clés** résultant de l'ensemble du travail. Il aborde également les **perspectives** envisagées à la suite de ces travaux.



# **Introduction bibliographique**





# **Partie 1. Le virus d'Epstein Barr : structure et cycle biologique**

---



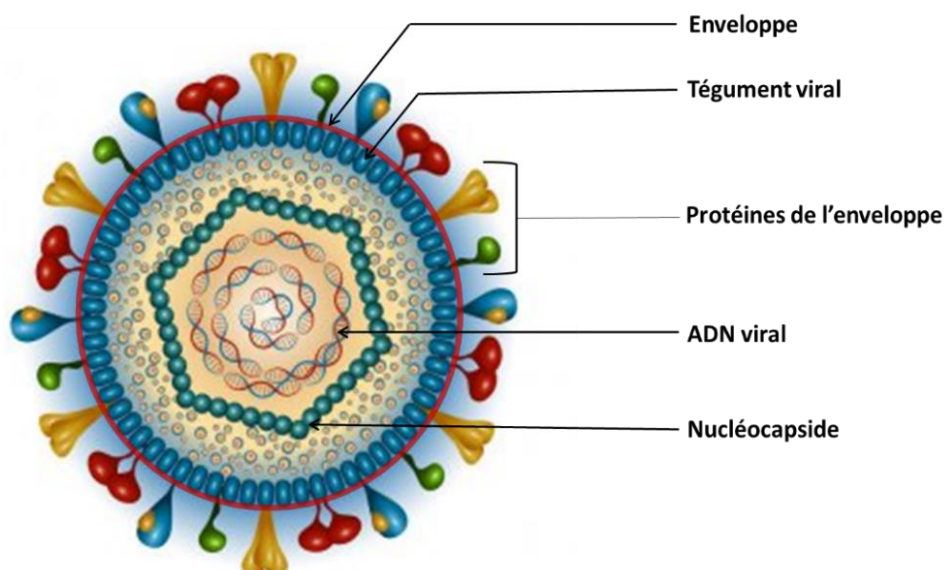
Le virus d'Epstein Barr (EBV) fait partie des virus humains les plus communs. Il infecte plus de 90% de la population mondiale adulte. Depuis plusieurs décennies, les chercheurs mènent des études pour comprendre plus la structure et les caractéristiques du cycle biologique de ce virus.

Dans cette partie nous présenterons, l'historique, la structure et le cycle biologique de l'EBV. Puis, nous décrirons l'infection et la persistance virale. Une dernière section sera consacrée particulièrement aux cellules en programme de latence III du virus.

### I- Historique du virus

Le virus Epstein-Barr (EBV) est un herpès virus aussi connu sous le nom d'herpès virus humain 4 (HHV-4). Il est le modèle du genre Lymphocryptovirus, classé dans l'ordre des Herpesvirales, de la famille des Herpesviridae, de la sous-famille des  $\gamma$ -Herpesviridae.

La famille des Herpesviridae (« Herpès » du grec ἑρπεῖν (herpein) = « ramper »), regroupe plus de 200 virus à ADN, provoquant des infections latentes et lytiques. Ils sont associés à différentes maladies chez les animaux et chez les humains. Parmi les neuf principaux types d'herpès virus connus pour infecter l'Homme, cinq sont les plus répandus : les virus de l'herpès simplex 1 et 2 (HHV-1 et HHV-2), le virus varicelle-zona (HHV-3), le virus d'Epstein Barr (HHV-4) et le cytomégalovirus humain (HHV-5) ; les trois autres sont les Herpès Virus Humains 6A/6B, 7 et 8 (HHV-6A, HHV-6B, HHV-7 et HHV-8). Généralement, les herpès virus sont caractérisés par une structure commune : un ADN bicaténaire de haut poids moléculaire (150 000 à 230 000 paires de bases), codant pour un grand nombre de protéines et entouré d'une capsidie icosaédrique (162 capsomères). De la membrane nucléaire cellulaire dérive une enveloppe et ses protéines de surface (Figure 1).



**Figure 1. Structure des Herpès virus**

Les herpès virus ont un ADN bicaténaire entouré d'une nucléocapside icosaédrique. Entre la nucléocapside et l'enveloppe extérieure, qui porte des protéines à sa surface, se situe un autre ensemble de protéines formant le tégument viral. Modifié d'après [https://www.brainkart.com/article/Herpes-Viruses\\_41044/](https://www.brainkart.com/article/Herpes-Viruses_41044/).

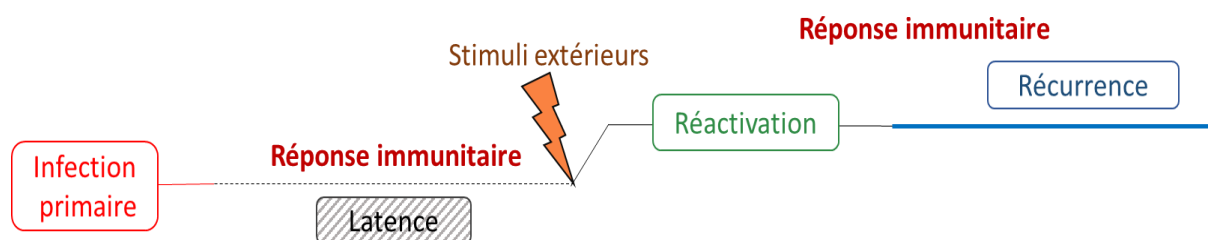
Trois sous-groupes constituent la famille des herpès virus humains : les alpha-, beta-, et gamma-herpès virus. Ils sont associés à plusieurs maladies dont les plus connues sont citées dans le **Tableau 1**.

**Tableau 1. Sous-familles des herpès virus humains et pathologies associées**

Sous-famille	Nom	Pathologie associée
α-herpèsvirus	Herpès Virus Simplex 1 (HHV-1)	Herpès buccal, herpès génital, pharyngite, eczéma herpétique, encéphalite
	Herpès Virus Simplex 2 (HHV-2)	Herpès génital et rarement buccal, pharyngite, eczéma herpétique, blancher herpétique, Méningite de Mollaret
	Herpès Virus Varicellae (VZV)	Varicelle et Zona
β-herpèsvirus	Cytomégalovirus (CMV)	Syndrome mononucléosique
	Herpès Virus Humain 6A et 6B (HHV-6)	Roséole infantile
	Herpès Virus Humain 7 (HHV-7)	Roséole infantile
γ-herpèsvirus	Virus d'Epstein Barr (EBV) (HHV-4)	Sclérose en plaques, mononucléose infectieuse, lymphome de Burkitt, lymphome de Hodgkin, Syndrome lymphoprolifératif post-transplantation (PTLD), carcinome du nasopharynx, cancer gastrique, cancer du sein
	Herpès Virus Humain 8 (HHV-8)	Syndrome de Kaposi, maladie de Castleman

La majorité des herpès virus se propagent par contacts rapprochés oraux ou sexuels, à l'exception du CMV qui se transmet par la salive ou par voie sanguine, et le VZV qui se transmet par voie respiratoire.

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), plus de 90% de la population mondiale adulte est infectée par au moins un de ces herpès virus. Une forme latente persiste chez presque tous les individus infectés. Après l'infection primaire, les herpès virus persistent à vie à l'état « dormant » dans l'organisme. Cette phase de latence protège ces virus des réponses immunitaires et des médicaments antiviraux. Suite à des stimuli extérieurs (stress, hypoxie, choc émotionnel...), ces virus peuvent être réactivés, engendrant une réinfection endogène, connue sous le nom de récurrence virale, qui sera contrôlée par le système immunitaire de l'hôte (Figure 2).



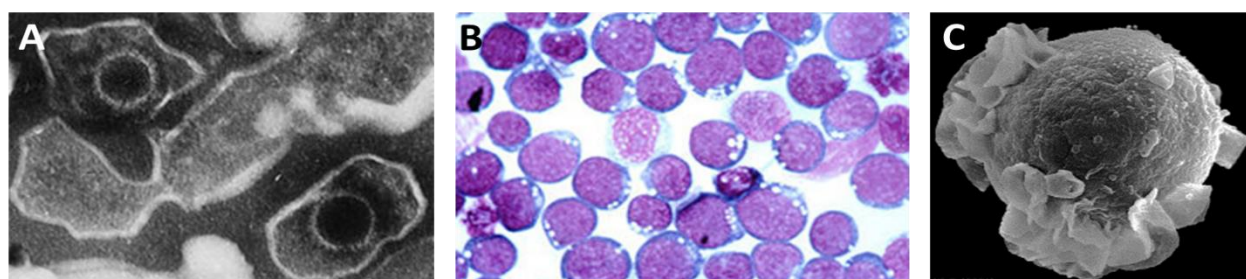
**Figure 2. Enchaînement des infections causées par la famille des Herpesviridae**

Après la primo-infection, les herpes virus demeurent sous forme latente sans être repérés par le système immunitaire. Suite à des stimuli extérieurs, les virus peuvent être réactivés et générer une récurrence placée sous le contrôle des réponses immunitaires (Figure réalisée par Jennifer SALIBA)

En 1907, le médecin italien Guisepe Ciuffo a publié pour la première fois une expérience semblant confirmer la transmission de tumeurs humaines à cause d'un virus. L'idée de l'existence des oncovirus a tout d'abord été rejetée par plusieurs scientifiques, puis acceptée en 1950, après qu'ait été démontrée la transmission de cancers murins à l'aide d'extraits acellulaires.

En 1958, Denis Burkitt, un pathologiste britannique, fut le premier à décrire un type de tumeur agressive communément retrouvée chez les enfants en Ouganda (Burkitt, 1958). Ces tumeurs, caractérisées par une multiplication très rapide et incontrôlée des globules blancs et une prévalence élevée en Afrique centrale, ont été nommées lymphomes de Burkitt (LB).

En 1961 au Royaume-Uni, Burkitt a présenté le lymphome nouvellement décrit lors d'une conférence à laquelle assistait le virologue médical Anthony Epstein, spécialisé en microscopie électronique et qui menait alors des études sur les virus associés à des tumeurs chez le poulet. Afin d'étudier la possible cause virale du LB, A. Epstein demanda à D. Burkitt des échantillons tumoraux. Ainsi, en 1964, A. Epstein et son étudiante, Yvonne Barr découvrirent le virus d'Epstein-Barr dans des lymphoblastes dérivés du lymphome de Burkitt, observés au microscope électronique (Figure 3).



**Figure 3. Cellules infectées par le virus d'Epstein Barr (EBV)**

(A) Particules virales de l'EBV à fort agrandissement. (B) Lymphocytes B infectés par l'EBV. (C) Lymphocyte B duquel sortent des particules virales de l'EBV (<https://news.cancerresearchuk.org/>)

Le virus d'Epstein Barr (EBV) a été le premier virus humain isolé, associé à une tumeur (Epstein et al., 1965).

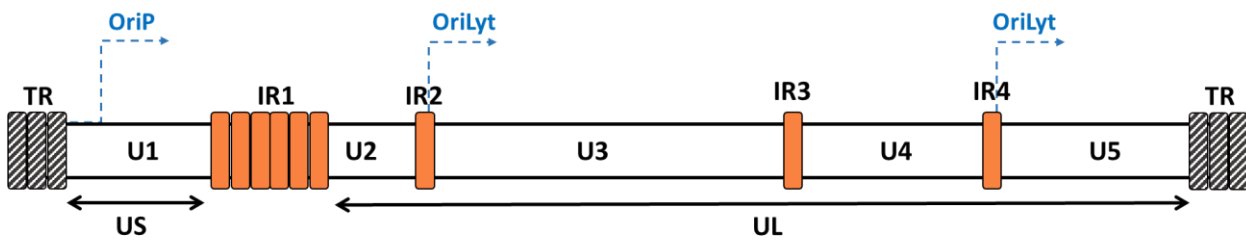
En 1967, aux Etats-Unis, Werner et Gertrude Henle, virologues, menèrent des études sur le potentiel oncogénique de l'EBV. Ils découvrirent que les lymphocytes B infectés par l'EBV étaient capables de transmettre le virus à des lymphocytes B non infectés, les rendant ainsi tumoraux. Ils découvrirent également pour la première fois la présence d'ADN de l'EBV dans des cellules prélevées sur des biopsies de LB, et le fait que ce virus soit associé à la mononucléose infectieuse (MI) (Henle and Henle, 1966). En 1972, il a été mis en évidence que le développement de ces tumeurs était corrélé à des modifications sérologiques chez les patients (de Thé, 1993, p.). Ces travaux, ainsi que d'autres études menées à la fin des années 1970, démontrèrent le rôle oncogénique de l'EBV chez l'Homme.

### II- Structure et génome

Le génome de l'EBV est un ADN linéaire, double brin, de même que pour les autres membres de la famille des Herpesviridae. D'un diamètre compris entre 120 et 200 nm, il fait 172 kbp et code pour plus de 85 gènes. Le génome viral, constituant le core, est protégé par une nucléocapside icosaédrique composée de 162 capsomères. L'enveloppe est une bicouche lipidique qui entoure la nucléocapside. Elle est acquise à la fin du cycle lytique et comporte des glycoprotéines virales, parmi lesquelles le complexe gp350/220, impliqué dans la phase précoce de l'infection. Si l'enveloppe lipidique est endommagée (acides, solvants...), la propagation est limitée et le virion perd son caractère infectieux. Entre la nucléocapside et l'enveloppe se situe le tégument viral composé de protéines virales et d'enzymes permettant sa multiplication.

Pour une plus grande capacité de codage, le génome viral est divisé en domaines de séquences unique courte (Unique Short : US) et longue (Unique Long : UL), d'une série de répétitions terminales (TR) d'environ 540 pb et de grandes répétitions internes (IR1 à IR4) (Cheung and Kieff, 1982). IR1 sépare la séquence US (comprenant la région U1) de la séquence UL (comprenant les régions U2 à U5). L'origine de réplication OriP est fonctionnelle durant la phase de latence, alors que les origines de réplication OriLyt sont fonctionnelles durant le cycle lytique (Figure 4).





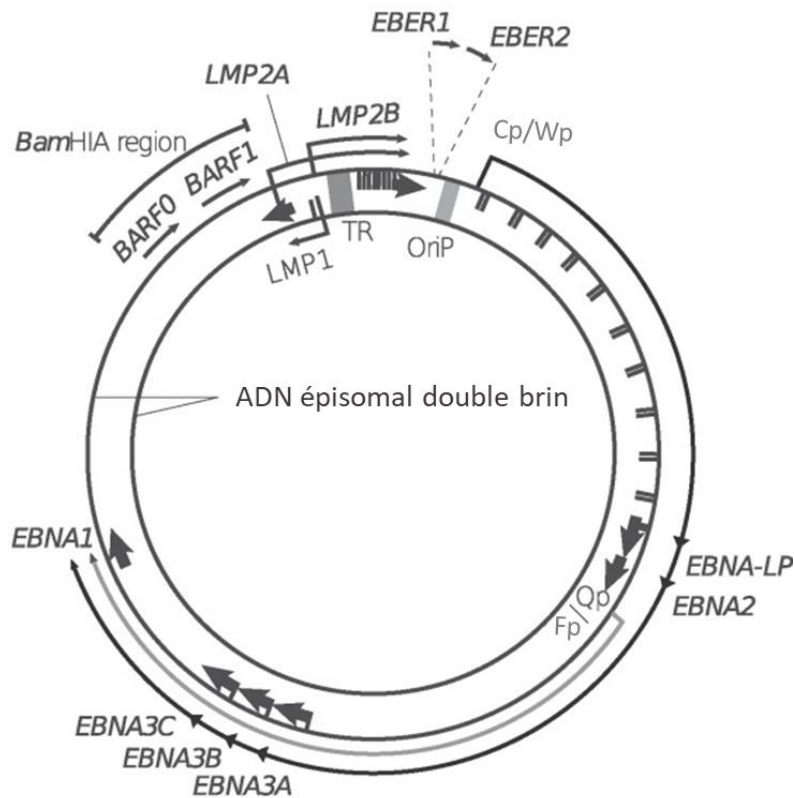
**Figure 4. Schéma du génome linéaire de l'EBV**

OriP : origine de réplication latente ; OriLyt : origine de réplication lytique.

TR : Répétition Terminale ; IR : Répétition Interne ; U : Région unique ; US : Unique Short ; UL : Unique Long

(Figure réalisée par Jennifer SALIBA)

En 1980, le génome de l'EBV a été entièrement cloné dans *Escherichia Coli* et séquencé, ce qui a permis d'identifier plusieurs cadres de lecture ouverts (Open Reading Frames - ORFs) (Dambaugh et al., 1980). La nomenclature des ORFs est basée sur une carte de fragments de l'enzyme de restriction BamHI, les fragments sont classés de A à Z, par ordre décroissant de taille. Les ORFs sont divisés en séquences d'ADN associées à des gènes de latence ou du cycle lytiques (précoces immédiats, précoces et tardifs). Après infection d'une cellule, le génome de l'EBV peut se circulariser grâce aux séquences terminales et persister sous forme épisomale circulaire tout au long de la vie de l'hôte à l'état latent (Smatti et al., 2018). Suite à des stimuli extérieurs, une réactivation du virus peut survenir et conduire à la production de nouveaux virions. L'expression des protéines de l'EBV (Epstein-Barr Nuclear Antigens - EBNA) est contrôlée par quatre promoteurs (Cp, Wp, Fp et Qp). L'expression transcriptionnelle de ces protéines conditionne l'état du cycle du virus dans les cellules immortalisées (Figure 5).



**Figure 5. Schéma du génome de l'EBV sous sa forme épisomale**

Il est possible d'identifier les régions codant les protéines de latence EBNA (Epstein Barr Nuclear Antigen : EBNA-LP ; -1 ; -2 ; -3A ; -3B et -3C) et LMPs (Latent Membrane Protein : LMP1, -2A et 2B), la région correspondante aux ARNs transcrits non traduits (EBV Encoded RNA : EBER1, - 2) et la région BamHIA constituée de BARF0 (BamHI-A Rightward Frame 0) et BARF1 (BamHI-A Rightward Frame 1). Cp, Wp, Qp et Fp sont les promoteurs du génome. OriP est l'origine de répllication.

Modifié d'après NCBI Bookshelf. A service of the National Library of Medicine, National Institutes of Health.

En fonction des différences dans la séquence des gènes codant pour les EBNA, deux principaux types d'EBV ont été détectés chez l'homme : EBV-1 (type A) et EBV-2 (type B). *In vitro*, EBV-1 est plus efficace dans l'immortalisation des lymphocytes B et l'obtention de LCLs (Lymphoblastoid Cell Lines) (Rickinson et al., 1987).

### III- Cycle biologique

L'infection par l'EBV et sa persistance dans l'organisme durant toute la vie de l'hôte met en jeu différentes étapes liées au cycle biologique de l'EBV. Ces dernières sont détaillées dans cette partie. Elles concernent : l'entrée du virus dans les cellules, son cycle lytique, les différentes latences virales qu'il est capable d'établir, ainsi que sa réactivation.

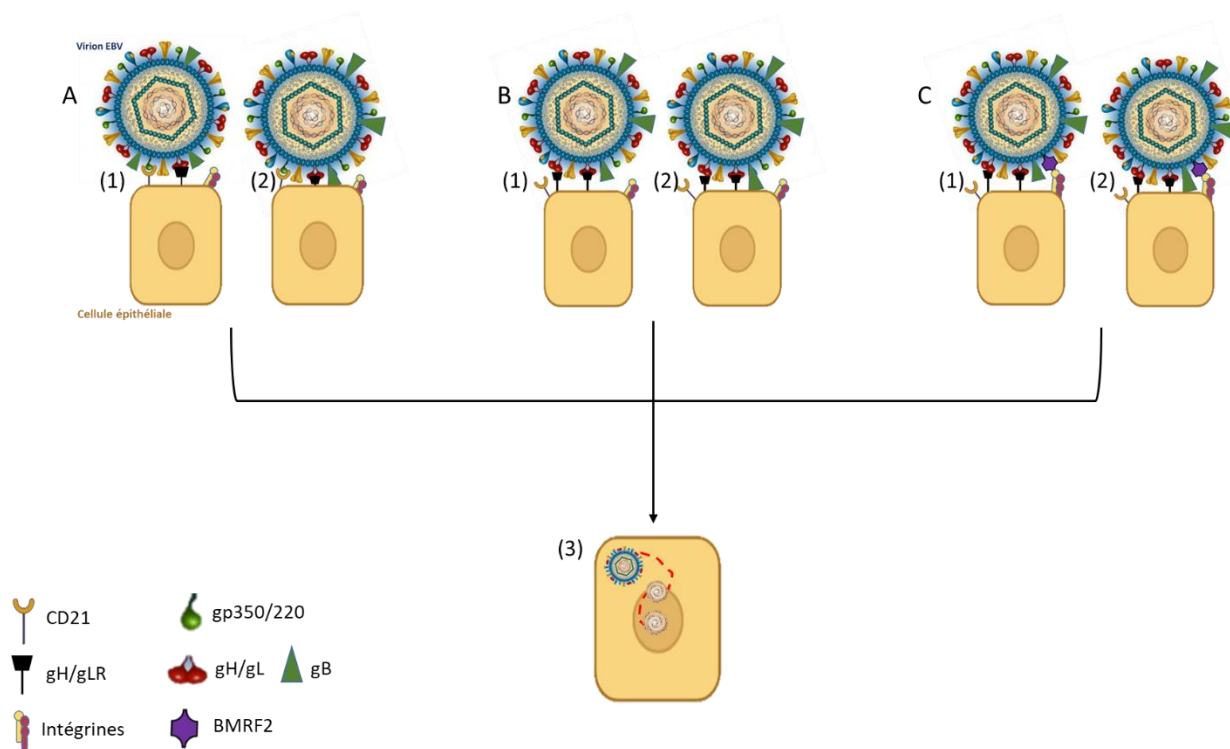
#### III-1. Entrée dans les cellules cibles

##### III-1. a) Cibles conventionnelles

Les cellules épithéliales et les lymphocytes B sont les cellules cibles conventionnelles pouvant être infectées par l'EBV, et ceci s'effectue selon deux mécanismes d'entrée différents.

##### III-1. a) i- Les cellules épithéliales

L'entrée du virus dans les cellules épithéliales a lieu à pH neutre et ne nécessite pas d'endocytose. Trois voies ont été décrites. La première met en jeu la liaison entre le complexe viral gp350/220 et le CD21 cellulaire (les cellules épithéliales glandulaires constituent une sous-population pouvant exprimer faiblement le CD21). Après interaction du CD21 avec le complexe gp350/220, le virus se rapproche de la membrane cellulaire et une interaction de l'hétérodimère gH/gL a lieu avec gH/gLR (récepteur spécifique des glycoprotéines gH/gL présent à la surface des cellules épithéliales). Le complexe viral gH/gL-gB se forme et intervient dans l'interaction avec la membrane cellulaire et sa fusion avec l'enveloppe virale. La deuxième voie est une interaction directe gH/gL-gH/gLR, permettant la fusion en faisant intervenir la formation du complexe viral gH/gL-gB. La troisième voie met en jeu les protéines virales BMRF-2 et leur interaction avec les intégrines cellulaires  $\alpha\beta 1$ , les gH/gL peuvent également interagir avec les intégrines cellulaires  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 6$  et  $\alpha\beta 8$ . Ces interactions, associées aux interactions gH/gL-gH/gLR et à la formation du complexe gH/gL-gB conduisent à la fusion du virus et de la cellule. Suite à l'entrée du virus dans la cellule, la nucléocapside se dissout dans le cytosol et le génome viral est transporté au noyau (Chen and Longnecker, 2019; Chesnokova and Hutt-Fletcher, 2014; Hutt-Fletcher, 2007) (Figure 6).



**Figure 6. Les étapes d'entrée de l'EBV dans les cellules épithéliales**

(A) Entrée via le CD21 et gH/gLR : (1) Le virus se lie à CD21 par gp350 puis par gp220 ce qui lui permet de se rapprocher de la membrane cellulaire où l'hétérodimère gH/gL peut interagir avec gH/gLR. (2) Cette interaction déclenche celle de gH/gL avec gB, puis la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire.

(B) Entrée via gH/gLR seul : (1) gH/gL interagit directement avec gH/gLR. (2) L'interaction gH/gL-gH/gLR déclenche celle de gH/gL avec gB et la fusion avec la membrane cellulaire.

(C) Entrée via les intégrines et gH/gLR : (1) BMRF2 interagit avec les intégrines  $\alpha\beta 1$  (gH/gL peut également interagir avec les intégrines cellulaires  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 6$  et  $\alpha\beta 8$ ), gH/gL interagit par ailleurs avec gH/gLR. (2) L'interaction gH/gL-gH/gLR déclenche l'interaction de gH/gL avec gB et la fusion avec la membrane cellulaire.

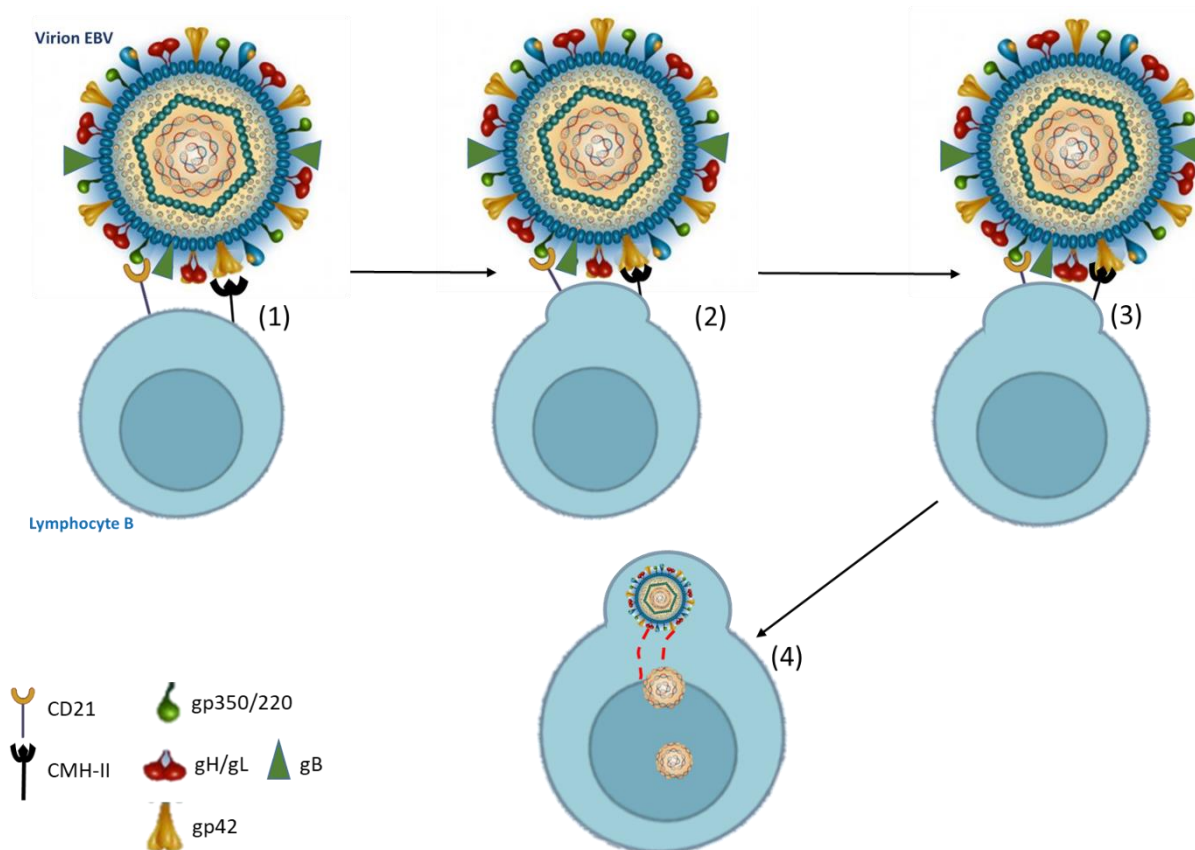
L'étape (3) est identique pour toutes les voies : le virus fusionne avec la membrane, entre dans la cellule, la capsid se dissout durant le transport dans le cytoplasme vers le noyau, et le génome viral est libéré dans le noyau via un pore nucléaire.

(Figure réalisée par Jennifer SALIBA)

### III-1. a) ii- Les lymphocytes B

L'entrée de l'EBV dans les lymphocytes B fait intervenir six glycoprotéines de l'enveloppe virale et pour la cellule B, le CD21 ainsi que le complexe CMH-II. Elle est médiée par le complexe glycoprotéique gp350/220 qui se lie, avec une grande affinité, au récepteur cellulaire CD21. Cette liaison place le virus à environ 50 nm de la surface cellulaire. Grâce à la flexibilité conférée au CD21 par les courtes répétitions de son domaine extracellulaire et à la possibilité d'un échange de liaison entre gp350 et gp220, le virus peut se

rapprocher de la membrane cellulaire. La fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire nécessite l'intervention de trois autres protéines virales : gB, l'hétérodimère gH/gL et la glycoprotéine gp42. Cette dernière interagit avec les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II (CMH-II) puis se lie directement à gH, transformant le dimère gH/gL en un trimère gH/gL/gp42. Ceci déclenche l'interaction de gB avec gH/gL et permet la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. Le génome viral dans la nucléocapside est transporté dans le cytosol et puis est libéré dans le noyau via les pores nucléaires (Chen and Longnecker, 2019; Chesnokova and Hutt-Fletcher, 2014; Hutt-Fletcher, 2007) (Figure 7).



**Figure 7. Les étapes d'entrée de l'EBV dans les lymphocytes B**

(1) Le virus se lie par gp350 à CD21, et puis la liaison gp220-CD21 le rapproche de la membrane cellulaire. (2) Gp42 interagit avec le CMH-II ainsi qu'avec gH/gL pour déclencher (3) une interaction de gH/gL avec gB et (4) la fusion du virus avec la membrane cellulaire ; la capside est transportée dans le cytosol jusqu'au noyau, elle se dissout et libère le génome viral dans le noyau de la cellule.

(Figure réalisée par Jennifer SALIBA)

L'implication des complexes dimériques (gH/gL) pour initier la fusion du virus avec les cellules épithéliales, *versus* des complexes trimériques (gH/gL/gp42) pour initier la fusion avec les cellules B, permet au virus d'avoir un tropisme différent entre ces deux groupes cellulaires : les lymphocytes B sont plus facilement infectés que les cellules épithéliales (Chesnokova and Hutt-Fletcher, 2014; Hutt-Fletcher, 2007).

Le récepteur cellulaire CD35 peut être un facteur supplémentaire de liaison à gp350/220. Il peut assurer l'entrée du virus dans les lymphocytes CD21 négatifs, tels que les B immatures (Chesnokova and Hutt-Fletcher, 2014; Hutt-Fletcher, 2007).

### III-1. b) Cellules cibles non conventionnelles

Vu la très grande diversité des pathologies associées à l'EBV, qui seront développées dans la section II de la Partie 2 « Surveillance immune de l'infection par l'EBV et échappement tumoral », il est évident que l'EBV a des cibles cellulaires autres que les cellules épithéliales et les lymphocytes B. Elles sont regroupées sous le nom de « cibles non conventionnelles » et regroupent les monocytes, les lymphocytes T et les cellules NK,

#### III-1. b) i- Les monocytes

L'EBV latent a été retrouvé chez des lignées de monocytes issus de la moelle osseuse d'enfants souffrant de défauts de maturation de l'hématopoïèse (Revoltella et al., 1989). Des études ont révélé la capacité de l'EBV à se répliquer dans des monocytes humains fraîchement isolés. Durant les premiers stades de l'infection des monocytes, l'EBV altère leurs fonctions biologiques en réduisant significativement leur capacité phagocytaire (Savard et al., 2000). Tugizov et ses collaborateurs ont détecté des monocytes EBV<sup>+</sup> chez la plupart des individus infectés par le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) et ont montré que l'EBV infecte d'abord les monocytes sous-muqueux, qui migrent et propagent le virus aux cellules épithéliales orales, déclenchant une infection virale (Tugizov et al., 2007). D'autres travaux ont aussi démontré que l'EBV infecte les monocytes humains primaires, de même que la lignée cellulaire monocyttaire THP-1, induisant la production d'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), dépendante de la caspase-1, et par la suite l'activation des inflammasomes. Ces derniers sont des capteurs cytoplasmiques régulant l'activité de la caspase-1 et la sécrétion d'IL-1 $\beta$  en réponse à des agents viraux pathogènes (Torii et al., 2017). Li et son équipe ont également rapporté une inhibition de la différenciation des monocytes infectés par l'EBV en cellules dendritiques, suite à une réponse anormale au GM-

CSF (granulocyte-monocyte colony-stimulating factor) et à leur apoptose (Guerreiro-Cacais et al., 2004; Li et al., 2002).

### III-1. b) ii- Les lymphocytes T

L'infection des lymphocytes T par l'EBV a été découverte pour la première fois dans le cas de la maladie de Kawasaki causant des maladies cardiaques chez l'enfant et ayant les mêmes symptômes chroniques que la MI (Kikuta et al., 1988). Il a été prouvé que l'EBV peut infecter les lymphocytes T *in vivo* et causer une prolifération non contrôlée de ces cellules immortalisées, grâce à l'établissement de lignées cellulaires T EBV<sup>+</sup> issues du sang périphérique de patients atteints d'une infection sévère chronique par l'EBV. Les cellules de lignées de T EBV-positives expriment les gènes de latence EBNA1 et LMP1 (Montpellier et al., 1998). Le récepteur à l'EBV CD21 a été découvert à la surface de lymphocytes T périphériques (Fischer et al., 1991), leucémiques (Toben and Smith, 1977) et plusieurs lignées T lymphoblastoïdes (Fingeroth et al., 1988). Selon Coleman et al., l'EBV-2 est capable de cibler et d'infecter facilement les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> primaires *in vitro* entraînant l'expression de gènes de latence, la forte prolifération des T et l'altération de l'expression des cytokines (Coleman et al., 2015).

### III-1. b) iii- Les cellules NK

Certains auteurs affirment que les cellules NK sont des cibles naturelles de l'EBV, en particulier lors de l'infection primaire et lorsque les cellules NK tentent de tuer une cellule infectée par l'EBV (Tremat et al., 2002). D'autres études menées *in vitro*, ont rapporté que les cellules NK peuvent acquérir le CD21 des lymphocytes B par transfert synaptique, permettant qu'une interaction se mette en place avec le virus et conduise à leur infection (Tabiasco et al., 2003). Isobe et ses collaborateurs ont montré que l'EBV est capable d'infecter les cellules NK et ont détecté des transcrits des gènes codant pour EBNA1, BZLF1 et BALF2 initiés par Qp mais pas de transcrits pour EBNA2, LMP1 ou LMP2A. De plus, les cellules NK sont entrées en phase précoce d'apoptose après 72h d'infection. Le récepteur CD21 était absent à la surface des cellules NK infectés mais il a été retrouvé l'expression du CMH-II, permettant l'entrée du virus dans les cellules NK par interaction avec le complexe viral gp85/gp25/gp42 (Isobe et al., 2004).

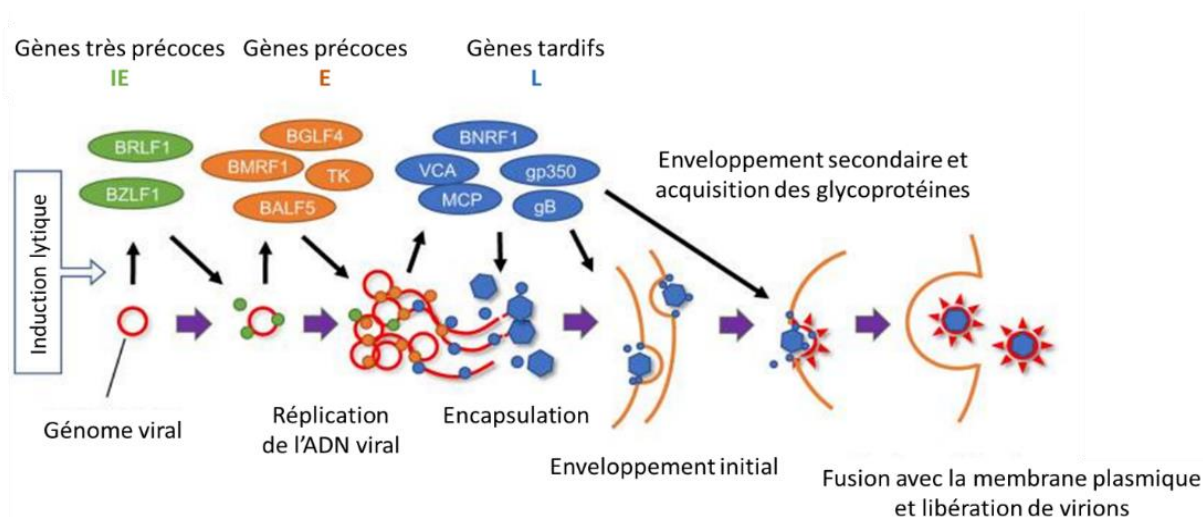
### III-2. Cycle lytique

Le cycle lytique, connu sous le nom d'infection productive, correspond à la phase de réplication du virus et de production de virions infectieux. Chez les lymphocytes B, la réplication lytique survient normalement après la réactivation de la phase de latence, tandis que chez les cellules épithéliales, elle a lieu directement après l'entrée du virus. Afin que la réplication lytique et la transmission horizontale de cellule à cellule et d'individu à individu s'effectuent, le génome de l'EBV, circulaire dans la phase de latence, doit se linéariser. La copie du génome virale est assurée par l'ADN polymérase virale (Drouet, 2019).

La production des gènes lytiques se fait en trois étapes consécutives : très précoce (IE : Immediate Early), précoce (E : Early) et tardive (L : Late). Les gènes viraux très précoces sont les premiers à être exprimés : *BZLF1* (codant pour la protéine ZEBRA également appelée Zta, Z, ou EB1) et *BRLF1* (codant pour la protéine Rta, également appelée R ou EB2). Les activateurs transcriptionnels ZEBRA et Rta induisent l'expression des gènes précoces codant en particulier pour la sous-unité catalytique de l'ADN polymérase (BALF5) et la protéine de liaison à l'ADN simple brin (BALF2). Les enzymes et protéines produites favorisent la réplication du virus dans des sites particuliers du noyau : les compartiments de réplication.

Sept protéines virales sont nécessaires pour une réplication efficace : ZEBRA, BMRF1, BALF2, BALF5, BBLF4, BSLF1 et BBLF2/3, ainsi que certains facteurs cellulaires : les kinases cycline-dépendantes (Cdk), les facteurs de réparation de l'ADN, les protéines chaperonnes et les isomérases. Six autres protéines sont nécessaires à l'expression des gènes tardifs : BcRF1, BVLF1, BFRF2, BDLF3.5, BDLF4, BGLF3. La transcription des gènes tardifs fait suite à la réplication de l'ADN viral. Les gènes tardifs permettent d'assurer différentes fonctions structurales en codant pour la protéine majeure de la capsid, l'antigène de la capsid virale et des glycoprotéines (Murata, 2014; Rosemarie and Sugden, 2020). Le génome viral est clivé pour donner l'ADN viral sous sa forme linéaire. Les ADN viraux sont encapsulés dans le nucléoplasme, les nucléocapsides acquièrent une première enveloppe par bourgeonnement dans l'espace périnucléaire, puis il y a désenveloppement, recouvrement par le tégument, et enveloppement final par bourgeonnement dans des compartiments intracellulaires. Les vésicules contenant les virions mûres sont ensuite transportées à la surface de la cellule, fusionnées avec la membrane plasmique et les virions sont libérés dans l'espace extracellulaire (Figure 8).



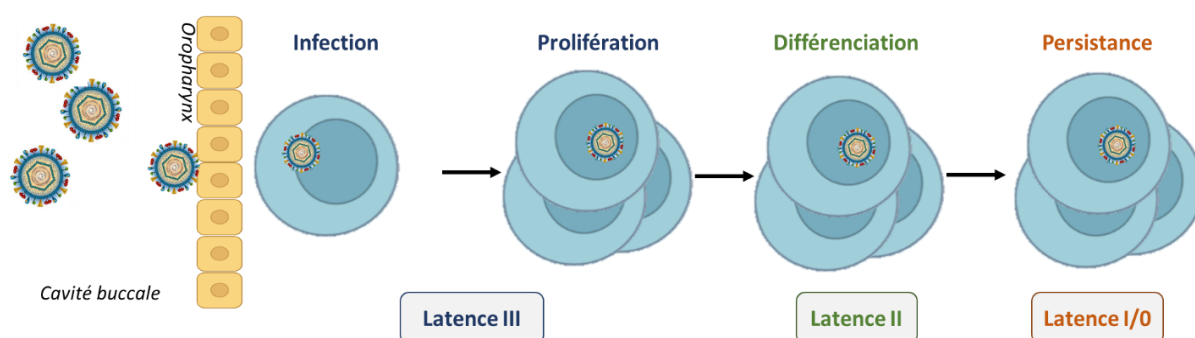


**Figure 8. Représentation schématique du cycle lytique de l'EBV**

L'expression des gènes très précoces *BRLF1* et *BZLF1* (vert) induit l'expression de gènes précoces (orange). Les protéines codées par les gènes précoces favorisent la réplication de l'ADN viral ainsi que l'expression des gènes tardifs permettant l'encapsulation, l'acquisition de glycoprotéines et la formation de nouvelles particules virales. IE: Immediate Early; E: Early; L: Late. Modifié d'après (Murata et al., 2021).

### III-3. Latence virale

La latence virale favorise la persistance du virus dans les lymphocytes B et les cellules épithéliales de l'hôte : elle est caractérisée par l'expression d'un nombre restreint de gènes qui forment des profils différents, en fonction desquels cinq types de latence sont définis : les latences 0, I, II, III et la latence atypique. Ces types de latence virale dans les lymphocytes B infectés par l'EBV sont représentés dans la Figure 9.



**Figure 9. Cycle de la latence virale après infection par l'EBV : exemple des lymphocytes B**

L'infection des cellules B naïves entraîne leur prolifération lymphoblastoïde, le virus entre en phase de latence III (il y a prolifération cellulaire, contrôlée par le système immunitaire chez les individus immunocompétents). Puis, les lymphocytes B se différencient en B mémoires au sein du centre germinatif, le virus entre alors en phase de latence II. Enfin les cellules B mémoires deviennent des cellules à longue durée de vie au repos, le virus entre en latence I/0 (Inspiré de Li et al., 2020).

Chaque programme de latence conduit à l'expression d'un nombre réduit et distinct de protéines virales (Tableau 2) et d'ARNs viraux non codants (EBER : Epstein-Barr Virus (EBV)-encoded small RNA et BART : BamHI-A Right Transcripts), exprimés durant toutes les phases de latence, excepté la latence atypique. Ces protéines et ARN contrôlent la prolifération et la survie des cellules infectées.

**Tableau 2. Expression des protéines virales de l'EBV en fonction des différents programmes de latence**

Protéines virales Type de latence	EBNA1	EBNA2	EBNA3 A, B, C	EBNA-LP	LMP1	LMP2A	LMP2B
Latence III	+	+	+	+	+	+	+
Latence II	+	-	-	-	+	+	+
Latence I	+	-	-	-	-	-	-
Latence 0	-	-	-	-	-	-	-
Latence atypique	+	-	+	+	-	-	-

Contrairement au cycle lytique, le génome viral de l'EBV reste dans le noyau sous forme circulaire épisomale et il est copié par l'ADN polymérase cellulaire. Bien que les programmes de latence diffèrent entre les lymphocytes B et les cellules épithéliales, l'infection latente reste nécessaire pour la persistance virale.

### III-3. a) Latence III

Le programme de latence III est le programme d'immortalisation des lymphocytes B infectés par l'EBV durant l'infection primaire. *In vitro*, les cellules B immortalisées par l'EBV conduisent à l'établissement de Lignées Cellulaires Lymphoblastoïdes (LCLs) en latence III (programme de prolifération cellulaire) (Murata et al., 2021). La latence III est associée à différents types de lymphomes chez les sujets immunodéprimés, le système immunitaire ne permettant pas d'en contrôler la prolifération. Ceci peut être le cas chez des patients post-transplantés (PTLD : Post Transplant Lymphoproliferative disorder) ou atteints du Virus d'Immunodéficience Humaine (VIH) (Tse and Kwong, 2015). Les cellules transformées par l'EBV et en phase de latence III expriment

l'ensemble des protéines de latence et des ARNs viraux non codants. Les neuf protéines de latence exprimées sont : les EBNAs (Epstein-Barr Nuclear Antigen : EBNA1, 2,3A, 3B, 3C et -LP, et les LMPs (Latent Membrane Protein) : LMP1, 2A et 2B. Ces protéines contribuent à la prolifération, la migration et la survie des cellules B. L'expression de l'ensemble des protéines de la latence III est initiée par les promoteurs Cp et Wp. EBNA2 est directement responsable de l'initiation de la transcription de la majorité des gènes codant pour les protéines de la latence III (Rowe et al., 2014).

Le rôle des différentes protéines et ARNs viraux, ainsi que les voies de signalisation cellulaires induite en latence III de l'EBV seront détaillés dans le paragraphe V « Cellules B en latence III de l'EBV ».

### III-3. b) Latence II

La latence II de l'EBV est associée à la phase de différenciation cellulaire chez les lymphocytes B. Elle est caractérisée par l'expression des trois LMPs et d'EBNA1. Le promoteur Qp initie l'expression des protéines en latence II. La transcription de LMP1, oncoprotéine majeure de l'EBV, est activée par les cytokines IL-4, -10, -13, -15 et -21. LMP2A contribue à la survie des lymphocytes B immortalisés (Amiel, 2013). Les cellules en latence II de l'EBV sont retrouvées dans les carcinomes nasopharyngés, le lymphome de Hodgkin et les lymphomes T/NK associés à l'EBV.

### III-3. c) Latence I

La latence I est caractérisée par l'expression des EBERs, des BARTs et leurs microARNs, et d'EBNA1. De même que pour la latence II, le promoteur Qp est à l'origine du profil d'expression des protéines de la phase de latence I. Les cellules en phase de latence I de l'EBV se trouvent au niveau du réservoir B mémoires. Elles maintiennent le génome viral sans être éliminées par le système immunitaire (perte de leur fonction immunogène suite à la perte d'expression de nombreuses protéines de latence). Durant la phase de latence I, seule EBNA1 est exprimée et joue un rôle important dans la réplication du génome viral et la survie des lymphocytes B. Durant la division mitotique des lymphocytes B, EBNA1 ancre l'épisome à la chromatine pour permettre une ségrégation efficace. La latence I est associée aux cellules issues des lymphomes de Burkitt et du carcinome gastrique (Amiel, 2013).

### III-3. d) Latence 0

La phase de latence 0 est caractérisée par l'unique expression des EBERs, des BARTs, et des transcrits de LMP2A, sans aucune expression des protéines de latence. Les ARNs de LMP2A sont peu immunogènes et non détectables par le système immunitaire de l'hôte, ce qui contribue à l'échappement à l'immunosurveillance. Les cellules en latence 0 se situent dans le compartiment des cellules B mémoires tout au long de la vie de l'hôte sans être éliminées par le système immunitaire. Ce type de latence ne cause pas de pathologies particulières (Amiel, 2013).

### III-3. e) Latence atypique

Environ 15 % des tumeurs primaires de lymphomes de Burkitt humains contiennent des virus présentant une délétion de leur génome dans la région codant EBNA2. Il s'agit d'une forme de latence virale connue sous le nom de « latence Wp-restreinte ». Dans ce type de latence, la suppression du gène EBNA2 permet au promoteur W latent (Wp) de piloter l'expression des protéines EBNA1, EBNA3A, 3B, 3C, EBNA-LP délété et BHRF1. En outre, les lignées cellulaires de lymphome de Burkitt restreintes par Wp contiennent parfois des génomes viraux réarrangés ("W-Zhet") dans lesquels BZLF1 est recombinée à côté du promoteur de latence Wp, ce qui entraîne l'expression active de BZLF1 et une infection virale lytique élevée. Toutes les cellules en latence Wp-restreinte résistent généralement à l'apoptose (Li et al., 2020).

### III-3. f) Réactivation : cycle latent/ cycle lytique

Le virus de l'EBV à l'état latent peut être réactivé et passer en phase lytique. Sa réactivation dans l'organisme est déclenchée par des facteurs environnementaux (hypoxie, radiation), psychologiques (stress et douleur, chocs émotionnels), immunitaires (immunosuppression), directement liés au virus (expression de protéines virales) ou à l'organisme hôte (changements hormonaux comme lors de la ménopause, réponse mettant en jeu des ROS, signalisation du BCR). Elle concerne en particulier les individus souffrant de maladies auto-immunes ou de cancers.

Le lien trouvé entre le stress, la douleur et la réactivation de l'EBV est expliqué par des études montrant des titres d'anticorps anti-EBV augmentés chez les personnes âgées signalant plus de douleur (Sausen et al., 2021).

Il a été démontré que la stimulation de la transcription des promoteurs des gènes *BZLF1* et *BRLF1* est induite par LMP1 chez de nombreuses lignées cellulaires épithéliales et certaines lignées cellulaires B (Sausen et al., 2021). En accord avec ces résultats, d'autres auteurs ont montré chez des patients souffrant de carcinomes nasopharyngés ou de lymphoproliférations post-transplantation associés à l'EBV que les gènes très précoces *BZLF1* et *BRLF1* sont impliqués dans le passage de la latence au cycle lytique. La protéine ZEBRA codée par *BZLF1* active l'expression de la protéine Rta codée par le gène *BRLF1* et ceci induit la réactivation du cycle lytique (Kerr, 2019). La réactivation du cycle lytique favorisée par LMP1 passe également par l'induction de ROS (Reactive Oxygen Species). En effet, LMP1 régule positivement la production de ROS et il a été montré que lorsque des cellules de carcinome nasopharyngé infectées par l'EBV sont traitées *in vitro* avec de l' $H_2O_2$ , il y a augmentation de la production de ROS et stimulation de l'expression des protéines du cycle lytique.

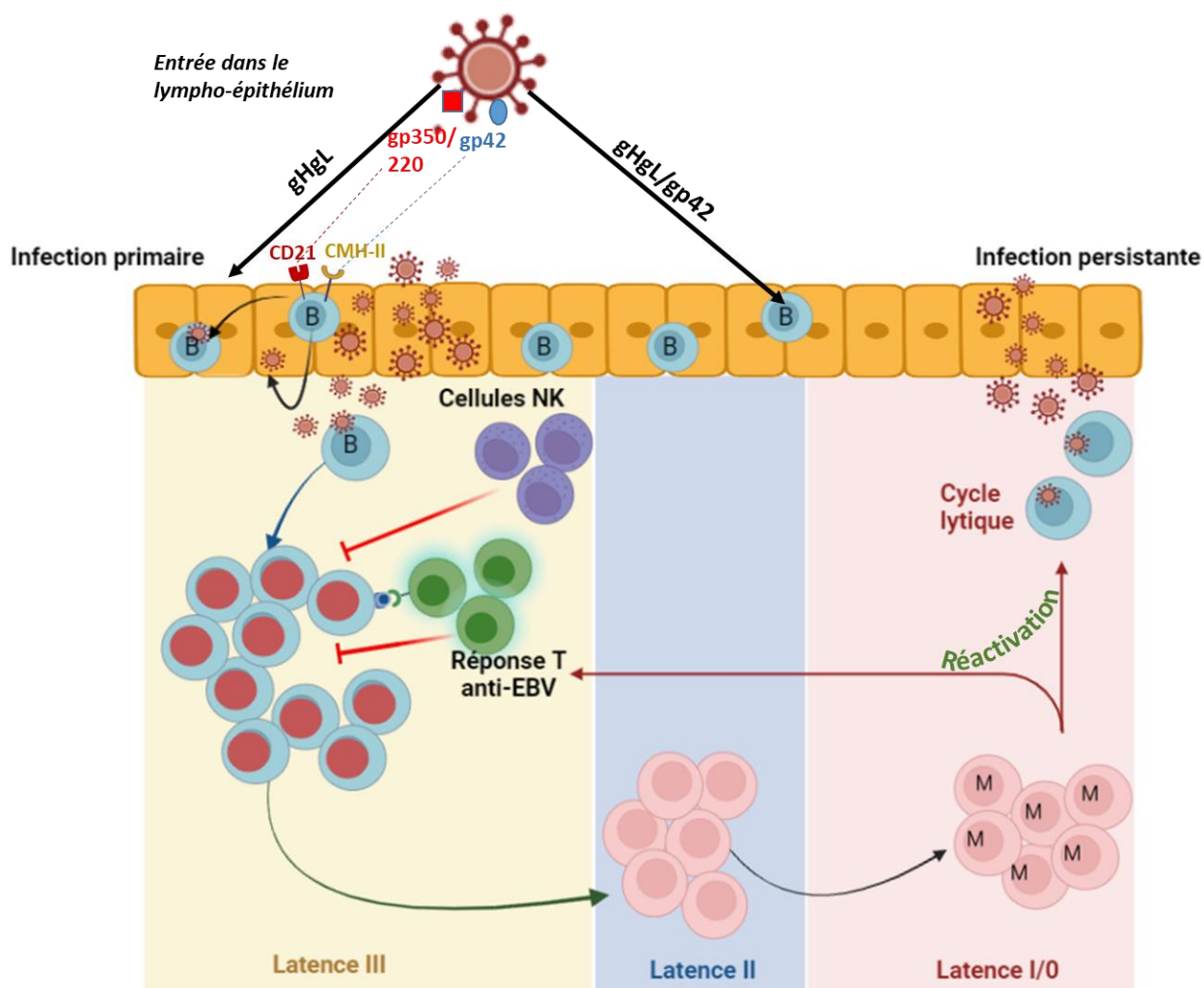
La signalisation du récepteur des cellules B (BCR : B Cell Receptor) contribue également à la réactivation du cycle lytique de l'EBV. Lorsqu'un antigène se lie au BCR., les kinases SRC phosphorylent le CD79, ce qui active SYK, qui à son tour va activer les voies de signalisation PI3K/AKT et l'expression de Btk. Ceci conduit à l'activation de molécules qui influencent l'expression des gènes codant pour NF- $\kappa$ B et ERK, ce qui va conduire à leur différenciation en plasmocytes et au déclenchement de la réactivation de l'EBV (Sausen et al., 2021).

Récemment, des études ont rapporté un effet de la pandémie de la maladie à coronavirus 19 (COVID-19) sur la réactivation de l'EBV : chez 28 patients, sur 34 admis pour une insuffisance respiratoire liée au COVID-19, il a été possible de détecter l'ADN de l'EBV (Simonnet et al., 2021).

#### IV- Infection et persistance virale

L'EBV infecte plus de 95% de la population mondiale. Généralement, l'infection primaire est asymptomatique et survient durant l'enfance. Après l'âge de l'adolescence, une maladie lymphoproliférative bénigne peut survenir à cause de l'infection : il s'agit de la mononucléose infectieuse. L'EBV infecte les cellules B sous-jacentes aux cellules épithéliales oropharyngées, l'ADN viral se circularise ensuite et prend la forme épisomale, ainsi le virus entre en phase de latence III. Les cellules B en latence III de l'EBV se multiplient rapidement dans les tissus lymphoïdes oropharyngés comme les amygdales et peuvent également se retrouver dans le sang.

Chez les hôtes immunocompétents, ces cellules en latence III sont éliminées par les lymphocytes T anti-EBV et par activation des cellules NK. Les lymphocytes B infectés peuvent réguler négativement les protéines immunogènes instaurant le programme de latence II. Elles vont migrer vers les centres germinatifs et passer en programme de latence I/II durant lequel les processus de transcription sont beaucoup plus limités. Les lymphocytes B infectés persistent ensuite dans le compartiment des cellules B mémoires, correspondant aux programmes de latence virales 0 (quiescence) ou I (réplication) où elles vont résider tout au long de la vie de l'hôte. Les cellules B mémoires circulant entre le sang et les tissus lymphoïdes oropharyngés, il peut y avoir au sein de ces derniers déclenchements de la réactivation et de la réplication virales. Cette réactivation peut conduire à la libération de virions, et est contrôlée par la réponse T anti-EBV, établissant un équilibre hôte/virus. Chez les individus immunocompétents, cet équilibre permet au système immunitaire de l'hôte de contrôler la prolifération des cellules infectées par le virus. En cas de déficit immunitaire de l'hôte, cet équilibre immunitaire se rompt, les cellules en latence III échappent au contrôle du système immunitaire, et il peut y avoir émergence de lymphomes. La persistance du virus tout au long de la vie de l'hôte est favorisée par le cycle d'infection du virus et son état de repos dans les cellules B mémoires (Thorley-Lawson, 2015) (Figure 10).



**Figure 10. Etapes de l'infection primaire et persistance de l'EBV chez les individus immunocompétents**

L'infection primaire du lympho-épithélium est établie lorsque l'EBV entre dans les lymphocytes B par la liaison de son complexe glycoprotéique  $gp350/220$  au récepteur  $CD21$  présent à la surface des lymphocytes B. La glycoprotéine  $gp42$  se lie au  $CMH-II$  du lymphocyte B et au complexe  $gH/gL$ . Les cellules épithéliales sont infectées via le complexe  $gH/gL$ . Les B infectés rentrent en programme de latence III du virus (prolifération cellulaire), et comme elles sont hautement immunogènes, elles sont alors éliminées par la réponse T anti-EBV et l'activation des cellules NK. Les cellules B infectées baissent l'expression des protéines immunogènes et passent en phase de latence II. L'infection silencieuse des cellules B mémoires assure la persistance virale où l'ADN viral reste circulaire (latence I/latence 0). Suite à la réactivation virale, certaines cellules en latence 0 repassent en phase lytique, ou en phase de prolifération cellulaire (latence III) contrôlée par la réponse T anti-EBV. La production de virions à nouveau entraîne de nouveaux foyers infectieux libérant des particules virales au niveau de la gorge (Réalisée sur Biorender.com).

### V- Cellules B en latence III de l'EBV

Notre étude étant centrée sur les lymphocytes B en latence III de l'EBV, cette section est consacrée à ce programme de latence. Nous aborderons les caractéristiques phénotypiques de ces cellules, les fonctions biologiques des protéines virales nucléaires et membranaires exprimées et les voies de signalisation cellulaires activées. Nous préciserons également les fonctions biologiques des ARN viraux non codants exprimés.

#### V-1. Phénotype des cellules B en latence III

L'immunophénotype des lymphocytes B en latence III de l'EBV se caractérise par une surexpression du CD19 et du CD20 chez environ 70% des LCLs. De même que pour les lymphocytes B non infectés ils n'expriment ni les marqueurs des lymphocytes T (CD3), ni ceux des cellules NK (CD56 et CD16) ou des monocytes (CD14) (Hussain et al., 2012; Hussain and Mulherkar, 2012). Des études ont également montré que les cellules de LCLs surexpriment le HLA-DR (Human Leucocyte Antigen- D-Related, molécule de classe II du CMH), et que pour plus de 90% des LCLs il y a expression des chaînes légères des immunoglobulines (kappa et/ou lambda). Il existe par contre une variabilité dans l'expression du CD40 et une forte hétérogénéité dans l'expression du CD23, molécule clé pour la croissance et l'activation des cellules B (65% des LCLs).

Les travaux menés au sein du laboratoire ont mis en évidence que l'oncoprotéine LMP1 conduit à la surexpression du récepteur pro-apoptotique CD95/Fas à la surface des lymphocytes B en latence III de l'EBV, ce qui les sensibilise à l'apoptose via l'axe Fas/FasL lors de l'interaction avec les lymphocytes T cytotoxiques (Le Clorennec et al., 2006). Il a par ailleurs été démontré que ces cellules surexpriment l'immuno-inhibiteur PD-L1 (B7-H1), qui est à l'opposé un point de contrôle inhibiteur de la réponse T anti-tumorale (Durand-Panteix et al., 2012).

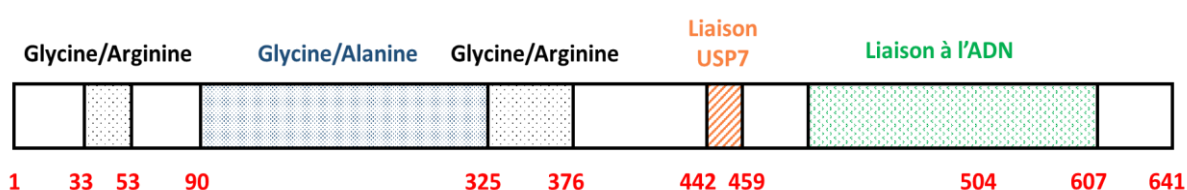


### V-2. Protéines virales exprimées lors de la latence III

#### V-2. a) Protéines nucléaires

##### V-2. a) i- EBNA1

EBNA1 (Epstein-Barr Nuclear Antigen 1) est une protéine virale associée à l'EBV et la seule détectée dans toutes les maladies associées à ce virus et tous ses programmes de latence, hormis la latence 0. Elle est composée de 641 acides aminés. Sa structure met en évidence des régions riches en Glycine/arginine, Glycine/Alanine, un site de liaison à l'Ubiquitin Specific Processing Protease 7 (USP7) et un domaine de liaison à l'ADN (Figure 11).



**Figure 11. Structure de la protéine virale EBNA1**

Les séquences riches en Glycine et Arginine sont représentées en gris. Entre elles se situe la région de répétitions de Glycine et Alanine. En orange, est représenté le site de liaison à USP7 et en vert le domaine de liaison à l'ADN. Le numéro des acides aminés est indiqué en dessous en rouge. Modifié d'après Frappier, 2012.

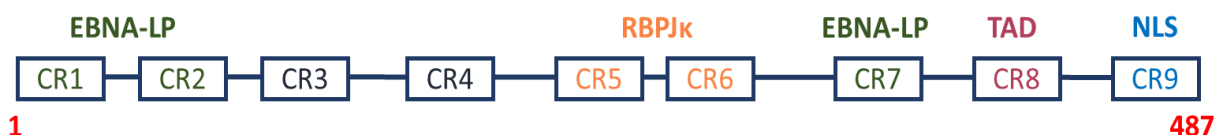
EBNA1 est impliquée dans la persistance du génome du virus sous sa forme latente, sous forme d'épisomes circulaires dans le noyau. Elle active l'expression des autres gènes de latence impliqués dans l'immortalisation des lymphocytes B (Frappier, 2012).

Plusieurs études ont montré le rôle important de cette protéine dans l'augmentation de la survie cellulaire et la diminution du processus d'apoptose (Frappier, 2012). Des observations similaires ont été faites chez des lymphocytes de lymphome de Burkitt en latence I : l'inhibition d'EBNA1 diminue la survie cellulaire, tout en augmentant l'apoptose (Kennedy et al., 2003). Les études menées par Lu et al. ont mis en évidence l'implication d'EBNA1 dans l'augmentation de la transcription du gène de la survivine (protéine inhibitrice de l'apoptose). En effet, EBNA1 va former un complexe avec les protéines Sp1 liées à leur élément cis au niveau du promoteur de la survivine, ce qui résultera en l'amélioration de l'activité du complexe et augmentera par la suite la transcription de la survivine. Cette dernière, surexprimée chez les cellules B immortalisées par l'EBV assure leur survie (Lu et al., 2011).

EBNA1 altère également la voie de signalisation du TGF- $\beta$ 1, impliquée dans l'orientation vers le cycle lytique : elle conduit à la diminution de l'expression et de la phosphorylation de l'effecteur Smad2, nécessaire à la transcription de la protéine Zta suite à l'activation des récepteurs à TGF- $\beta$ 1 (Velapasamy et al., 2018). EBNA1 contribue également à l'échappement des cellules infectées à l'immunosurveillance : la protéine présente dans sa structure une répétition particulière en Glycine/Alanine altérant sa présentation au CMH-I. Toutes ces caractéristiques font qu'EBNA1 est considérée comme une cible prometteuse dans les traitements contre les maladies associées à l'EBV (Frappier, 2012).

### V-2. a) ii- EBNA2

EBNA2 (Epstein-Barr Nuclear Antigen 2) fait partie des protéines virales nucléaires dont l'expression est restreinte à la latence III. Elle est composée de 487 acides aminés et comporte neuf régions conservées (CRs : Conserved Regions). Parmi ces régions, CR1, CR2 et CR7 sont impliquées dans l'activation de la protéine EBNA-Leader Protein (EBNA-LP), tandis que CR5 et CR6 sont nécessaires dans la liaison à RBPJk (protéine de liaison de la recombinaison de Jk). La protéine EBNA2 possède, au niveau du CR8, un domaine de transactivation TAD (TransActivation Domain) et au niveau du CR9, une séquence de localisation nucléaire (NLS : Nuclear Localization Sequence) (Figure 12).



**Figure 12. Structure de la protéine virale EBNA2**

Les régions CR1, CR2 et CR7 sont impliquées dans l'activation d'EBNA-LP. Les CR5 et CR6 favorisent la liaison de RBPJk au CR8 qui porte un domaine de transactivation (TAD), et au CR9 une séquence de localisation nucléaire (NLS). Les numéros en rouge représentent les acides aminés. CR : Région Conservée ; RBPJk : Protéine de Liaison de la Recombinaison de Jk ; TAD : TransActivation Domain ; NLS : Nuclear Localization Sequence (*Figure réalisée par Jennifer SALIBA*).

Contrairement à EBNA1, EBNA2 ne possède pas de domaine de liaison à l'ADN mais un domaine de transactivation. RBP-Jk interagirait directement avec EBNA2 et pourrait médier sa transactivation au niveau des gènes cellulaires et viraux (Grossman et al., 1994; Waltzer et al., 1994). D'autres auteurs ont mis en évidence un mimétisme entre Notch1 et EBNA2 au niveau d'homologies fonctionnelles pour l'activation de RBP-Jk, ce qui a une implication dans l'immortalisation des lymphocytes B par l'EBV (Hsieh et al., 1996).

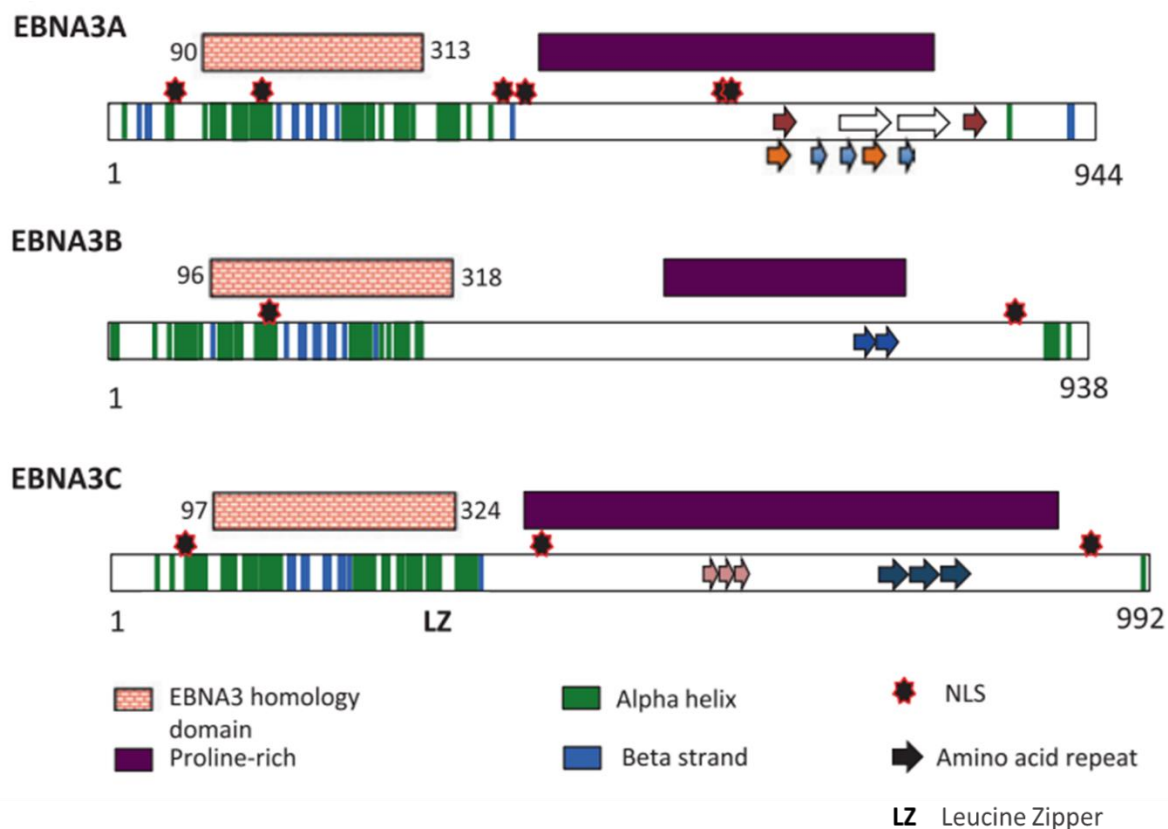
EBNA2 est une protéine indispensable pour l'établissement des LCLs. Cette propriété a été mise en évidence pour la première fois grâce à la lignée cellulaire P3HR1 issue d'un lymphome de Burkitt (Miller et al., 1974). Dans les LCLs, l'expression de la protéine membranaire LMP1 est favorisée par les acides aminés 3 à 30 d'EBNA2, capables de stimuler l'expression des gènes viraux impliqués dans l'immortalisation des lymphocytes B *in vitro* (Gordadze et al., 2004).

Les deux types 1 et 2 de l'EBV correspondent à l'expression des protéines EBNA2A et EBNA2B respectivement. Les différences existantes au sein du gène EBNA2 font que l'immortalisation des cellules B *in vitro* est plus efficace par l'EBV1 que par l'EBV2 (Cohen et al., 1989). Lucchesi et son équipe ont rapporté que le gène CXCR7 (CX-C Récepteur à la Chémokine de type 7), nécessaire pour la prolifération des LCLs, est plus fortement induit dans l'EBV1 que dans l'EBV2 (Lucchesi et al., 2008). Plus récemment, d'autres auteurs ont montré une corrélation entre l'expression d'EBNA2 et la surexpression de CCL3 (Chémokine Ligand 3) et de CCL4 (Chémokine Ligand 4) dans les cellules issues de lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL). Ceci conduit à l'activation des voies Btk (tyrosine kinase Bruton) et NF- $\kappa$ B et à une résistance au traitement par la doxorubicine (Kim et al., 2017). Des études ont aussi mis en évidence une corrélation entre l'expression d'EBNA2 et celle de PD-L1 dans le cas de cellules de lymphomes B. EBNA2 régule négativement miR-34a et par conséquent augmente l'expression de PD-L1, ce qui contribue à une inhibition de l'activité anti-tumorale des T effecteurs. Ces résultats proposent de nouvelles stratégies d'immunothérapie chez des patients atteints de cancers associés à l'EBV (Anastasiadou et al., 2019a).

### V-2. a) iii- EBNA3

Parmi les protéines nucléaires de l'EBV il existe également la famille des EBNA3, composée de trois variants : EBNA3A, EBNA3B et EBNA3C, historiquement connus sous le nom d'EBNA4, EBNA5 et EBNA6. Ces protéines sont exprimées uniquement lors de la phase de latence III de l'EBV et lors de la latence atypique. Chacune de ces protéines est composée d'environ 900 acides aminés et chacun des trois variants EBNA3 présente une région riche en proline et une homologie de séquence (220 à

230 acides aminés) avec les deux autres variants, nommée "domaine d'homologie", limitée mais significative. L'identité de séquence est d'environ 20 à 30% (Figure 13).



**Figure 13. Structure de la famille des protéines EBNA3**

Les rectangles violets représentent les régions riches en proline et les rectangles roses représentent les domaines d'homologie. Les rectangles bleus et verts représentent les domaines structuraux. Les séquences de localisation nucléaire (NLS) sont représentées par les étoiles noires et rouges. Les flèches colorées similaires symbolisent les répétitions des mêmes acides aminés. D'après Allday et al., 2015.

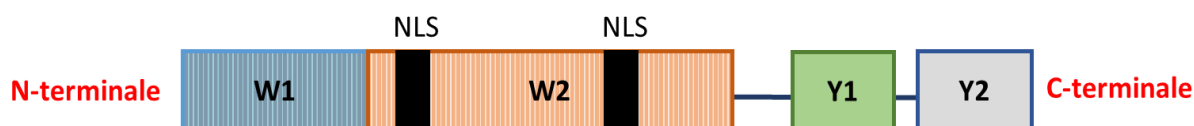
Malgré les similitudes structurales, les membres de la famille EBNA3 présentent des fonctions assez différentes, voire opposées : EBNA3A et EBNA3C sont considérés comme oncogènes et sont impliquées dans la répression des voies de signalisation suppressives dans les tumeurs, par contre, EBNA3B a des fonctions suppressives (Styles et al., 2018). Tous les variants de la famille EBNA3 se lient à la même région de RBP-Jk et sont capables d'inhiber la transactivation du promoteur du gène de la protéine virale terminale de type 1 (TP-1), médiée par EBNA2 (Le Roux et al., 1994). Certains auteurs suggèrent que la famille des EBNA3 est nécessaire à la génération de lymphocytes T anti-EBV (Burrows et al., 1994). Ces

protéines sont importantes pour la persistance de l'EBV dans les lymphocytes B et l'induction de la lymphomagenèse au sein de ces cellules (Allday et al., 2015). Ce sont principalement les variants 3A et 3C qui jouent un rôle important dans l'établissement des lignées LCLs (Tomkinson et al., 1993). EBNA3A et EBNA3C augmentent de plus l'efficacité d'immortalisation des lymphocytes B en culture. Elles sont impliquées dans la résistance aux médicaments cytotoxiques et peuvent réguler négativement Bim (ou Bcl2L11 : Bcl-2-like Protein 11), qui est médiateur pro-apoptotique (Anderton et al., 2008). Les auteurs ont également suggéré qu'un sous-ensemble de clones de lymphome de Burkitt générés *in vitro* conservent l'expression d'EBNA3 dans un programme de latence atypique avec suppression d'EBNA2 ; ceci indique l'importance des EBNA3A et EBNA3C dans la régulation de la pathogenèse du lymphome (Anderton et al., 2008). D'autres études ont montré qu'EBNA3C est capable de cibler p53 et de réprimer ses activités transcriptionnelle et apoptotique (Yi et al., 2009). A l'inverse, d'autres auteurs ont mis en évidence les fonctions suppressives de tumeurs pour le variant EBNA3B : dans le cas de tumeurs déficientes en EBNA3B il existe également de faibles taux de cellules T infiltrantes, compte-tenu de son rôle de régulateur positif de l'immunosurveillance par les lymphocytes T (Styles et al., 2018).

Les protéines EBNA sont principalement impliquées dans la régulation de l'apoptose, de la migration cellulaire et la différenciation des lymphocytes B. Elles sont également capables de s'associer pour moduler l'environnement et le comportement de la cellule hôte (White et al., 2010).

### V-2. a) iv- EBNA-LP

EBNA-LP (Leader Protein), aussi connue sous le nom d'EBNA5, est exprimée en latence III et durant la latence atypique. Elle est composée de 22 et 44 répétitions d'acides aminés dérivées des exons W1 et W2 trouvés dans la grande région répétée interne principale du virus (IR1) et les exons Y1 et Y2 en aval de IR1 (Figure 14).



**Figure 14. Structure de la protéine EBNA-LP**

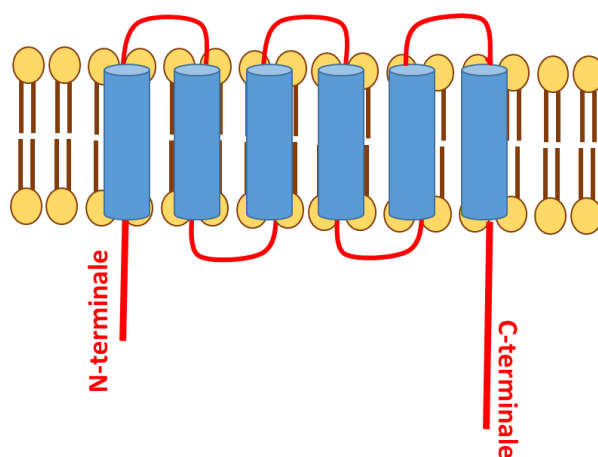
Les répétitions codées par les exons W1 et W2 forment la partie N-terminale de la protéine et les deux exons Y1 et Y2 composent la partie C-terminale. NLS : Nuclear localization Sequence (Figure réalisée par Jennifer SALIBA).

Bien qu'elle soit majoritairement localisée au niveau nucléaire, elle peut également être retrouvée dans le cytoplasme (Garibal et al., 2007). EBNA-LP a été la 5ème protéine virale identifiée comme essentielle à la croissance des cellules B transformées (Dillner et al., 1986). En effet, les exons Y1 et Y2 sont importants pour le processus d'immortalisation des lymphocytes B *in vitro* (Mannick et al., 1991). EBNA-LP est un coactivateur d'EBNA2, protéine indispensable du programme de latence III de l'EBV. Cette co-activation s'effectue au niveau du promoteur de LMP1 et du promoteur bidirectionnel LMP1/LMP2B ; et ceci grâce aux fonctions régulatrices situées au niveau des exons W1 et W2 (Harada and Kieff, 1997) et à la protéine Sp100 capable de stimuler l'activation de la protéine EBNA2 (Ling et al., 2005). Plus récemment, autre que son rôle dans l'activation d'EBNA2, des études ont révélé qu'EBNA-LP facilite aussi le recrutement de plusieurs facteurs de transcription dans le génome viral, afin de permettre la transcription des gènes de latence de l'EBV et qu'elle favorise la survie des cellules B naïves infectées par le virus (Szymula et al., 2018).

### V-2. b) Protéines membranaires

#### V-2. b) i- LMP1

LMP1 (Latent Membran Protein 1) est une oncoprotéine membranaire majeure de l'EBV exprimée durant les latences II et III. Elle est composée de trois domaines : une courte partie N-terminale cytoplasmique, six régions transmembranaires, et une longue queue en C-terminal cytoplasmique (Figure 15).



**Figure 15. Structure de la protéine LMP1**

La courte partie N-terminale cytoplasmique est composée de 24 acides aminés. La longue queue C-terminale est composée de 200 acides aminés. Entre ces deux extrémités de la protéine se trouvent six régions transmembranaires (Figure réalisée par Jennifer SALIBA).

L'oncoprotéine LMP1 se caractérise par plusieurs fonctions dans les cancers associés à l'EBV : régulation de la prolifération et de l'immortalisation des cellules tumorales, invasion, angiogenèse, interaction cellule-cellule et présentation d'antigènes (Lo et al., 2021). L'implication de LMP1 dans la prolifération des lymphocytes B immortalisés est surtout assurée par les homologues fonctionnelles qu'elle possède avec le CD40 (Lam and Sugden, 2003).

LMP1 a la capacité d'activer certaines cascades de signalisation, coordonnant des cibles cellulaires en aval qui favorisent son activité oncogène : NF- $\kappa$ B, PI3K/AKT, ERK/MAPK, JNK, JAK-STAT et p38/MAPK. La surexpression de LMP1 active la voie de signalisation NF- $\kappa$ B, augmentant le nombre de copies du génome latent de l'EBV, et par la suite ses propriétés oncogéniques (Zuo et al., 2015). LMP1 est aussi un activateur de la voie de signalisation du récepteur du facteur de nécrose tumorale (TNFR) : elle recrute les facteurs associés aux TNFR (TRAF) et d'autres protéines adaptatives, parmi lesquelles TRAF3, 5, et 6 essentielles pour les fonctions de LMP1 (Arcipowski and Bishop, 2012). De plus, par la voie p38/SAPK2 (Protéine Kinase Activée par le Stress), LMP1 permet l'induction de l'expression de l'interleukine-10 (IL-10) dans les cellules issues de lymphomes de Burkitt (Vockerodt et al., 2014). D'autres études ont mis en évidence que l'expression de LMP1 stimule la sécrétion d'IL-10 par les lymphocytes T inhibiteurs, connus sous le nom de T régulateurs (Tregs), ce qui entraîne l'inhibition de la prolifération des T effecteurs et de la cytotoxicité des cellules NK (Dukers et al., 2000; Marshall et al., 2003). Cette protéine oncogénique module l'adhésion cellulaire grâce à la régulation de l'activation de la signalisation de l'intégrine A et du TGF $\beta$  (Morris et al., 2016).

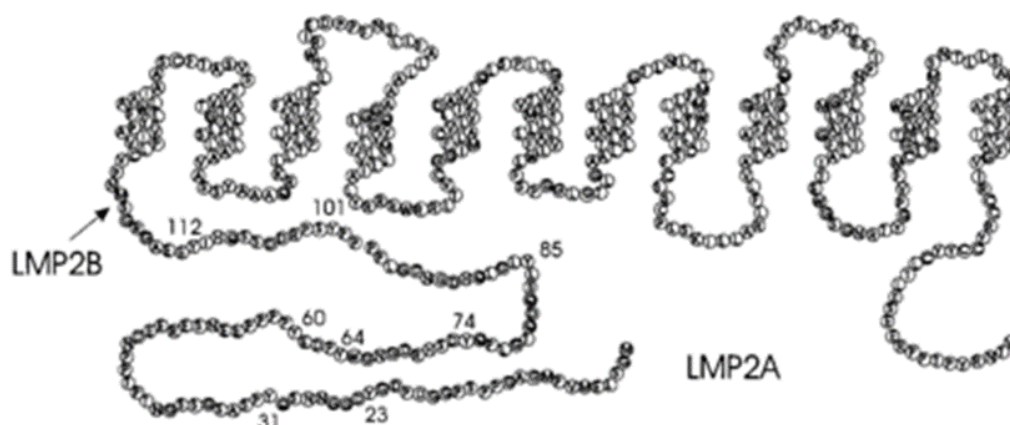
La surexpression de PD-L1 par les cellules EBV<sup>+</sup> est de plus corrélée à l'expression de LMP1, et à l'expression des protéines de la voie MAPK/NF- $\kappa$ B (Bi et al., 2016a). LMP1 contribue ainsi à l'inhibition de la réponse anti-tumorale.

La protéine LMP1 est retrouvée dans les vésicules exosomales sécrétées par les cellules infectées. Le trafic de la protéine LMP1 localisée dans les exosomes est capable de modifier leur contenu et leurs fonctions : ils participent à l'amélioration de la migration et l'invasion des cellules tumorales, permettant à l'EBV de manipuler le microenvironnement tumoral (Hurwitz et al., 2017). Nkosi et ses collaborateurs ont mis en évidence que l'expression de LMP1 modifie le contenu des vésicules extracellulaires en protéines et microARNs, et active les voies de signalisation ERK, AKT et NF- $\kappa$ B. Elle régule positivement l'expression des gènes des cadhérines, fibronectines et métalloprotéinases (MMP2 et MMP9). Par conséquent, cette protéine participe activement au remodelage du microenvironnement tumoral (Nkosi et al., 2020).

Plusieurs études proposent LMP1 comme cible thérapeutique contre les pathologies liées à l'EBV (Delbende et al., 2009) : une étude effectuée sur un modèle murin montre qu'un vaccin ciblant LMP1 supprime les métastases *in vivo* (Lin et al., 2017). Il est également proposé des vaccins EBV-spécifiques ciblant LMP1 pour améliorer les réponses immunes chez les patients atteints de maladies associées à l'EBV (Lo et al., 2021).

### V-2. b) ii- LMP2

Les protéines LMP2 sont exprimées en latence II et III de l'EBV. La famille des LMP2, regroupant LMP2A et LMP2B, est caractérisée par une structure constituée de 12 domaines transmembranaires hydrophobes et d'un domaine C-terminal cytoplasmique de 27 acides aminés. LMP2A se caractérise en plus par un domaine N-terminal composé de 119 acides aminés absents chez LMP2B. Ce domaine N-terminal contient chez LMP2A des motifs tyrosine, sérine et proline, tandis que les domaines transmembranaires et C-terminal sont riches en motifs cystéine (Figure 16).



**Figure 16. Structure de la protéine LMP2**

LMP2A et LMP2B contiennent 12 domaines transmembranaires et un domaine C terminal. LMP2B débute à la méthionine (flèche noire) et ne contient pas le domaine N-terminal cytoplasmique de 119 acides aminés unique à LMP2A. Les nombres représentent les emplacements des 8 résidus de tyrosine dans le domaine N-terminal de LMP2A (Fruehling et al., 1996).



Concernant LMP2A, Fruehling et ses collaborateurs ont montré que trois motifs riches en tyrosine de sa partie N-terminale sont fortement impliqués dans le blocage de la signalisation du BCR après phosphorylation (Fruehling et al., 1996). Une autre étude de Fruehling et Longnecker a montré que les résidus tyrosine en position 74 et 85 possèdent des séquences conservées de tyrosine et de leucine appariées constituant le motif ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif), impliqué dans le blocage de transduction du BCR (Fruehling and Longnecker, 1997). Le motif ITAM interagit aussi avec la protéine Syk facilitant la transformation des lymphocytes B par LMP2A (Fukuda and Kawaguchi, 2014). Les homologues fonctionnelles entre LMP2A et le BCR participent à la survie des lymphocytes B infectés par l'EBV (Mancao and Hammerschmidt, 2007). LMP2A active la voie PI3K/AKT et induit la surexpression d'IL-10 (Incrocci et al., 2013) ainsi que celle de gènes associés à l'induction du cycle cellulaire et à l'inhibition de l'apoptose. D'un autre côté, elle régule à la baisse l'expression des gènes associés aux facteurs spécifiques des lymphocytes B et à l'immunité, tout comme les cellules de ReedSternberg issues de lymphome de Hodgkin (Portis et al., 2003).

Concernant LMP2B, sa surexpression - seule - régule la phase de latence III du virus : elle contrôle négativement l'activation du BCR par LMP2A et l'internalisation du calcium (Kempkes and Robertson, 2015; Rechsteiner et al., 2008). En revanche, l'expression conjointe de LMP2A et de LMP2B permet de restaurer l'expression de la protéine Lyn (régulateur des réponses immunes innée et adaptative) et retourne la transduction du signal BCR à la normale (Rovedo and Longnecker, 2007).

L'absence du domaine N-terminal chez LMP2B fait qu'elle est capable de dégrader les kinases cellulaires (Lyn et Syk) ce qui régule à la baisse les voies de signalisation des cellules B normales. Les protéines LMP2 sont exprimées dans plusieurs maladies associées à l'EBV et l'équilibre entre les fonctions de LMP2A et LMP2B permet au virus de maintenir sa forme latente. Ceci offre une nouvelle piste d'étude dans le cadre de thérapies ciblées et de vaccins EBV-spécifiques (Cen and Longnecker, 2015).

### V-3. ARNs viraux de la latence III

Les EBERs (EBV-encoded RNAs) sont des ARNs non codants, de deux types EBER1 et EBER2, exprimés dans tous les types de latence, excepté la latence atypique. Ils sont non essentiels pour la transformation des cellules B primaires par l'EBV. Les EBERs sont présents dans le noyau et le cytoplasme des cellules infectées. Ahmed et al. ont montré que dans les lymphocytes B infectés par l'EBV, les EBERs peuvent être transportés du noyau au cytoplasme dans des corps multi-vésiculaires pour être excrétés par les exosomes. Ces résultats confirment la participation des EBERs dans la manipulation du microenvironnement tumoral, sachant que normalement, les cellules infectées par l'EBV modulent le microenvironnement par la libération des exosomes contenant des composants viraux et cellulaires (Ahmed et al., 2018). Les EBERs peuvent inhiber la protéine kinase activée par l'ARN (PKR) induite par l'interféron-alpha (IFN- $\alpha$ ) et nécessaire à la médiation des effets antiviraux des interférons. Cette inhibition permet la persistance virale, en protégeant les cellules contre l'apoptose (Nanbo et al., 2002).

Les BARTs (BamHI-A Rightward Transcripts) sont un autre groupe d'ARNs, épissés de manière hétérogène, ayant une taille de 4 à 8 kpb (Smith et al., 2000) conduisant à la production de plusieurs cadres de lecture ouverts et constituant des précurseurs pour les micro-ARNs (miARNs). Les BARTs ont tout d'abord été détectés dans les tissus issus d'un carcinome nasopharyngé puis lors de différentes pathologies associées à l'EBV : la maladie de Hodgkin, le lymphome T/NK de type nasal, le lymphome de Burkitt et dans les cellules B du sang périphérique chez des individus sains (Hitt et al., 1989). Des études ont montré que l'immortalisation des lymphocytes B *in vitro* reste possible même en absence des BARTs, mais leur présence reste importante pour le développement tumoral (Marquitz and Raab-Traub, 2012).

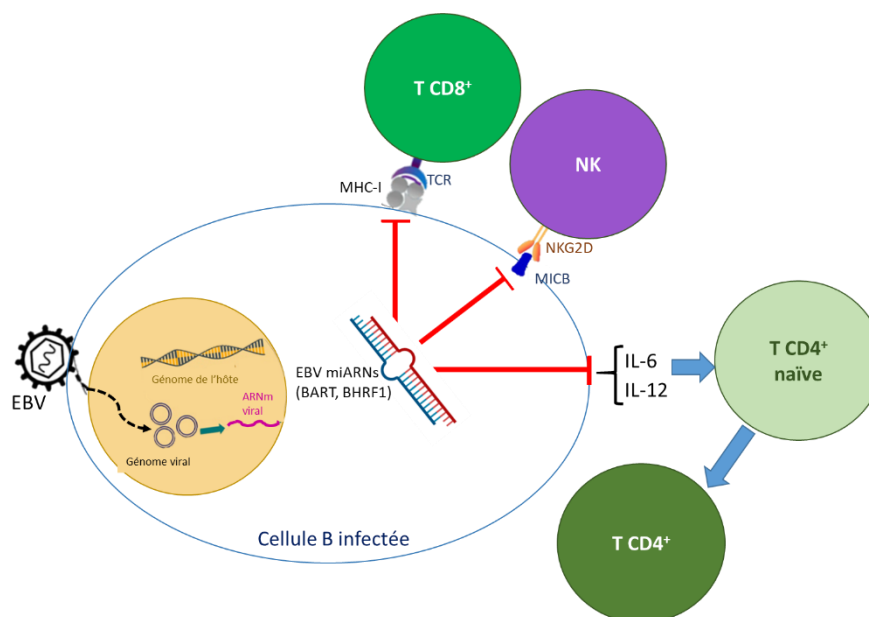
L'épissage alternatif des BARTs entraîne l'apparition de micro-ARNs (miARNs) qui sont de petites molécules d'ARN non codantes (environ 22 nucléotides) régulant négativement l'expression des gènes (Friedman et al., 2009). Une dérégulation des miARNs affecte la prolifération, la mort cellulaire, la migration, le cycle cellulaire et plusieurs autres processus associés aux cancers et permet ainsi de distinguer les cellules normales des cellules tumorales (Bofill-De Ros et al., 2017).

Les cellules transformées par l'EBV expriment au moins 49 micro-ARNs viraux matures dont les fonctions ne sont pas encore élucidées à ce jour (Sakamoto et al., 2017). L'EBV code pour environ 30 micro-ARNs dans la région des BARTs : l'expression dérégulée des miARNs

BARTs potentialise la croissance tumorale *in vivo* et représente un mécanisme oncogénique lié à l'EBV (Qiu et al., 2015).

Les miARNs de l'EBV sont exprimées différemment dans les cellules EBV<sup>+</sup> en fonction du type de la latence virale (Wang et al., 2018). Des études ont montré que les micro-ARNs de l'EBV inhibent la libération d'IL-12 des cellules B infectées, répriment la différenciation des lymphocytes CD4<sup>+</sup> naïfs en cellules Th1 et modifient la présentation du peptide sur le CMH-II. Par conséquent, ils régulent négativement l'activation des lymphocytes T effecteurs qui contrôlent la prolifération des B infectés par l'EBV (Tagawa et al., 2016). Albanese et al ont constaté que les miARNs de l'EBV inhibent la mort des cellules B infectées par l'EBV par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'EBV. En effet, ils réduisent les expressions du CMH-II, d'EBNA1 et d'IL-12, ce qui baisse la reconnaissance des cellules infectées par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et donc induit l'échappement à l'immunosurveillance (Albanese et al., 2016). Les miARN de l'EBV participent également à l'échappement à la réponse immune médiée par les NK en ciblant son récepteur MICB (MHC class I Chain-related molecule B). Ils régulent aussi l'apoptose cellulaire en interagissant avec BH3 (BID) servant de substrat de caspase qui amplifie la réponse apoptotique via la voie mitochondriale. C'est ainsi que les miARNs participent à l'initiation de tumeurs malignes associées à l'EBV. En plus, ces miARNs du virus l'aident à maintenir la latence dans les cellules infectées : miR-BART7, miR-BART5, miR-BART1-5p et miR-BART19-3p sont fortement exprimés dans les lymphomes NK/T et aident au maintien de la latence III. Les miARNs viraux BHRF1 se trouvent dans les cellules en latence III de l'EBV telles que les lignées cellulaires lymphoblastoïdes. Cette association avec la latence III est principalement attribuée au fait que les miARN BHRF1 sont dérivés du transcrit EBNA initié par Cp et/ou Wp non exprimé qu'en latence III (Wang et al., 2018). En outre, miR-BHRF1-2-5p et miR-BART2-5p inhibent le BCR, responsable de médier l'immunité adaptative et l'infection lytique dans les lymphocytes B infectés par l'EBV (Iizasa et al., 2020).

La figure 17 représente la régulation des réponses immunitaires de l'hôte par les mirARNs de l'EBV.



**Figure 17. Les mirARNs de l'EBV régulent les réponses immunitaires de l'hôte.**

Dans les cellules infectées en phase latente, le génome viral est sous forme épisomale.

L'EBV recrute ses micro-ARNs pour la subversion des réponses immunes de l'hôte. Les micro-ARNs de l'EBV peuvent (1) interférer avec la présentation antigénique des molécules du CMH-I ce qui baisse la reconnaissance des cellules infectées par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ; (2) contrôler les expressions d'IL-6 et IL-12 causant la suppression des réponses immunes des T CD4<sup>+</sup> médiée par les cytokines ; (3) faciliter l'échappement à la réponse NK en ciblant le ligand MICB.

TCR : T-cell receptor; MHC: Major Histocompatibility Complex; NKG2D: Natural Killer Group 2D; MICB: MHC class I Chain-related molecule B (Figure réalisée par Jennifer SALIBA).

Certains auteurs ont suggéré que les clusters de micro-ARNs codés par l'EBV sont associés au type de cancer et au statut de l'infection virale, proposant de cibler les clusters de miARNs en thérapie spécifique à chaque maladie liée au virus (Sakamoto et al., 2017).

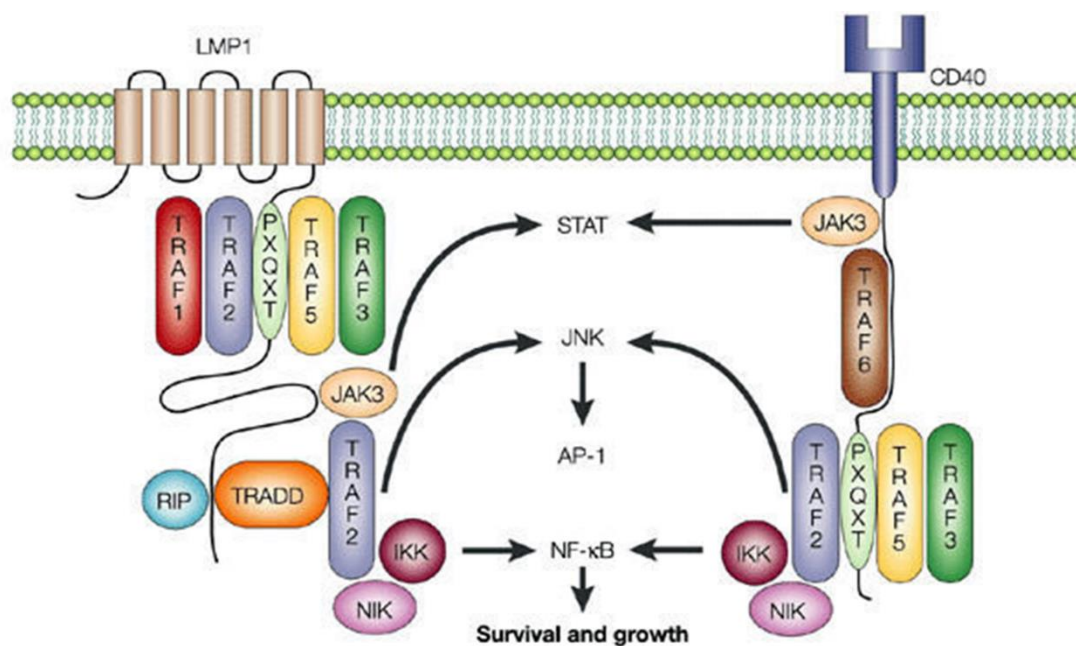
### V-4. Facteurs et voies de signalisation impliqués en latence III

#### V-4. a) Facteur NF-κB

NF-κB est un facteur de transcription dimérique appartenant à la famille REL composée de RelA (p65), RelB, p50, p52 et c-Rel. Elle peut être régulée par deux voies de signalisation : une voie canonique dite classique ou une voie non canonique dite alternative. La voie classique est associée aux membres RelA, c-Rel et/ou p50 de la famille REL impliqués dans les réponses inflammatoires et anti-apoptotique.

Lorsque la voie est activée, NF- $\kappa$ B se transloque vers le noyau et se lie à l'ADN afin de réguler l'expression des gènes. NF- $\kappa$ B est activé dans plusieurs types de cancers y compris les lymphomes B EBV<sup>+</sup> et participe à l'émergence de tumeurs. Les récepteurs associés à cette voie sont principalement les récepteurs de type Toll-like (TLRs) et le récepteur des cellules B (BCR).

En 1996, Devergne et ses collaborateurs ont découvert l'association des TRAFs avec LMP1 est essentielle pour l'activation de NF- $\kappa$ B et l'immortalisation des cellules B (Devergne et al., 1996). Dans les lymphomes B EBV-positifs, la voie NF- $\kappa$ B peut être activée par la protéine virale LMP1 (Cahir-McFarland et al., 2004). De nombreuses études ont été menées sur l'implication de NF- $\kappa$ B dans le développement de tumeurs associées à l'EBV. D'après une étude des lignées de lymphomes de Burkitt, des LCLs et une lignée inductible pour l'expression de c-Myc, Faumont et al. ont montré que NF- $\kappa$ B et cMyc sont les deux facteurs de transcription principaux détournés par la latence III de l'EBV, en étant impliqués dans le phénotype, la croissance et les propriétés biologiques des cellules B immortalisées par le virus (Faumont et al., 2009). Takada et son équipe ont constaté que l'infection par l'EBV induit l'activation de NF- $\kappa$ B dans les cellules tumorales de lymphomes T/NK via LMP1, et potentiellement LMP2A, qui ont favorisé la survie cellulaire (Takada et al., 2017) (Figure 18).



Nature Reviews | Immunology

**Figure 18. Activation de NF-κB par LMP1 mimant CD40**

LMP1 et CD40 ont des domaines de liaison avec les facteurs TRAFs pour interagir avec cette famille. Elles interagissent avec la kinase JAK3 et les protéines STAT et activent le complexe de transcription de l'AP-1 par la voie JNK. Toutes ces interactions activent NF-κB et déclenchent la transcription de gènes anti-apoptotiques pour maintenir la survie et la croissance des lymphocytes B infectés par l'EBV.

LMP1: Latent Membrane Protein 1; TRAF: TNF Receptor Associated Factor; JAK: JAnus Kinase; RIP: Receptor-Interacting Protein kinase; TRADD: Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated Death Domain; NIK: NF-κB Induced Kinase; IKK: IκB Kinase; STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription; JNK: C-Jun N-terminal Kinases; AP-1: Activator Protein-1; NF-κB: Nuclear Factor-κappa B; PXXOT: Motif Pro – Xaa – Gln – Xaa – Thr. D'après Thorley-Lawson, 2001.

#### V-4. b) Facteur c-Myc

c-Myc est un facteur de transcription proto-oncogène surexprimé dans plusieurs types de cancers. Dans les cellules normales en division, c-Myc participe partiellement à la régulation de la prolifération cellulaire et l'apoptose. Chez les cellules tumorales, c-myc est étroitement lié à la prolifération, la transformation et l'induction de l'apoptose. Son expression est nettement augmentée dans les cellules qui se divisent rapidement et se différencient faiblement.

EBNA2 cible directement c-Myc (Kaiser et al., 1999). Il s'agit d'un facteur majeur de transcription de la latence III qui régule positivement la plupart des gènes induits par ce programme de latence et qui sont impliqués dans la prolifération cellulaire.

De plus, lorsque c-Myc est inactivé par un inhibiteur chimique, la prolifération des LCLs est arrêtée (Faumont et al., 2009). c-Myc semble être un facteur important dans la prolifération des cellules B immortalisées par l'EBV. Sa surexpression engendre la prolifération des B en latence III dépendamment de NF- $\kappa$ B (David et al., 2017).

Des études ont par ailleurs révélé qu'une activité élevée de c-Myc dans les cellules de lymphome infectées par l'EBV et une surexpression de c-Myc dans des LCLs conduisent à la répression de la transcription de LMP1. Lorsque c-Myc est chimiquement inhibée dans les LCLs et tôt après l'infection primaire des cellules B, l'expression de LMP1 est augmentée (Price et al., 2018).

### V-4. c) Voie P38/MAPK

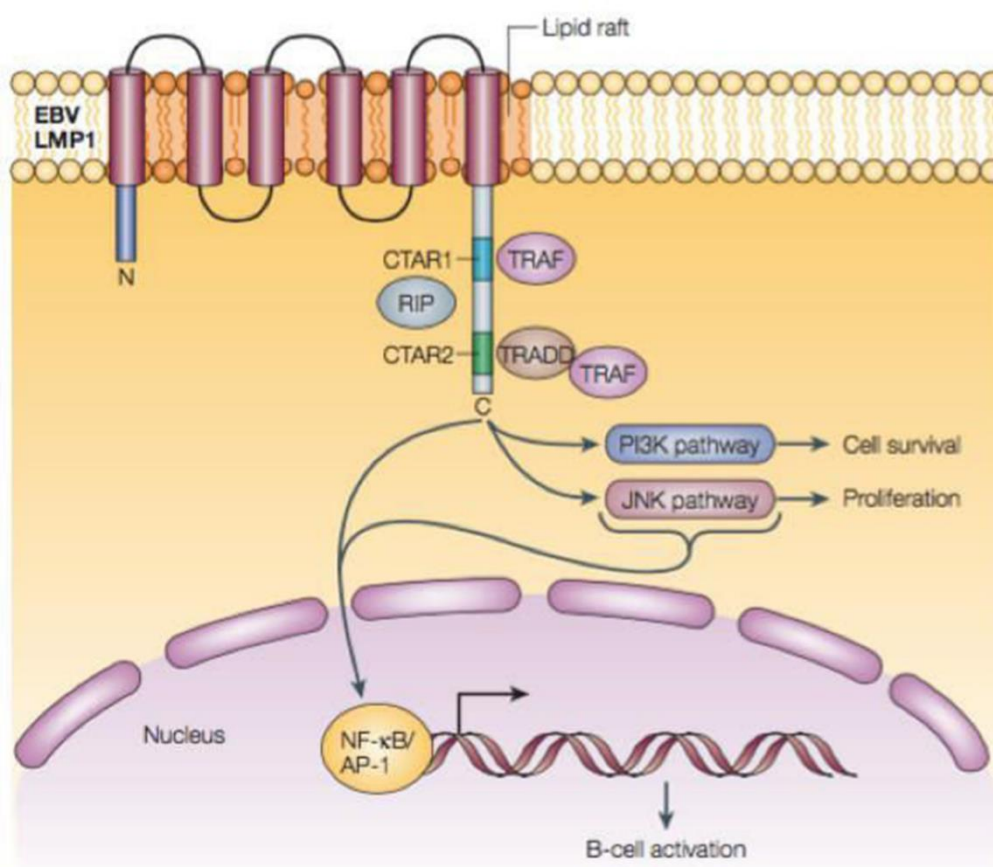
La voie p38/MAPK peut être activée par LMP1, ce qui induit l'expression des IL-6 et IL-8 (Eliopoulos et al., 1999). En parallèle, cette voie peut elle-même conduire à la surexpression de LMP1, augmentée par une boucle de régulation autocrine (Johansson et al., 2010). A la surface de cellules malignes EBV-positives de PTLD, CD70 (ligand de CD27 - molécule de costimulation) est surexprimée (Trentin et al., 1997). Lorsque CD70 interagit avec ces cellules, ceci déclenche l'apoptose par le biais du stress du réticulum endoplasmique via l'activation des voies P38/MAPK et JNK (Park et al., 2010). L'inhibition de la voie p38, lors de l'activation de l'EBV, conduit à une multiplication par trois de l'apoptose des cellules Raji et empêche l'expression des gènes du cycle lytique. Lors du passage de la phase de latence à la phase lytique, la phosphorylation de p38/MAPK protège les cellules hôtes de l'apoptose et induit la réactivation virale. L'augmentation de LMP1 lors de la réactivation de l'EBV contribue avec p38/MAPK, à la survie cellulaire (Matusali et al., 2009).

### V-4. d) Voie PI3K/AKT

La voie de signalisation PI3K/AKT est impliquée principalement dans la régulation du cycle cellulaire. LMP1 est capable d'induire la phosphorylation et l'activation de AKT – située en aval de PI3K - et par la suite, de stimuler l'activation de PI3K (Dawson et al., 2003). La phosphorylation d'IRF4 (Interferon Regulatory Factor) est favorisée par l'oncoprotéine LMP1 et la famille des protéines kinases Src via LMP1. La famille des Src agit en amont de PI3K pour activer IRF4 et Akt (Wang et al., 2017). LMP2A active également la voie PI3K/Akt, en induisant la phosphorylation de Akt. PI3K/AKT activée représente une sorte

de signal de survie des cellules épithéliales et des lymphocytes B infectés (Fukuda and Longnecker, 2004).

L'activation de PI3K/AKT favorise la transformation des cellules tumorales : elle inhibe l'apoptose en baissant la transcription du Fas Ligand, active la prolifération cellulaire en accélérant les cycle et métabolisme cellulaires, et participe à l'instabilité génomique. Dans les pathologies associées à l'EBV, LMP2A agit comme un signal du BCR, entraînant la sortie des cellules B de la moelle osseuse et diminuant, ensuite, l'apoptose des cellules B à la périphérie via l'activation de PI3K (Chen, 2012) (Figure 19).



**Figure 19. Activation de la voie PI3K/Akt par LMP1**

LMP1 interagit avec TRADD et TRAF pour activer les cellules B par l'induction des facteurs de transcription AP-1 et NF-κB. Les voies de signalisation PI3K et JNK sont consécutivement activées, assurant la survie cellulaire et la prolifération des lymphocytes B infectés. D'après Damania, 2004.

### V-4. e) Voie des STATs

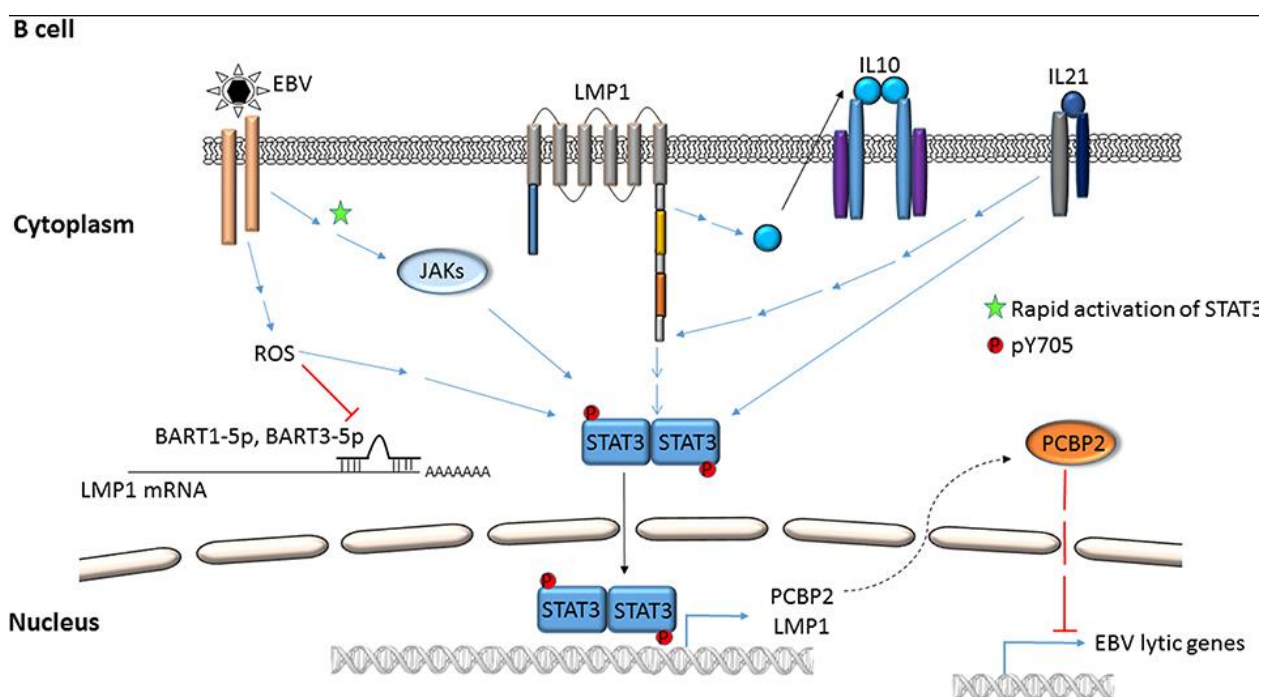
Weber-Nordt et son équipe ont été les premiers à établir une corrélation entre l'activation des protéines STATs dans des lignées immortalisées par l'EBV, des lymphomes primaires et des cellules issues de leucémie myéloïde (Weber-Nordt et al., 1996).



## Partie 1. Le virus d'Epstein Barr : structure et cycle biologique

Les fortes expressions des protéines STAT-1, -2, -3 et 5A sont associées au programme de latence III de l'EBV induite par LMP1.

En plus, l'expression de STAT-1 peut être impliquée dans la transformation des cellules B (Zhang et al., 2004). La signalisation de LMP1 induit également la production de l'IFN- $\gamma$  conduisant à la phosphorylation des résidus Tyrosines de STAT1 et à l'expression de ses gènes (Najjar et al., 2005). Les faibles expressions de STAT1 augmentent l'expression de LMP2A et des antigènes du cycle lytique et le nombre de cellules entrant dans le cycle lytique. C'est ainsi que STAT1 participe au maintien du programme de latence III des lymphocytes B transformés (McLaren et al., 2009). Plusieurs maladies associées à l'EBV sont caractérisées par une dérégulation de la voie des STATs (Vaysberg et al., 2009). Dans le cadre de l'infection des cellules B primaires par l'EBV, l'activation de STAT3 facilite la prolifération des cellules B et l'établissement de la latence. Sa forte expression contribue également au maintien de la latence en freinant l'activation lytique de l'EBV (Figure 20) (Li and Bhaduri-McIntosh, 2016).



**Figure 20. Activation de STAT3 par l'EBV dans les cellules B**

L'entrée de l'EBV dans les cellules B active rapidement STAT3 via les JAKs (Janus kinases). STAT3 activé peut stimuler la transcription de LMP1 et PCBP2 cellulaire réprimant les gènes lytiques de l'EBV.

La phosphorylation de STAT3 à Y705 via les ROS, les cytokines cellulaires (IL-10, IL21), les miARN EBV LMP1 et EBV sont d'autres modes d'activation des STATs. D'après Li and Bhaduri-McIntosh, 2016.

## **Partie 2. Surveillance immune de l'infection par l'EBV et échappement tumoral**

---



La capacité des effecteurs du système immunitaire inné et adaptatif à reconnaître et éliminer les cellules tumorales a été décrite par le terme de la surveillance immune. Cette dernière correspond au contrôle continu de la prolifération des cellules tumorales chez des individus immunocompétents. Cependant, malgré cette immunosurveillance, certaines cellules parviennent parfois à échapper aux effecteurs de la réponse immune et émerger des maladies, comme dans le cas de l'EBV dans un contexte de profil immunitaire déficient.

Dans cette partie, les deux bras inné et adaptatif de l'immunosurveillance de l'infection par l'EBV seront décrits. Dans un autre paragraphe, nous présenterons l'échappement à la surveillance immune et les maladies associées à l'EBV. Enfin, une dernière section sera consacrée aux facteurs impliqués dans l'évasion à la réponse immune et l'émergence des tumeurs tels que les CMH, les points de contrôle inhibiteurs ainsi que quelques cytokines immunosuppressives.

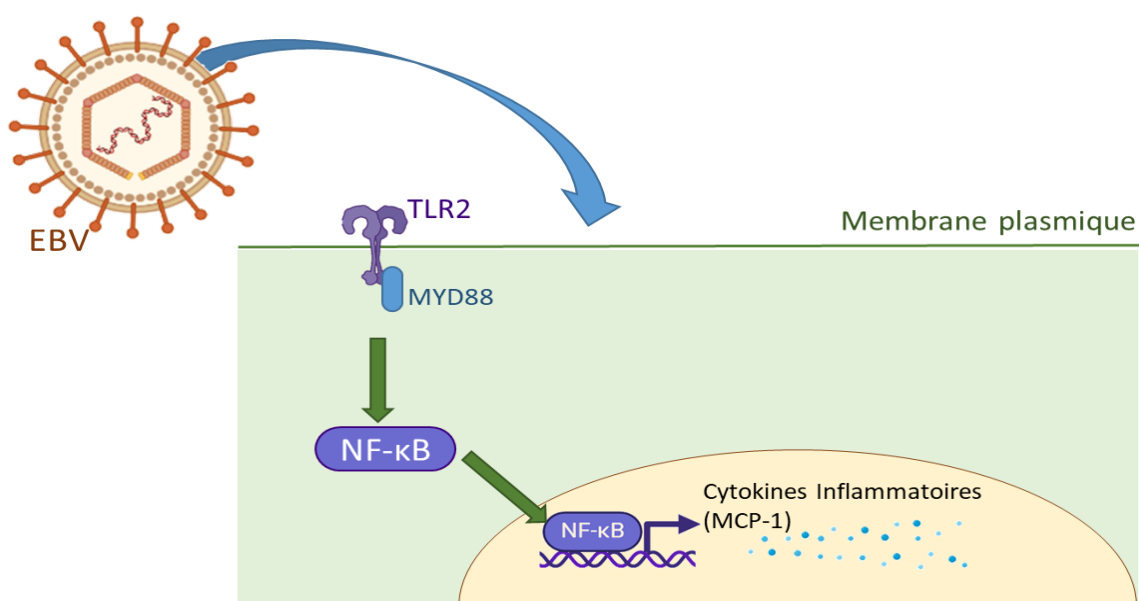
### I- Surveillance immune de l'infection par l'EBV

L'EBV infecte plus de 95% de la population mondiale et persiste de manière latente dans l'organisme. Dans le cas d'individus immunocompétents, cette infection virale de longue durée est surveillée par le système immunitaire de l'hôte grâce à un équilibre hôte/virus contrôlant le virus et la prolifération des cellules infectées. Ainsi, malgré l'hébergement de l'EBV, l'organisme immunocompétent ne développera pas de maladies associées à ce dernier. Ces mécanismes d'immunosurveillance de l'hôte mettent en jeu plusieurs populations de cellules immunitaires, impliquées dans l'immunité innée ou adaptative. Cette dernière peut être à médiation cellulaire (réponse spécifique acquise effectuée notamment par les lymphocytes T cytotoxiques) ou à médiation humorale (basée sur la production d'anticorps). Cette partie porte sur la surveillance immune du virus et des cellules B infectées ; elle présente les principaux effecteurs cellulaires mis en jeu. Le premier paragraphe concerne l'immunité innée et le second l'immunité adaptative à médiations cellulaire et humorale.

### I-1. Immunité innée

#### I-1. a) Rôle des monocytes

Les populations monocytaires jouent un rôle important dans la réponse immunitaire directement dirigée contre le virus (infection primaire ou réactivation). La détection initiale nécessite, de même que pour toute infection virale, une détection *via* les PRRs (Pattern Recognition Receptors). Parmi ces derniers, se trouvent les TLRs (Toll-Like Receptors). Les monocytes détectent l'EBV, *via* les TLR2, impliqués dans la reconnaissance des herpes virus (Lange et al., 2022). TLR2 recrute Myd88 (Myeloid differentiation primary response), résultant dans l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et la production de molécules antibactériennes (oxyde nitrique *via* les iNOS ou oxyde nitrique synthase inductibles) et de cytokines inflammatoires, telles que IL-1 $\beta$ , IL-6 ou TNF $\alpha$  (Lange et al., 2022). L'expression de la chimiokine inflammatoire MCP-1 est significativement augmentée chez les monocytes primaires stimulés par l'EBV, de manière dépendante de l'expression de TLR2 (Chijioke et al., 2013) (Figure 21). Les macrophages et cellules dendritiques dérivés des monocytes utilisent à la fois les TLR2 (à la surface cellulaire) et les TLR9 (présents au niveau endosomal, après endocytose du virus ou des parties du virus) comme récepteurs à l'EBV.

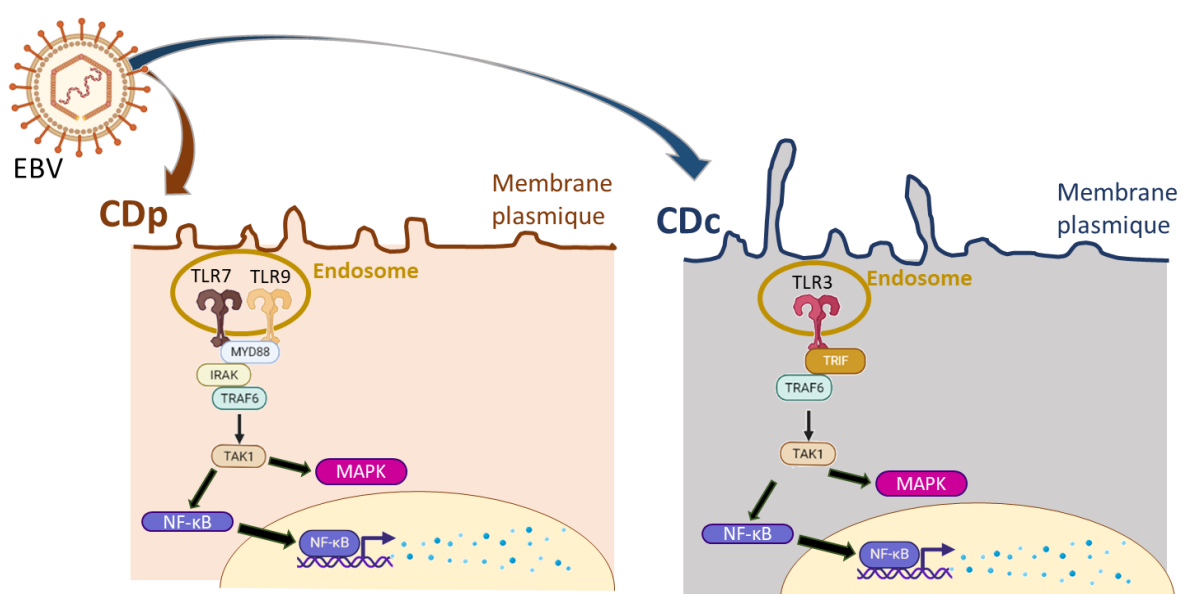


**Figure 21. Réponse immunitaire innée anti-EBV médiée par les monocytes *via* la reconnaissance de TLR2.**

L'EBV, par son ADN viral, active les monocytes *via* TLR2 qui recrute la réponse primaire Myd88. Myd88 active la voie NF $\kappa$ B déclenchant ainsi, par la chimiokine MCP-1, une inflammation (*Réalisée par Jennifer SALIBA*).

### I-1. b) Rôle des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques jouent également un rôle dans la réponse immune dirigée contre l'EBV. On en distingue deux types : les cellules dendritiques conventionnelles (CDc) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (CDp). Les CDc expriment les TLR3 (endosomaux) qui recrutent TRIF (et non MyD88), conduisant à l'activation des voies NF- $\kappa$ B et des MAPK *via* TRAF6 et TAK1, et à la production de cytokines inflammatoires (Chijioke et al., 2013; Lange et al., 2022). Les CDp expriment les TLR7 et TLR9 (endosomaux) qui permettent de détecter les acides nucléiques étrangers, notamment l'ADN viral des gammaherpèsvirus, conduisant au recrutement de MyD88 qui à son tour recrute les membres de la famille IRAK, ce qui aboutit à l'activation des voies NF- $\kappa$ B et des MAPK, *via* TRAF6 et TAK1 (Figure 22). L'activation des TLR endosomaux conduit par ailleurs à l'expression d'interféron de type I à forte activité anti-virale.



**Figure 22. Reconnaissance immunitaire innée anti-EBV par les cellules dendritiques *via* les ligands TLRs.**

L'EBV active les CDp et CDc avec son ADN viral. La réponse immunitaire médiée par CDp engage TLR7 et TLR9 qui recrute MyD88 puis les membres de la famille IRAK. Ces derniers recrutent TRAF6, qui active TAK1. Et, à son tour, TAK1 active les voies de signalisation NF- $\kappa$ B et MAPK. Ces mêmes voies de signalisation sont aussi activées par le TLR3 des CDc, qui recrute TRIF, au lieu de MyD88 (Réalisée par Jennifer SALIBA).

Ces deux types de cellules dendritiques contribuent fortement à la détection des agents pathogènes viraux et agissent de manière complémentaire (Chijioke et al., 2013). Ils sont impliqués dans la préparation à la réponse immune adaptative.

### I-1. c) Rôle des cellules NK

Les cellules NK contribuent fortement à la réponse immune anti-EBV durant l'infection primaire. Les différents événements immunologiques sont surtout étudiés chez les patients atteints de mononucléose infectieuse (MI).

Les cellules NK NKG2A<sup>+</sup> (Natural Killer Group 2A) / KIR<sup>-</sup> (Killer Immunoglobulin-Like Receptor, inhibiteur des cellules NK) se développent préférentiellement pendant la MI et reconnaissent les cellules répliquant lytiquement l'EBV. Ces cellules précocement différenciées sont continuellement perdues au cours de la première décennie de la vie pour être remplacées par des cellules KIR<sup>+</sup>, coïncidant avec un risque accru de développer une MI lorsque l'infection primaire est retardée jusqu'à l'adolescence (Münz, 2017).

Les cellules NK ciblent fortement les cellules en cours de réplication lytique. La diminution d'expression du CMH de classe I (qui interagit avec le récepteur KIR inhibiteur) et l'augmentation de l'expression de la protéine de liaison UL16-1 et de CD112, ligands des récepteurs activateurs NKG2D (Natural Killer Group 2D), les sensibilise à la mort par les cellules NK (Pappworth et al., 2007). Il y a baisse de l'inhibition et augmentation de l'activation des cellules NK (Münz, 2017).

Il a été montré chez les patients atteints de MI qu'il existe chez ces derniers une corrélation inverse entre le nombre de cellules NK d'une part, et la gravité des symptômes associée à la charge virale d'autre part, suggérant une contribution bénéfique directe des cellules NK contre l'infection par l'EBV (Williams et al., 2005). Chijioke et ses collaborateurs ont par ailleurs montré qu'une déplétion *in vivo* des cellules NK de souris humanisées infectées par l'EBV cause des symptômes plus graves, et une plus grande incidence de la tumorigénèse induite par l'EBV, par comparaison avec des souris n'ayant pas subi de déplétion ; il ont également rapporté la survenue d'une lymphoprolifération associée à l'EBV chez un patient souffrant d'une déficience en cellules NK (Chijioke et al., 2016, 2013).

Les récepteurs activateurs des NK conduisant à leur cytotoxicité tels que NKp30, NKp44, NKp46 et NKG2D ont été décrits comme étant impliqués dans la reconnaissance des cellules de lignées cellulaires EBV-positives et à un effet cytotoxique *via* les perforines et granzymes (Chijioke et al., 2016, 2013; Tangye et al., 2017).

Suite à l'infection, les cellules NK libèrent des cytokines immunomodulatrices tels que l'interféron- $\gamma$  de type II (IFN- $\gamma$ ). Elles peuvent limiter la transformation des lymphocytes B par l'EBV par le biais de l'IFN- $\gamma$  en association avec l'activation de leurs ligands par les cellules B infectées (Chijioke et al., 2013; Strowig et al., 2008). Il a été montré qu'une sous-population spécifique de cellules NK, présente dans les amygdales, sécrète fortement de l'IFN- $\gamma$  après activation par les cellules dendritiques et peut inhiber *in vitro* la transformation des cellules B

par l'EBV (Strowig et al., 2008). Ces résultats sont en accord avec ceux montrant qu'une sous-population de cellules NK, caractérisée par les marqueurs CD56<sup>Fort</sup> NKG2A<sup>+</sup> CD94<sup>+</sup> CD54<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup> et avec une forte sécrétion d'IFN- $\gamma$ , s'accumule dans les amygdales de porteurs du virus de l'EBV, et permettent de limiter efficacement la transformation cellulaire (Lünemann et al., 2013). L'inhibition de la transformation cellulaire met en jeu l'engagement partiel de la protéine NKp44 des cellules NK CD56<sup>Fort</sup>/ NKG2A<sup>+</sup> (Jud et al., 2016).

Les cellules NK peuvent agir seules ou en complémentarité de la réponse T spécifique dirigée contre les antigènes viraux. La libération des cytokines immunomodulatrices telles que les interférons  $\alpha$  et  $\beta$  de type I (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ) et l'IFN- $\gamma$  permettent la stimulation de la réponse T (Biron et al., 1999; Williams et al., 2005). Lorsque les T sont activés, en présence des cellules NK (CD56+/CD16+), ils ont la capacité à tuer des cellules de LCLs autologues (Wilson and Morgan, 2002). Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> peuvent tuer les cellules B infectées par différents mécanismes, dont l'interaction entre Fas et le Fas Ligand, les granzymes, et la perforine (A D Wilson et al., 1998).

Les cellules NK peuvent de plus lyser les lymphocytes B infectés, soit directement, soit de manière dépendante des anticorps dirigés contre les protéines virales exprimées à leur surface : les cellules NK interagissent avec les anticorps anti-EBV *via* leurs récepteurs Fc puis sécrètent perforine et granzyme. Un autre mode d'action mettant en jeu les anticorps a récemment été décrit. Dans ce cas, les anticorps sont en interaction avec les particules virales présentes à la surface des B, ce qui ne conduit pas à leur lyse mais permet le transfert de la particule virale aux NK. Ces derniers ne sont pas infectés mais subissent une réorganisation de leur cytosquelette permettant l'internalisation des particules virales qui transitent dans les lysosomes et endosomes précoces puis sont dégradées (Alari-Pahissa et al., 2021). L'élimination de particules virales attachées à la surface des cellules B permet de réduire l'infection sans les tuer. L'hypothèse est que ce mécanisme limite les premières phases de l'infection, donnant du temps pour que la réponse immunitaire adaptative se mette en place et puisse contrôler l'infection par l'EBV.

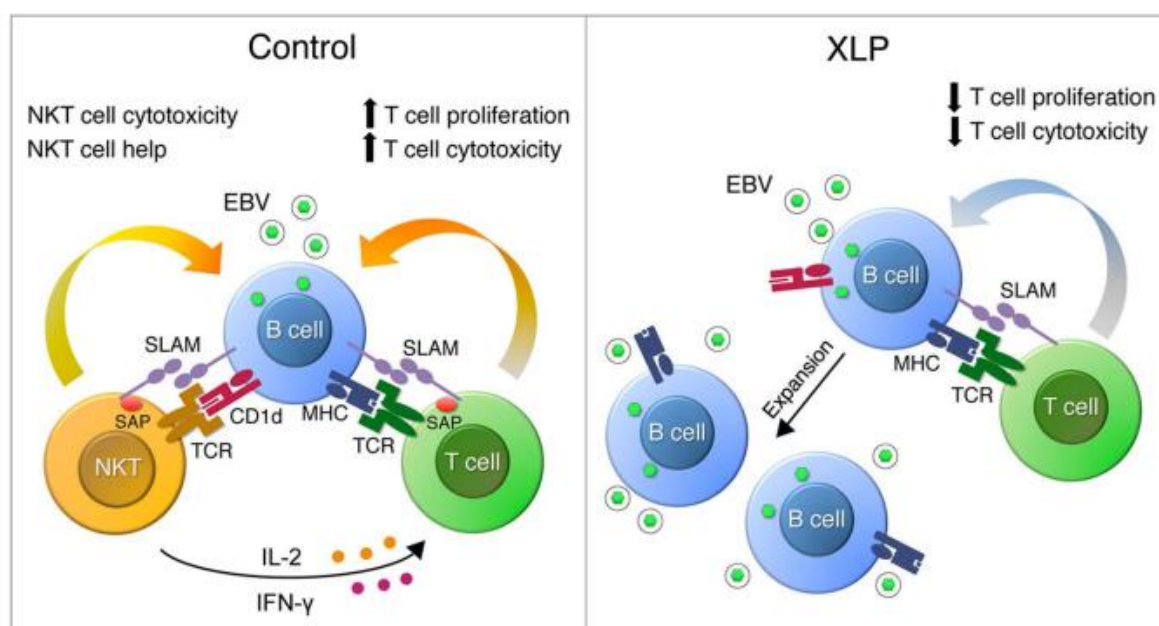
### I-1. d) Rôles des cellules NKT

Les cellules NKT constituent également une sous-population cellulaire fortement impliquée dans la réponse immunitaire anti-EBV. Elles constituent un groupe hétérogène, à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative et partagent des marqueurs identiques à ceux des cellules T (CD3) et des cellules NK (CD16, CD56), ainsi que des mécanismes d'action communs à ces deux types cellulaires.



## Partie 2. Surveillance immune de l'infection par l'EBV et échappement tumoral

Les cellules NKT reconnaissent des antigènes lipidiques ou glycolipidiques présentés par le CD1d des cellules infectées (analogue au CMH de classe I), *via* un TCR particulier. Elles transmettent des signaux secondaires, tels que la production d'IFN- $\gamma$  et d'IL-2 responsables de l'augmentation de l'efficacité des lymphocytes T (Chung et al., 2013; Priatel et al., 2014). L'expression membranaire de CD1d induite à la surface des cellules de LCLs, déclenche fortement la cytotoxicité des NKT (production de perforine et de granzyme) et la sécrétion d'IFN- $\gamma$  (Bendelac et al., 2007). Il a été montré que les cellules NKT peuvent limiter *in vitro* la transformation des lymphocytes B suite à l'infection par l'EBV et sont absentes chez certains individus sensibles aux pathologies induites par l'EBV (Rickinson et al., 2014). La déplétion de ce groupe de cellules avant infection par le virus conduit à l'augmentation du nombre de cellules B infectées et de la quantité de génome viral détecté (Chung et al., 2013; Priatel et al., 2014). La figure 23 représente les mécanismes d'action des NKT proposés pour limiter l'infection par le virus.



**Figure 23. Mécanisme d'action des NKT pour limiter la réplication du virus d'Epstein-Barr.**

Dans le cas d'individus immunocompétents, les NKT reconnaissent et interviennent rapidement dans la cytotoxicité directe des cellules B CD1d<sup>+</sup> infectées et stimulent les lymphocytes T spécifiques de l'antigène par la production d'IFN- $\gamma$  et IL-2, limitant ainsi l'infection. Par contre, dans le cas d'individus immunodéprimés qui manquent des NKT, comme par exemple la maladie XLP (maladie lymphoproliférative liée à l'X : déficit immunitaire électif pour l'EBV se révélant par une MI gravissime), les réponses adaptatives sont plus lentes. Ceci entraîne une reconnaissance retardée des cellules B infectées par l'EBV, et par la suite une augmentation de la charge virale. Les interactions SLAM/SAP jouent aussi un rôle dans l'activation des lymphocytes T.

SLAM : molécule de signalisation d'activation lymphocytaire ; SAP : protéine associée à SLAM ; TCR : récepteur des lymphocytes T (D'après Priatel et al., 2014).

### I-1. e) Rôle de quelques autres facteurs

L'interleukine-15, qui peut être sécrétée par les monocytes, les macrophages ou les cellules dendritiques est impliquée dans la réponse innée anti-virale. Cette cytokine stimule la synthèse et la sécrétion de l'IFN- $\gamma$  à partir des cellules NK et des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, ce qui permet d'agir de manière autocrine ou paracrine pour moduler le potentiel cytotoxique des cellules NK (Gosselin et al., 1999).

Une fonction importante du magnésium (Mg<sup>2+</sup>) a également été mise en évidence dans l'immunité antivirale contre l'EBV. Il est essentiel pour les fonctions cytotoxiques des cellules NK et l'élimination des cellules B infectées par l'EBV *via* la protéine NKG2D (Chaigne-Delalande et al., 2013).

### I-2. Immunité adaptative

La gravité des maladies associées à l'EBV, en particulier chez les individus immunodéprimés, souligne l'importance des réponses immunitaires spécifiques dans le contrôle de cette infection et la préservation de l'intégrité de l'hôte en reconnaissant les antigènes viraux. L'immunité adaptative va permettre une surveillance ciblée et l'établissement de cellules mémoires permettant des réponses efficaces. L'immunité adaptative à médiation cellulaire et humorale contribuent toutes deux au contrôle de l'infection virale, qu'elle soit primaire ou persistante.

#### I-2. a) Immunité adaptative à médiation cellulaire

L'immunité adaptative à médiation cellulaire est en particulier spécialisée dans la lutte contre les pathogènes. Elle joue un rôle fondamental dans le contrôle des phases primaire et persistante de la propagation de l'EBV. Le paragraphe suivant met l'accent sur les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup>, ainsi que sur les lymphocytes T $\gamma\delta$ , principaux acteurs de l'immunité acquise impliqués dans la surveillance de l'infection par l'EBV.

#### I-2. a) i- Rôle des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>

Les lymphocytes T cytotoxiques sont les effecteurs les plus importants dans le contrôle de l'infection virale par l'EBV. Ils sont dirigés à la fois contre les antigènes du cycle lytique et ceux de la latence.

Un grand nombre de données porte sur le rôle des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> lors de l'infection primaire. L'étude de l'équipe de Long a montré qu'il existe chez les patients infectés un nombre anormalement élevé de lymphocytes T, dont la majorité sont des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques, dirigés vers les antigènes du cycle lytique de l'EBV (Long et al., 2019a). Les patients atteints de MI aiguë présentent un très grand nombre de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Chatterjee et al., 2019). Durant l'infection primaire symptomatique, les cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques de la réponse anti-EBV prolifèrent et expriment fortement les marqueurs d'activation HLA-DR, CD69 et CD38 (Chatterjee et al., 2019).

L'infection par une faible dose d'EBV chez des souris humanisées montre une augmentation retardée des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, mais avec une fréquence 3 à 5 fois plus élevée envers les antigènes spécifiques du cycle lytique (protéine précoce du cycle lytique BMLF1 notamment) ou latent (LMP2 notamment) (Chatterjee et al., 2019). Plus de 44% des lymphocytes CD8<sup>+</sup> spécifiques d'un épitope d'une protéine du cycle lytique a des phénotypes activé ou mémoire. La proportion de CD8<sup>+</sup> mémoires augmente significativement avec l'âge mais baisse en fonctionnalité, tandis qu'avec l'avancement de l'infection la fréquence des T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'épitopes de protéines du cycle latent augmente (Martorelli et al., 2012). Durant l'infection latente, les réponses aux antigènes du cycle lytique sont conservées en réponse mémoire (celles aux antigènes immédiats dominant, celles aux antigènes précoces et à expression tardive sont rares). En ce qui concerne la réponse dirigée vers les antigènes de latence, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dominants sont ceux qui ciblent les protéines EBNA3A, 3B et 3C. Ceux spécifiques d'EBNA1, EBNA2 et LMP2 sont moins nombreux et ceux dirigés contre EBNA-LP et LMP1 sont rares (Long et al., 2019a).

La déplétion en T CD8<sup>+</sup> chez des souris humanisées possédant les composants d'un système immunitaire humain reconstitué et ayant une infection par l'EBV de type MI, conduit à l'augmentation de la charge virale et de l'incidence tumorale. De plus, une immunodéficience associée aux gènes impliqués dans les réponses T anti-EBV (*CD27* et *SH2D1A*) conduit à l'impossibilité de contrôler les lymphomes associés à l'EBV, ce qui met en évidence l'importance des fonctions cytotoxiques du système immunitaire pour contrôler ce virus.

Par ailleurs, de manière générale, dans le cas de l'épuisement des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> suite à leur activation persistante causée par une charge antigénique élevée, ces cellules perdent leurs capacités cytotoxiques (Kim and Ahmed, 2010). Puis il y a progressivement augmentation de l'expression de récepteurs inhibiteurs à leur surface, dont PD-1, TIM-3, LAG-3 et BTLA ; les T PD-1<sup>+</sup> perdent leur capacité à se multiplier. Les T épuisés deviennent incapables de produire de l'IFN- $\gamma$ , ce qui conduit à un mauvais contrôle immunitaire des infections et des tumeurs (Barber et al., 2006; Blackburn et al., 2009).

L'augmentation de l'expression de ces points de contrôle inhibiteurs est associée à des charges virales élevées pour l'EBV. Par contre, dans les cas de l'infection primaire symptomatique par ce virus, il a été montré que la population de cellules T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> conserve ses fonctionnalités et sa capacité proliférative. Malgré l'expression de PD-1, les cellules sont capables de produire des molécules associées à la cytotoxicité, comme le montre l'expression du marqueur de dégranulation CD107a. De plus, l'infection par l'EBV conduit à la sécrétion de molécules inflammatoires (IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) et immunorégulatrices (IL-10) durant la durée de l'infection aiguë sévère, ce qui stimule la réactivation de la réponse T anti-EBV (Rowe and Zuo, 2010). La population des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> est hétérogène après l'infection par l'EBV. Il a été mis en évidence que les cellules T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> TIM3<sup>+</sup> sont importantes pour le contrôle de l'infection par l'EBV (Chatterjee et al., 2019). Par ailleurs, le traitement avec un anticorps anti-PD-1 conduit à l'augmentation de la charge virale et du nombre de cellules proliférantes dans le cas de souris infectées. Malgré la fonction inhibitrice du récepteur PD-1, la signalisation l'impliquant semble être importante pour la persistance et le maintien de la fonctionnalité de ces lymphocytes T, ainsi que pour un contrôle plus efficace de ce virus oncogène (Chatterjee et al., 2019).

### I-2. a) ii- Rôle des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

La réponse anti-EBV des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> est peu décrite dans la littérature par comparaison à celle des lymphocytes CD8<sup>+</sup>, bien qu'il existe des cellules T CD4<sup>+</sup> circulantes spécifiques de l'EBV (Amyes et al., 2003). Il y a de plus une corrélation positive entre la fréquence des réponses anti-EBV des T CD4<sup>+</sup> et la charge virale de l'EBV, suggérant que ces réponses sont conduites par des antigènes viraux (Precopio et al., 2003).

Des analyses ont confirmé que lors de la MI, la majorité des lymphocytes effecteurs T CD4<sup>+</sup> expriment des récepteurs de co-stimulation CD27 et CD28 (marqueurs communs aux T naïfs) en réponse aux épitopes individuels des protéines du cycle latent et lytique de l'EBV. Par contre, les T CD4<sup>+</sup> spécifiques des antigènes du cycle lytique expriment CD45RA (marqueur commun des lymphocytes T naïfs) avec une fréquence plus élevée par comparaison aux ceux spécifiques des protéines de latence (Amyes et al., 2003). D'un autre côté, il a été montré, par analyse des tétramères CMH-II (complexe de quatre molécules de CMH associé à un peptide spécifique qui se lie à un fluorochrome), que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoire spécifiques à l'EBV ont le même phénotype, qu'ils ciblent des antigènes latents ou lytiques (Long et al., 2019a).

Trois protéines structurelles des particules virales : BcLF1, BDLF1 et BORF1, sont reconnues par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> des individus infectés (Dowell et al., 2021). La réponse des LT CD4<sup>+</sup> cytotoxiques est mise en jeu lors du cycle lytique mais n'est pas limitée à ce dernier. En effet, la protéine de latence EBNA1, faiblement reconnue par les CD8<sup>+</sup>, intervient fortement dans la réponse CD4<sup>+</sup> (Nikiforow et al., 2001). Des études ont montré que chez les patients atteints de MI, les protéines de latence EBNA2 (Long et al., 2013; Nagy et al., 2012) et EBNA3 (Precopio et al., 2003) constituent des cibles de la réponse T CD4<sup>+</sup> spécifique de l'EBV. Un mécanisme particulier par lequel les TCD4<sup>+</sup> contribuent au contrôle de l'infection par l'EBV a été décrit par l'équipe de Nagy. Lors de l'infection primaire, les T CD4<sup>+</sup> activés sécrètent des cytokines solubles (IL-4, IL-10, IL-13 et IL-21) qui modulent l'expression de gènes de l'EBV chez les lymphocytes B : il y a réduction de l'expression d'EBNA2 (médiée par CD40L soluble) mis en parallèle avec la baisse d'activité du promoteur Cp de la latence III. Il y a également augmentation de l'expression de LMP1 (médiée par IL-21), ce qui contribue à leur reconnaissance et à leur élimination. Les T CD4<sup>+</sup> participent ainsi également à la réduction de la capacité proliférative des lymphocytes B infectés (Nagy et al., 2012).

Après guérison, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dirigés contre l'EBV représentent 0,1% des T CD4 circulants, et persistent durant l'infection latente (Amyes et al., 2003). La réactivation du cycle lytique peut générer une réponse cytotoxique CD4<sup>+</sup> dominante par rapport à la réponse CD8<sup>+</sup> (A. D. Wilson et al., 1998).

Les T CD4<sup>+</sup> agissent comme des effecteurs de la réponse immunitaire anti-EBV, même s'ils sont considérés comme auxiliaires de la réponse T CD8<sup>+</sup>. Leur activité cytotoxique (antiproliférative et cytolytique), s'exerce par la production de perforine, granzyme B et granzyme A (molécule proche du granzyme), la production d'IFN $\gamma$  et l'axe Fas/Fas ligand (MacArthur et al., 2007; Nikiforow et al., 2001; A. D. Wilson et al., 1998). Des expérimentations menées avec des peptides dérivés de protéines du cycle latent ont mis en évidence une augmentation chez les cellules CD4<sup>+</sup> de l'expression membranaire de CD107a (marqueur de dégranulation), avec libération de perforine et de granzyme ce qui va dans le sens d'une réponse T CD4<sup>+</sup> efficace envers les lymphocytes B pouvant présenter les peptides viraux *via* le CMH-II (Long et al., 2019a).

Nikiforow et ses collaborateurs ont de plus montré que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> jouent un rôle primordial dans l'inhibition précoce de la prolifération des cellules B infectées par l'EBV qui expriment le CD23 (marqueur d'activation et de croissance). Une déplétion de l'ensemble des T CD3<sup>+</sup>, des T CD4<sup>+</sup> ou des T CD8<sup>+</sup> met en évidence que seuls les T CD4<sup>+</sup> sont capables d'éliminer les B CD23<sup>+</sup>, contrairement aux T CD8<sup>+</sup>. Les T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques jouent un rôle

majeur dans l'élimination des lymphocytes B en latence III mais l'élimination des B durant les étapes précoces de l'infection nécessite les T CD4<sup>+</sup> effecteurs (Nikiforow et al., 2001).

Il a par ailleurs été démontré que la cytotoxicité des T CD4<sup>+</sup> envers les cellules infectées par l'EBV diffère selon leur profil Th1 ou Th2. Les CD4<sup>+</sup> de profil Th1 qui synthétisent en particulier l'IL-2, l'IFN- $\gamma$  ou le TNF $\beta$  (et ont un pouvoir lytique important) jouent un rôle inhibiteur de la transformation des lymphocytes B infectés, contrairement aux CD4<sup>+</sup> de profil Th2 qui synthétisent en particulier l'IL-4, l'IL-5 ou l'IL-10 (et ont un pouvoir lytique faible), qui potentialisent au contraire leur transformation (MacArthur et al., 2007).

### I-2. a) iii- Rôle des lymphocytes T $\gamma\delta$

Les lymphocytes T $\gamma\delta$  sont une sous-population de cellules T particulières présentes dans différents tissus périphériques (peau, intestin, poumons...) et également retrouvées dans les organes lymphoïdes (ganglions). Ils possèdent un TCR, ce qui est propre à la réponse adaptative ; cependant ce dernier diffère de celui des lymphocytes T conventionnels CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> (association de chaînes  $\gamma\delta$  et non  $\alpha\beta$ ). Par ailleurs, ils reconnaissent les antigènes de manière indépendante du CMH, et expriment des TLRs, ce qui les rapproche dans leur fonctionnement de la réponse innée. Ils sont connus pour reconnaître une grande variété d'antigènes.

Peu d'études ont été menées sur cette sous-population lymphocytaire chez les patients atteints de MI. Il a toutefois été observé une forte expression du marqueur membranaire d'activation CD38 et une augmentation de l'expression transcriptionnelle des gènes codant pour les chaînes  $\gamma$  et  $\delta$  du TCR (Long et al., 2019b). En présence du virus il y a également augmentation de l'expression du HLA-DR membranaire, indiquant une augmentation de l'activation cellulaire. D'autres études ont souligné des mécanismes majeurs impliqués dans la réponse anti-EBV des T $\gamma\delta$ . Il a été observé des rôles costimulateurs pour le récepteur CD277 (également exprimé par les cellules T et NK) (Djaoud et al., 2017) et le récepteur NKG2D (également exprimé par les cellules NK) (Djaoud et al., 2017; Sabbaghi et al., 2020). Par ailleurs, les axes pro-apoptotiques TRAILR/TRAIL et Fas/Fas ligand sont fonctionnels vis-à-vis des cellules de LCLs (Sabbaghi et al., 2020). Il a également été observé que l'infection latente stimule de manière plus efficace la prolifération des cellules T $\gamma\delta$  que la phase lytique (Djaoud et al., 2017).

### I-2. b) Immunité adaptative à médiation humorale

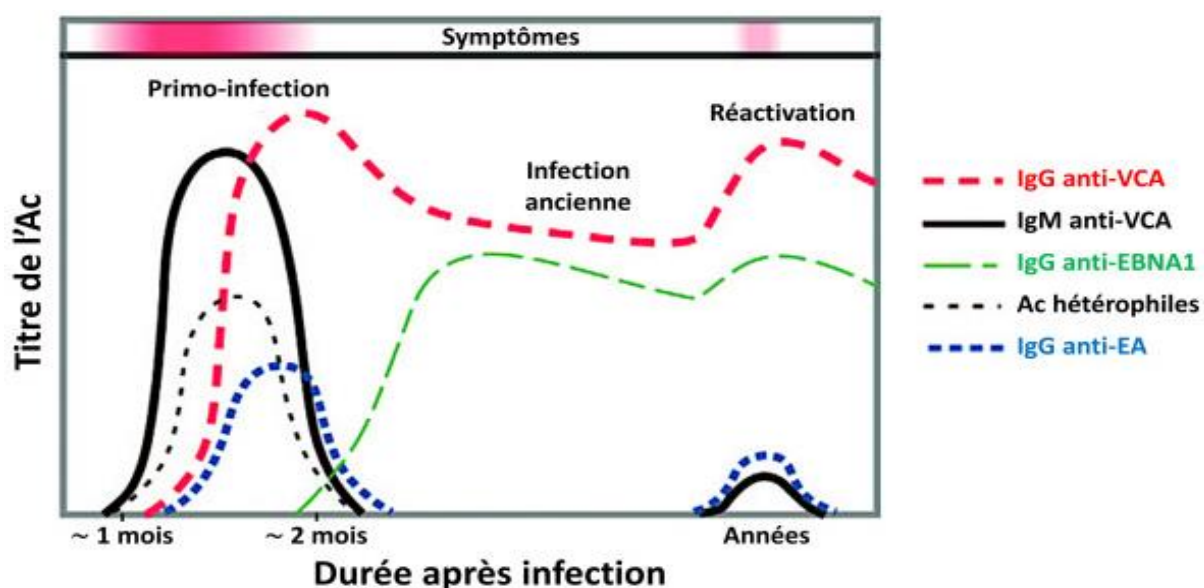
L'infection par l'EBV et l'immortalisation des lymphocytes B par l'EBV met en jeu l'immunité adaptative à médiation cellulaire, ainsi que celle à médiation humorale. L'évaluation de la contribution de la réponse humorale se fait par détection des anticorps dirigés contre les protéines du cycle lytique ou les protéines de latence.

La production virale et les différentes étapes de l'infection des cellules B sont associées à l'expression séquentielle des antigènes viraux. La réponse humorale anti-EBV dépend ainsi des antigènes exprimés dans le temps (Middeldorp, 2015).

L'infection primaire des cellules B déclenche la réponse humorale, qui est dans un premier temps dirigée vers les antigènes associés au cycle lytique avec la production d'anticorps spécifiques des protéines de l'EBV très précoces (ZEBRA) et précoces (EA : early antigen), de la capside (VCA : Viral Capside Antigens), de la membrane (MA : Membrane Antigens) et de l'enveloppe (glycoprotéines gp350/220). On observe tout d'abord des taux élevés d'IgM dirigées contre les protéines VCA et EA (Henle et al., 1979; Kaschka et al., 1982; Martorelli et al., 2012). Les protéines VCA et EA qui sont la cible de réponses d'anticorps cytolytiques, peuvent conduire à un effet cytotoxique sur les cellules en activant la voie du complément ou conduire au recrutement de cellules porteuses de récepteurs aux fragments Fc (comme les cellules NK, ou les macrophages (Middeldorp, 2015)). Vient ensuite la réponse IgG anti-VCA concomitante des réponses IgM anti-VCA et IgG anti-EA. Les anticorps IgG et IgM anti-VCA-p18 et anti-VCA-p23 peuvent en particulier être détectables (Henle et al., 1979; Middeldorp, 2015). Il est observé une augmentation significative de plus de 50% des IgG1, ce qui a pour conséquence une augmentation des IgG totales (Kaschka et al., 1982). Les réponses humorales dirigées vers les glycoprotéines de capsid gp125/110 et d'enveloppe gp350/220 ont lieu en parallèle des réponses IgM et IgG anti-VCA. Des anticorps réactifs d'isotype IgA dirigés contre gp350/220 ont été détectés mais avec une moindre efficacité contre l'infection virale (Middeldorp, 2015). L'équipe de Martorelli a par ailleurs mis en évidence de fortes concentrations en anticorps neutralisants dirigés contre gp350 (anticorps particuliers permettant de prévenir l'infection en empêchant l'entrée du virus dans les cellules cibles) (Martorelli et al., 2012). Les réponses IgM anti-VCA et IgG anti-EA vont ensuite chuter rapidement jusqu'à atteindre des niveaux très faibles ou devenir non détectables. Lorsque ces deux dernières restent élevées, ceci indique une résorption problématique de la MI, associée à des défauts de la réponse T anti-EBV (Middeldorp, 2015).

Lors de la première exposition aux antigènes de l'EBV, une réponse humorale non spécifique peut être détectée : production d'anticorps hétérophiles (AH) non spécifiques de l'EBV

provenant de cellules B stimulées par la voie de cytokines (Middeldorp, 2015). Il s'agit d'IgM qui peuvent être détectées à très forte concentration dans le sérum de sujets atteints de MI. Durant la phase aiguë de la MI, la plupart des patients présentent une réponse IgG dirigée vers des protéines du cycle lytique mais également vers les protéines EBNA1 et EBNA2, associées à la phase de latence (la réponse anti-EBNA se mettant en place un peu plus tardivement) (Middeldorp, 2015). Les réponses IgG anti-VCA et IgG anti-EBNA1 vont persister tout au long de la vie (infection latente), avec des ré-augmentations ponctuelles lors des phases de réactivation, de même que pour les réponses IgM anti-VCA ou IgG anti-EA (Figure 24).



**Figure 24. Cinétique d'expression des immunoglobulines anti-EBV lors de la primo-infection, la convalescence et la réactivation du virus.**

Dès les premiers symptômes, les IgM anti-VCA sont détectables, puis après quelques semaines, elles disparaissent au profit des IgG anti-VCA, avec un pic durant le premier mois ; elles persistent durant toute la vie. Les IgG anti-EA apparaissent également au moment des premiers signes cliniques et chutent en quelques mois jusqu'à atteindre un niveau très faible ou indétectables. Les Ig anti-EBNA apparaissent plus tardivement, environ deux mois après l'infection, et restent exprimées de manière inconstante. Les IgG anti-VCA et anti-EA sont ré-exprimées de manière moins importante lors de la réactivation virale. Le début d'infection s'accompagne de la production d'anticorps hétérophiles non spécifiques de l'EBV (Dieudonne et al., 2021).

Les cinétiques de réponses ne sont pas uniformes entre les individus (Henle et al., 1979). Il existe de fortes variabilités individuelles dans la réponse à l'infection par l'EBV (Middeldorp, 2015).



La réponse humorale, associée à la réponse cellulaire joue un rôle important dans le contrôle de l'infection par l'EBV que ce soit lors de l'infection primaire ou de l'infection latente (Kaschka et al., 1982; Martorelli et al., 2012).

Pour conclure cette partie sur la surveillance immune de l'infection par l'EBV, que ce soit lors de l'infection primaire ou lors de l'infection latente, l'immunité innée et l'immunité adaptative (qu'elle soit cellulaire ou humorale) jouent un rôle fondamental pour contenir l'infection et assurer un équilibre hôte/virus tout au long de la vie de l'individu. Ceci évite l'émergence de tumeurs et en particulier celle de lymphomes B lors de la prolifération cellulaire associée à la latence III de l'EBV au cours de l'infection primaire ou lors des phases de réactivation.

### II- Échappement à l'immunosurveillance et tumeurs associées à l'EBV

L'EBV est connu comme étant la cause de la MI, en général placée sous le contrôle d'une réponse immune vigoureuse. Bien qu'il existe une surveillance de l'infection par l'EBV, le virus est toutefois à l'origine, ou associé, à de nombreux cancers solides (nasopharynx, estomac, seins...) ou liquides, tels que des lymphomes (lymphome de Hodgkin, lymphomes non Hodgkiniens comme le lymphome de Burkitt...). En 1997, le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a classé l'EBV en groupe cancérigène I. Les tumeurs associées à l'EBV représentent 1,5% de tous les cancers humains.

#### II-1. Mononucléose infectieuse

L'âge de l'infection primaire par l'EBV est un facteur important à prendre en compte par rapport au symptômes observés. Chez les jeunes enfants elle est généralement asymptomatique, alors que chez les adolescents et jeunes adultes elle se manifeste dans environ 75% des cas par une MI typique, dans environ 15% des cas par une MI atypique et dans 10% des cas de manière asymptomatique (Dunmire et al., 2015).

Sprunt et Evans ont utilisé le terme de MI pour la première fois en 1920 et l'ont décrite comme une maladie infectieuse aiguë se manifestant par la présence de grands lymphocytes sanguins périphériques atypiques (il s'agit de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> activés, dont la plupart permettent l'élimination des cellules B infectées par l'EBV, notamment ceux en latence III virale qui sont en cours de prolifération).

Les symptômes caractéristiques de la MI sont la fièvre, la fatigue, une hypertrophie des ganglions cervicaux et des maux de gorge qui durent une dizaine de jours en moyenne ; la fatigue et les adénopathies cervicales peuvent toutefois persister pendant plusieurs semaines (Dunmire et al., 2015; Gequelin et al., 2011).

Cette maladie fréquente est très contagieuse et généralement bénigne. Elle est naturellement résolutive et évolue vers une guérison sans traitement spécifique. Certains antiviraux, tels que l'acyclovir et le valacyclovir ont été testés *in vivo* mais sans bénéfice clinique convaincant (Dunmire et al., 2015; Gequelin et al., 2011; Tynell et al., 1996).

Cependant, dans certains cas la phase aiguë peut perdurer suite à la primo-infection et s'accompagner de conséquences à long terme comme le développement de tumeurs (Dunmire et al., 2015). Dans les états dits EBV Actif Chronique (EBVAC), différents signes peuvent apparaître (fièvre, lymphadénopathie, hépatite...). Ils sont accompagnés de niveaux élevés d'ADN de l'EBV dans le sang et dans de nombreux cas le virus infecte les cellules T ou NK plutôt que comme habituellement les cellules B (Kimura et al., 2001). Ce syndrome complexe présente à la fois des caractéristiques d'immunodéficience et de néoplasme malin (Fujiwara and Nakamura, 2020).

### II-2. Tumeurs solides

Plusieurs types de cancers solides sont associés à l'EBV suite à l'infection des cellules épithéliales. Il s'agit de du carcinome indifférencié du nasopharynx, ainsi que de certains carcinomes gastriques ou cancers du sein.

#### II-2. a) Carcinome nasopharyngé (CNP)

Le CNP est le cancer humain défini comme étant le plus fortement associé à une infection par l'EBV (99% des cas), le génome viral étant retrouvé au sein des cellules modifiées. L'ADN de l'EBV a été détecté en 1973 par hybridation *in situ* dans des cellules tumorales issues de CNP (Wolf et al., 1973). Des tests réalisés à partir de l'ADN viral extrait des cellules épithéliales infectées, ont par la suite mis en évidence la présence systématique de l'EBV, quelle que soit la zone d'incidence (Gequelin et al., 2011).

Dans les années 1980, des taux sériques d'IgA anti-VCA ont été établis comme l'un des indicateurs du dépistage des patients atteints de CNP. L'expression de gènes latents, suite à l'infection par l'EBV, offre des avantages de croissance et de survie cellulaire responsables du développement du cancer (Cao et al., 2021). Les cellules issues de CNP sont en programme

de latence II de l'EBV, et expriment les protéines de latence virale nucléaire EBNA1 et membranaires LMP1 et LMP2.

Les protéines membranaires jouent un rôle crucial dans l'émergence du CNP (Dawson et al., 2012). Certaines régions fragiles de l'ADN constituent des loci favorables à l'intégration de l'ADN de l'EBV ; une étude récente a montré que cela se produit à 9,6% dans les CNP, ce qui peut offrir de nouvelles stratégies pour la prévention de l'infection à EBV en inhibant l'intégrase permettant l'insertion (Cao et al., 2021).

### II-2. b) Carcinome gastrique (CG)

Dès 1992, la détection de de molécules associées à l'EBV dans les CG a permis de démontrer la présence d'ARN non codants EBER-1. Toutefois, bien que 9% des patients atteints de CG soient EBV positifs, les profils cliniques et les phénotypes moléculaires peuvent être différents (Burke et al., 1990).

Il a été rapporté une expression augmentée des points de contrôle immuns inhibiteurs PD-L1 et PD-L2 dans des tumeurs de CG EBV positives (Cao et al., 2021). Dans la majorité des cas (environ 60%), les cellules des CG associés à l'EBV sont en programme de latence I de l'EBV et expriment les ARN non codants EBERs et BARTs ainsi que la protéine nucléaire EBNA1. Cependant, dans 40% des cas, elles sont en latence II de l'EBV et expriment en plus les protéines LMP2, en particulier LMP2A (Imai et al., 1994). Il a récemment été mis en évidence l'intégration de l'ADN de l'EBV dans le génome de l'hôte dans 25,6% des cas lors de la tumorigénèse du CG (Cao et al., 2021).

### II-2. c) Cancer du sein (CS)

La contribution de l'EBV dans le développement du CS est beaucoup moins claire que pour les CNP et les CG. En 1995, l'infection par l'EBV a été associée pour la première fois au cancer du sein (Labrecque et al., 1995). Plusieurs études récentes affirment que l'infection à EBV prédispose les cellules épithéliales mammaires à une transformation plus maligne (Cao et al., 2021; Lawson and Glenn, 2021). Elles rapportent également que 30 à 50% des cas de CS sont positifs pour l'EBV (Arias-Calvachi et al., 2022).

La présence d'ARN non codants ou de protéines virales de l'EBV a pu être mise en évidence chez des cellules mammaires tumorales, qu'ils soient associés au cycle lytique : protéine très précoce BZLF1 ; ou à la latence : ARN non codants EBER-1 et EBER-2, protéines BARF0 et BARF1 (BamHI-A rightward frame 0 and 1), EBNA-1, EBNA-2 et LMP1. Ceci suggère l'implication de l'EBV dans ces tumeurs. Dans certains cas de CS EBER-1 et LMP1 n'ont toutefois pas été détectés (Arias-Calvachi et al., 2022).

Compte-tenu des ARN non codants et protéines exprimés, l'infection est considérée comme étant associée de manière générale à une latence de type II, de même que pour les CNP (Hu et al., 2016).

Les mécanismes moléculaires mettant en jeu l'EBV et associés à l'oncogenèse ne sont pas encore bien établis. La détection de certaines protéines virales suggère leur implication, en particulier pour LMP1, *via* l'activation des cascades de signalisation Her2/Her3 (Arias-Calvachi et al., 2022; Cao et al., 2021). Parmi les hypothèses émises, il est évoqué le principe dit de "hit and run" où le virus infecte les cellules mammaires primaires puis n'est plus indispensable dans la progression de la tumeur (Arias-Calvachi et al., 2022).

### II-3. Lymphoproliférations

Outre les cellules épithéliales, le virus de l'EBV peut infecter les cellules lymphocytaires et conduire à des tumeurs dites liquides. Compte-tenu de son fort pouvoir infectant pour les lymphocytes B il s'agit généralement de lymphomes B, bien que des lymphome T ou NK puissent également émerger.

#### II-3. a) Lymphoprolifération post-transplantation

Les syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation (PTLDs, Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders) sont principalement causés par l'EBV, détecté dans environ 80% des cas. Les PTLD sont généralement associées à une réactivation du virus au cours du traitement immunosuppresseur. Elles résultent d'un déséquilibre qui se crée entre l'immunosurveillance et l'immunosuppression acquise suite à la transplantation d'organes solides ou de cellules souches hématopoïétiques. Les PTLD peuvent causer des complications potentiellement mortelles (Nijland et al., 2015).

Lors de l'immunosuppression, il y a inhibition de l'activité des lymphocytes T qui ne peuvent plus contrôler les cellules B infectées en programme de prolifération. Les lymphocytes B tumoraux expriment l'ensemble des protéines de latence III de l'EBV et ressemblent aux LCLs en culture *in vitro*. Lorsqu'un patient EBV<sup>-</sup> reçoit une greffe EBV<sup>+</sup>, l'immunosuppression engendre une prolifération incontrôlée des cellules B transformées par l'EBV (comme lors de la primo-infection mais en absence de la surveillance immune), ce qui peut conduire au développement d'une PTLD (Ferla et al., 2020). Le risque de développer une PTLD est plus élevé chez les patients EBV<sup>-</sup> que pour ceux qui sont séropositifs et déjà en infection latente (Nijland et al., 2015).

La corrélation entre la charge virale de l'EBV et le risque de développer une PTLD semble importante à prendre en considération dans la prévention de ce type de maladie (Dharnidharka, 2017). Dans certains cas, la PTLD peut avoir pour origine les lymphocytes T ou les cellules NK qui sont également des cibles de l'EBV (Draoua et al., 2004).

### II-3. b) Lymphome de Hodgkin

Les patients atteints de lymphomes de Hodgkin présentent comme signes cliniques généraux de la fièvre, une perte de poids, des sueurs nocturnes et un trouble systémique apparent. Ces symptômes sont le reflet d'une réponse immunitaire anormale (Skinnider and Mak, 2002).

Le lymphome de Hodgkin est caractérisé de grandes cellules malignes infiltrant les ganglions : les cellules de Reed-Sternberg (RS). Ces dernières représentent en général environ 1% de la population cellulaire du ganglion atteint (Skinnider and Mak, 2002) et n'expriment pas de marqueurs spécifiques d'origine lymphoïde. Il a cependant pu être établi qu'elles sont d'origine B et présentent un réarrangement des gènes des chaînes lourdes des Ig. Par contre, elles n'expriment pas le récepteur B à l'antigène (B Cell Receptor - BCR). Les mutations qui affectent le BCR diminuent l'affinité envers les antigènes lors de la maturation dans le centre germinatif conduisant normalement les cellules à leur mort par apoptose. Dans le cas du lymphome de Hodgkin, la transformation cellulaire induite par l'EBV peut contribuer à leur survie : le génome de l'EBV est détecté dans environ 40% des cas (Massini et al., 2009; Vockerodt et al., 2014). Il a été mis en évidence pour la première fois chez des patients atteints de lymphomes Hodgkinien avec des titres d'anticorps élevés contre les antigènes de l'EBV et précédant de plusieurs années le développement du lymphome (Levine et al., 1971).

L'infection par l'EBV précède la transformation maligne chez les cellules tumorales. La phase de latence est de type II avec expression des protéines virales EBNA1, LMP1 et LMP2A (Massini et al., 2009). LMP1 est un mimétique du récepteur CD40 conduisant à l'activation constitutive de la voie NF- $\kappa$ B et à la baisse de l'expression des récepteurs des cellules B (CD19, CD20, CD22, CD79A, CD79B et BLNK) (Massini et al., 2009; Vockerodt et al., 2014). Les cellules de RS produisent des cytokines spécifiques. La production de ces dernières peut être modifiée par l'infection virale et conduire à la modification de la distribution et de l'activité des cellules immunitaires présentes dans leur microenvironnement. L'IL-12, plus fortement exprimé, est responsable de l'orientation vers une réponse Th1 (Massini et al., 2009; Skinnider and Mak, 2002).

Les cellules T CD8<sup>+</sup> sont plus nombreuses mais la réponse immune reste peu efficace car la sécrétion d'IL-10, dont l'expression est induite par LMP1, établit un microenvironnement immunosuppresseur. Par ailleurs, LMP1 induit l'expression du point de contrôle inhibiteur PD-L1 à leur surface (Green et al., 2012), ce qui contribue à l'inhibition et à l'épuisement fonctionnel des T effecteurs exprimant PD-1 (Muenst et al., 2009; Yamamoto et al., 2008). Il a ainsi été suggéré que ces patients pourraient ainsi répondre à une immunothérapie anti-PD-1 (Ansell et al., 2015). Les lymphocytes T régulateurs (Tregs) anergiques sont également attirés par l'expression accrue de CCL20 et contribuent à inhiber la réponse immune (Massini et al., 2009).

### II-3. c) Lymphome de Burkitt

Le lymphome de Burkitt (LB) est un lymphome particulièrement agressif et le plus fréquent chez l'enfant parmi les lymphomes non-Hodgkiniens. Il est associé à la surexpression du proto-oncogène *MYC* en raison d'une translocation entre le chromosome 8 le portant et le chromosomes 14 (locus des chaînes lourdes des IgG) , 2 (locus des chaînes légères  $\kappa$ ) ou 22 (locus des chaînes légères  $\lambda$ ), le mettant ainsi sous le contrôle d'un promoteur permettant son expression de manière constitutive et amplifiée (Miles et al., 2012).

Trois types de lymphomes de Burkitt (LB) sont définis en fonction de différences épidémiologiques, cliniques et biologiques : les LB endémiques, sporadiques, et ceux associés au déficit immunitaire. Le génome de l'EBV peut être détecté dans les trois sous-types, toutefois sa fréquence est différente. La quasi-totalité des LB endémiques (Afrique équatoriale et Papouasie-Nouvelle-Guinée) sont positifs pour l'EBV ; les LB sporadiques qui sont les plus répandus dans le monde sont de 20% à 80% positifs pour l'EBV avec des variations selon les zones géographiques, et les LB associés à l'immunodéficience sont de 20 à 40% positifs (Magrath, 2012; Pannone et al., 2014).

Les cellules tumorales de LB expriment généralement des IgM, les marqueurs lymphocytaires B (CD19, CD20 et CD22), les marqueurs de centroblastes du centre germinatif (CD10, Bcl-6) et la protéine de lymphome associé au centre germinal humain (HGAL) (Brady et al., 2007; Pannone et al., 2014).

Lors de l'infection par l'EBV, le profil d'expression des cellules de LB est associé à la latence I avec une expression marquée des ARN non codants EBER et de la protéine EBNA-1, ce qui leur aide à échapper à la surveillance immunitaire ; les EBER sont également responsables de la production accrue d'IL-10 (Brady et al., 2007). Environ 15 % des tumeurs primaires de lymphomes de Burkitt humains présente une forme particulière de latence virale dite « Wp-restreinte » présentant une délétion de leur génome dans la région codant EBNA2. Cette

délétion permet au promoteur *W* latent (*Wp*) de piloter l'expression des protéines EBNA1, EBNA3A, 3B, 3C, EBNA-LP délété et BHRF1. Ces réarrangements entraînent une infection virale lytique élevée. Par conséquent, toutes les cellules en latence *Wp*-restreinte résistent généralement à l'apoptose (Li et al., 2020).

Les études les plus récentes ont confirmé l'absence d'expression de nombreuses protéines associées à d'autres latences et permettant la transformation cellulaire (EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3C et LMP1). Hutcheson et ses collaborateurs ont émis l'hypothèse que ces cellules tumorales bénéficient de mutations survenant au hasard, ce qui permet de compenser l'expression de certains gènes viraux. Durant la transformation maligne, sous la pression de surveillance du système immunitaire, les cellules LB EBV<sup>+</sup> réduisent le nombre de gènes viraux pouvant avoir des fonctions similaires (Hutcheson et al., 2021).

Les traitements actuels ne sont pas spécifiques de l'EBV, il s'agit principalement de chimiothérapies intensives et courtes couplées à l'anticorps monoclonal CD20, ce qui dans la plupart des cas réussit à guérir les patients atteints de LB (Casulo and Friedberg, 2015).

### II-3. d) Lymphome B Diffus à grandes cellules

Le Lymphome B Diffus à Grandes Cellules (DLBCL) est le type de lymphome B le plus courant. Il existe 2 sous-types qui se différencient en fonction de leur origine cellulaire : les DLBCLs GCB (Germinal Center) et les DLBCLs ABC (Activated B-Cell). En 2016, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a discriminé dans la classification des tumeurs des tissus hématopoïétiques et lymphoïdes les DLBCLs EBV<sup>+</sup> des patients immunocompétents et âgés de plus de 50 ans (Castillo et al., 2016; Murthy et al., 2017). La médiane de survie est de deux ans, elle est moins bonne que pour les tumeurs EBV<sup>-</sup> et est encore plus mauvaise chez les patients âgés de 70 ans et au-delà (Murthy et al., 2017). Les patients âgés atteints de DLBCL EBV<sup>+</sup> réagissent faiblement au traitement et ne peuvent pas supporter de chimiothérapies agressives (Park et al., 2007).

Les cellules tumorales expriment les marqueurs B (CD19, CD20, CD22 et CD79) et ont soit de profil de latence II (Crombie and LaCasce, 2019; Motoharu Shibusawa et al., 2021), soit de profil de latence III avec expression de l'ensemble des gènes de latence (en particulier : EBERs, EBNAs et LMPs (Shibusawa et al., 2021)). Ces cellules présentent une forte régulation positive des gènes activés par la voie NF- $\kappa$ B et associés à la progression dans le cycle, la prolifération et le métabolisme cellulaire. Des observations par immunohistochimie ont montré une forte expression de pSTAT3 et p50, deux facteurs importants de cette signalisation. La voie NF- $\kappa$ B est nécessaire à la survie des cellules de DLBCL (Murthy et al., 2017).

Dans la classification récente de l'OMS, les lymphomes associés au pyothorax (PAL, Pyothorax-Associated Lymphoma) sont définis comme des DLBCL avec inflammation chronique (pathologie découverte en 1987). Ils montrent une forte association avec l'infection par l'EBV en latence III (expression des EBER, de EBNA2 et de LMP1 en particulier).

La majorité des cellules issues de patients avec des DLBCL à inflammation chronique sont EBV<sup>+</sup>. L'inflammation localisée et la forte sécrétion d'IL-10 semble contribuer à l'émergence de ces lymphomes, La baisse d'expression du HLA de classe I pouvant contribuer à l'échappement à la surveillance des lymphocytes T cytotoxiques (Aozasa, 2006; Fukayama et al., 1993; Shibusawa et al., 2021).

### II-3. e) Lymphomes NK/T

L'étude élargie de l'expression des gènes de l'EBV a permis de découvrir des lymphomes NK ou T qui y sont associés. En 1988, de l'ADN viral a été détecté pour la première fois dans les lymphocytes T circulants d'un enfant atteint d'une MI chronique (Jones et al., 1988).

Les lymphomes NK/T représentent 1,4% de l'ensemble des lymphomes. Leur diagnostic est compliqué car ils conduisent à des symptômes peu spécifiques, tels que des angio-destructures et nécroses (Amri et al., 2018). Ils présentent une résistance aux traitements chimiothérapeutiques conventionnels, et sont de mauvais pronostic, avec une possibilité d'extension extra-ganglionnaire (cutané, pulmonaire...) (Amri et al., 2018; Kanavaros and Gaulard, 2001). Le taux de mortalité est élevé : la survie moyenne est environ de 12 mois après le diagnostic (Amri et al., 2018). Les lymphomes dérivés des cellules NK sont classés avec les lymphomes T, en raison de propriétés morphologiques, immunologiques et fonctionnelles communes. Les cellules surexpriment les KIR (associés au NK), le FasL, la perforine et le granzyme (présents dans les granules cytoplasmiques des cellules cytotoxiques activées) (Couronné et al., 2015; Kanavaros and Gaulard, 2001). La grande majorité de ces cellules se caractérise par le phénotype de cellules NK : CD2<sup>+</sup>, CD5<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup>, (Forcioli et al., 2005; Kanavaros and Gaulard, 2001).

Les cellules NK n'expriment normalement pas le CD21, récepteur classique de l'EBV. Cependant, ce récepteur est détecté à la surface des cellules de lymphomes T/NK. Un mécanisme permettant d'expliquer la présence de ce récepteur est la trogocytose. Au moment du contact rapproché entre une cellule B activée et une cellule NK, il peut y avoir transfert de membrane plasmique et les cellules NK expriment le CD21 ce qui permet leur infection par l'EBV. En raison de la production de cytokines (IL-2, IL-9, IL-10, IL-15), les cellules NK EBV<sup>+</sup>



vont subir des transformations et proliférer (Couronné et al., 2015; Kanavaros and Gaulard, 2001).

Dans les cas des lymphomes T/NK, plus que dans celui des lymphomes B, la présence de cellules infectées par l'EBV est fréquente. Il s'agit en général d'une infection latente de type II (Kanavaros and Gaulard, 2001).

Les lymphomes NK/T sont caractérisés par l'expression de la protéine LMP1 et l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. Les données suggèrent que le virus infecte la cellule tumorale avant sa transformation maligne et joue un rôle actif dans le processus tumoral (Kanavaros and Gaulard, 2001). La transformation tumorale conduit à l'activation de différentes voies de signalisation : PDGFR (Platelet Derived Growth Factor Receptor), JAK/STAT3 (Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription 3), WNT/ $\beta$  cathénine, PI3/AKT (PhosphoInositide 3/protein kinase B) (Couronné et al., 2015).

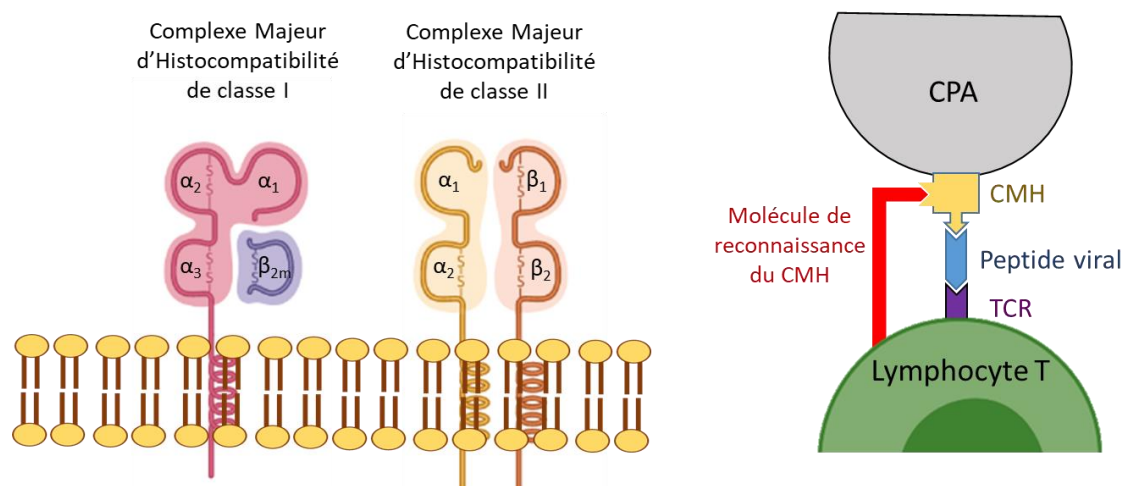
### III- Echappement à l'immunosurveillance et émergence des tumeurs : CMH et points de contrôle inhibiteurs

L'échappement à la surveillance immune peut conduire à l'émergence et au développement de tumeurs, en particulier dans les cas de cellules infectées par l'EBV. Dans cette partie nous allons nous focaliser sur certains mécanismes que peuvent mettre en place les cellules tumorales pour inhiber la réponse immune et échapper à l'immunosurveillance. : modification de l'expression du CMH et expression de points de contrôles immuns inhibiteurs.

#### III-1. Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH)

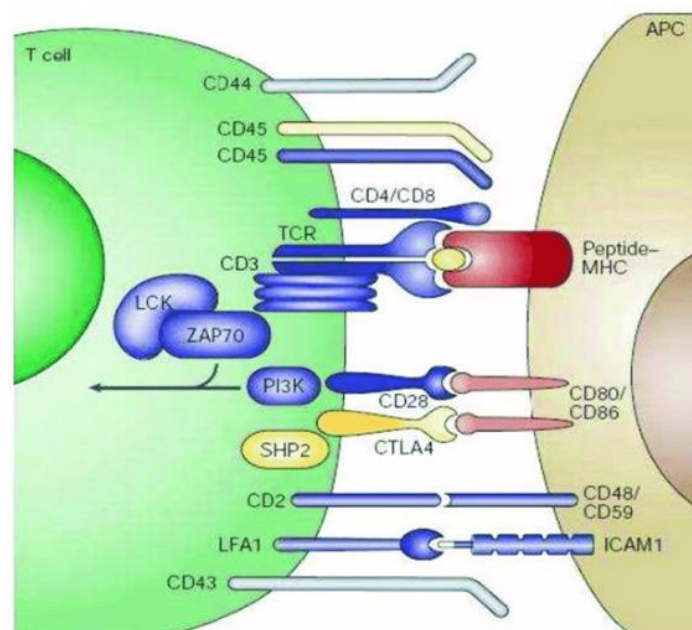
Le CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) constitue un ensemble de gènes codant pour des glycoprotéines membranaires dont la fonction principale est de présenter les peptides antigéniques aux lymphocytes CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, en vue de la réponse immune. Cela permet notamment la reconnaissance de peptides issus de protéines anormales telles que des protéines tumorales. Il existe deux types de CMH intervenant dans la présentation de l'antigène : CMH-I et CMH-II. Les molécules de classe I (CMH-I) sont composées de 2 chaînes polypeptidiques  $\alpha$  et  $\beta$  et sont exprimées à la membrane de la quasi-totalité de cellules de l'organisme. Exprimées à la surface des CPA (monocytes/macrophages, cellules dendritiques et lymphocytes B), elles permettent la présentation des peptides antigéniques aux lymphocytes CD8<sup>+</sup> *via* le TCR (T Cell Receptor) associé au complexe CD3 (complexe TCR/CD3).

Les molécules de classe II (CMH-II) sont également composées de 2 chaînes polypeptidiques  $\alpha$  et  $\beta$  mais ont une expression limitée à certaines cellules du système immunitaire dont les cellules présentatrices d'antigènes. Elles permettent la présentation des peptides antigéniques aux lymphocytes  $CD4^+$  *via* le TCR (Figure 25).



**Figure 25. Structure des molécules du CMH-I et II et présentation des peptides antigéniques aux lymphocytes.**

La synapse immunologique constitue la zone de contact entre la CPA et la cellule T (Figure 26). Elle met en jeu la reconnaissance CMH-peptide/TCR mais également un ensemble d'autres molécules d'adhésion (ICAM1/LFA1) et de co-stimulation. Ces dernières contribuent à moduler la réponse immunitaire car elles peuvent être activatrices ou inhibitrices, parfois en fonction de leur récepteur sur la cellule T (par exemple rôle activateur de CD80 ou CD86 lors de l'interaction avec CD28 et rôle inhibiteur lors de l'interaction avec CTLA-4). L'efficacité de la réponse immunitaire dépend en particulier de la présentation adéquate de l'antigène au CMH ; cette dernière initie l'activation des lymphocytes T.



**Figure 26. Ligands et molécules de signalisation impliqués dans la synapse immunologique des lymphocytes T.**

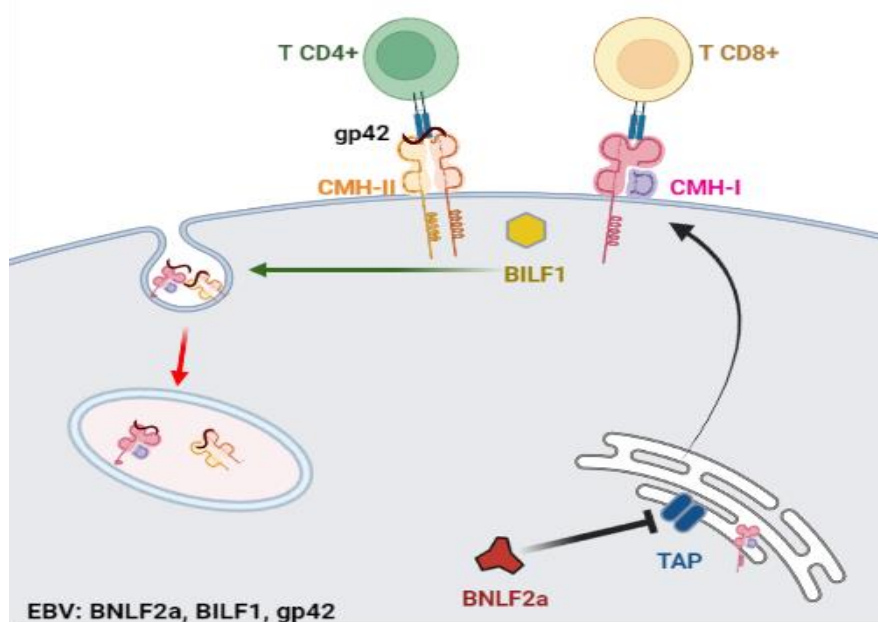
Le complexe stimulateur CMH/peptide (rouge) de la CPA se lie au TCR/CD3 du lymphocyte T. Les autres molécules activatrices (ICAM1) du lymphocyte T sont présentées en bleu et les molécules de la famille B7 ambivalentes (CD80/CD86) en rose.

Les cellules tumorales de lymphomes B sont elles-mêmes des CPA. Les molécules du CMH-I n'étant pas indispensables à la survie des cellules infectées ou tumorales, ces dernières ont tendance à en perdre l'expression ce qui les rend moins immunogènes vis-à-vis de la réponse CD8<sup>+</sup>. Il peut également y avoir une baisse de l'expression du CMH-II (perte d'expression des gènes ou translocations chromosomiques), réduisant la présentation des antigènes tumoraux responsables de l'installation de la réponse T CD4<sup>+</sup>. Le CMH-II peut par ailleurs interagir avec le récepteur LAG-3 lorsqu'il est exprimé sur les lymphocytes T (gène 3 activateur des lymphocytes), ce qui en limite la fonction. L'expression de LAG3 est de mauvais pronostic (Joshi and Ansell, 2020; Nath et al., 2021).

Une étude a montré que préférentiellement dans le cas des DLBCL, l'inactivation du gène B2M conduit à la perte de l'expression du CMH-I (Fangazio et al., 2021). Dans les cas des DLBCL associé à l'EBV, il y a de plus généralement baisse de l'expression du CMH-II et de son activateur de transcription CIITA, par comparaison avec des cellules de DLBCL EBV<sup>-</sup>. Cette perturbation du système de présentation des antigènes peut conduire à une suppression de la réponse immunitaire inhibitrice T et par la suite à un échappement à l'immunosurveillance (Jiang et al., 2020).

En revanche, dans le cas des cancers gastriques (CG) associé à l'EBV, il a été montré une régulation positive des gènes du CMH-II et de ses régulateurs transcriptionnels, CIITA et RFX5, par comparaison avec des cellules normales ou à d'autres sous-types de CG. Cette forte expression de CMH-II est attribuée à une augmentation du taux de l'IFN- $\gamma$  permettant par ailleurs l'infiltration tumorale par les lymphocytes T. La présentation antigénique induite par l'interféron reste cohérente avec la prolifération et l'activation des lymphocytes T dans le microenvironnement tumoral des CG associés à l'EBV (Ghasemi et al., 2020).

Le maintien de l'infection par l'EBV nécessite la réactivation avec production de virion (cycle lytique). Cette dernière est également régulée par les CMH. Quinn et ses collaborateurs ont démontré que lors du cycle lytique tardif de l'EBV la baisse d'expression des molécules CMH-I et CMH-II par ubiquitination *via* BDLF3, ce qui protège les cellules infectées des réponses immunes cellulaires CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. (Quinn et al., 2015). Par ailleurs, la protéine BNLF2a inhibe TAP qui est le transporteur associé à la présentation antigénique dans le réticulum endoplasmique, ce qui bloque le chargement peptidique des molécules du CMH-I. De plus, BILF1 provoque l'internalisation des CMH-I membranaires et leur dégradation par la voie lysosomale. Quant à la présentation de l'antigène aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par le CMH-II, elle est bloquée par la protéine virale gp42 ce qui conduit également par la suite à l'internalisation du CMH-II et à sa dégradation par la voie lysosomale (Münz, 2021) (Figure 27).



**Figure 27. L'EBV module la présentation antigénique au T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> *via* les molécules du CMH durant le cycle lytique**

La protéine de l'EBV BNLF2a inhibe TAP, responsable du transport antigénique dans le réticulum endoplasmique, bloquant le chargement peptidique du CMH-I. BILF1 provoque l'internalisation de CMH-I qui est dégradé dans les lysosomes. La protéine de liaison gp42 de l'EBV, bloque l'interaction du CMH-II avec les T CD4<sup>+</sup>, ce qui conduit également à son internalisation et sa dégradation par la voie lysosomale (Figure modifiée de Munz et al., 2021).

Dans le cas de la réponse innée mettant en jeu les NK, le CMH-I a une fonction différente : son expression joue un rôle inhibiteur par interaction avec les récepteur KIR, ce qui permet en particulier d'éviter la lyse des cellules normales. Lorsque les cellules tumorales de type CPA baissent l'expression du CMH-I, elles sont moins immunogènes vis-à-vis de la réponse T mais cela peut déclencher l'activité des cellules NK et leur lyse. A contrario, le maintien de l'expression du CMH-I est favorable à la réponse anti-tumorale T et non à la réponse NK.

### III-2. Points de contrôle immuns inhibiteurs

Lors de la réponse immune les cellules cibles entrent en contact avec les cellules de défense au niveau de la synapse immunologique. Au sein de cette dernière, différentes molécules permettent de moduler la réponse en l'activant ou en l'inhibant. Dans le cas des cellules tumorales, il y a fréquemment expression de molécules inhibitrices appelées points de contrôles immuns inhibiteurs dont les récepteurs se trouvent sur les cellules de défense. En limitant les réponses cytotoxiques, ils participent à l'échappement de la cellule tumorale à l'immunosurveillance, ce qui peut conduire à l'émergence de tumeurs. Notre intérêt a porté sur les points de contrôles déjà identifiés ou cibles prometteuses des immunothérapies.

#### III-2. a) Famille des protéines B7

##### III-2. a) i- PD-L1 (B7-H1)

PD-L1 (Program Death Ligand 1, B7-H1 ou CD274) a été le premier ligand à fort pouvoir inhibiteur mis en évidence parmi les molécules de la famille B7. Il a pour récepteur sur les cellules de l'immunité PD-1 (CD279), ce qui lui permet d'inhiber en particulier la réponse immune T. Dans le cas particulier des CPA qui peuvent exprimer simultanément PD-L1 et CD80, il peut interagir en cis avec CD80 ce qui limite son interaction avec PD-1 et sa fonction inhibitrice (Kisielow, 2006).

Dans un contexte inflammatoire non tumoral il y a généralement augmentation de l'expression de PD-L1 afin de protéger les cellules saines de l'effet cytotoxiques inappropriés des lymphocytes T (Frydenlund and Mahalingam, 2017). Cependant, cette molécule est surtout connue pour sa surexpression chez les cellules tumorales, que ce soit dans le cas de tumeurs solides (carcinomes hépatocellulaire, cancer de l'estomac, du rein, de l'œsophage, du pancréas, de l'ovaire ou de la vessie) ou liquides (lymphomes) (Kim and Chen, 2016).

Elle conduit à la baisse de la survie, à l'augmentation de l'apoptose et à l'inhibition de la libération de cytokines chez les lymphocytes T, entraînant leur épuisement et la mise en place d'un microenvironnement immunosuppresseur propice au développement tumoral (Jiang et al., 2015). Ces effets peuvent être bloqués par l'utilisation d'anticorps bloquants anti-PD-L1 (Frydenlund and Mahalingam, 2017). Un fort inducteur de l'expression de PD-L1 est l'IFN- $\gamma$  (Frydenlund and Mahalingam, 2017; Jiang et al., 2019), que ce soit dans un contexte inflammatoire tumoral ou non tumoral.

### III-2. a) i-1/ Formes solubles et stockage intracellulaire

Mis à part les formes exprimées à la surface cellulaire, la protéine PD-L1 peut se retrouver sous forme soluble sécrétée (seule ou associées à des vésicules). Elle peut également dans certains cas se retrouver stockée au niveau intracellulaire.

Les formes solubles de PD-L1 peuvent résulter du clivage des formes membranaires ; elles sont retrouvées en plus grande quantité dans le sérum de patients atteints de cancers que chez les individus sains. La majorité des études associe des niveaux élevés de PD-L1 soluble à un mauvais pronostic. Toutefois, lorsque les niveaux de PD-L1 solubles sont élevés de meilleurs résultats sont obtenus lors d'immunothérapies visant ce point de contrôle. La forme soluble de PD-L1 est proposée comme biomarqueur du niveau d'activation de la réponse immunitaire (Daassi et al., 2020). La molécule PD-L1 peut également être retrouvée associée aux exosomes. Il s'agit de vésicules extracellulaires sécrétées de 30 à 100  $\mu\text{m}$  de diamètre générées par voie endocytaire et produites par de nombreux types cellulaires, en particulier les cellules tumorales. De même que le PD-L1 cellulaire, le PD-L1 exosomal peut s'associer au PD-1 présent sur les lymphocytes T, réguler négativement la réponse immunitaire et promouvoir la croissance tumorale (Zhou et al., 2020).

Chez certaines cellules, PD-L1 peut être stockée au niveau intracellulaire et son expression en surface dépend de la régulation du trafic sécrétoire au niveau de la membrane plasmique. Une étude menée au laboratoire a pu montrer que chez les lymphocytes B en latence III de l'EBV est surexprimé à la surface cellulaire mais également stocké en grande quantité au niveau des lysosomes sécrétoires (voie de sécrétion non conventionnelle). Le programme de latence III dans sa globalité favorise leur migration via le réseau d'actine et leur fusion à la membrane plasmique, tandis que c-Myc (programme de transcription conduisant à la dépolymérisation de l'actine) conduit à la baisse de l'expression membranaire (Durand-Panteix et al., 2012).

### III-2. a) i-2/ PD-L1 et pathologies associées à l'EBV

Des travaux récents ont mis en évidence que les cellules des tumeurs EBV<sup>+</sup> présentent généralement une surexpression de PD-L1, suite à une régulation positive par l'oncoprotéine virale LMP1 (latences II et III).

Chez 11 à 19% des patients atteints de DLBCL EBV<sup>+</sup>, il est observé une surexpression de PD-L1, ceci constituant un haut risque d'inhibition de l'activité des lymphocytes T cytotoxiques (Jiang et al., 2020; Satou and Nakamura, 2021). Des études sur des biopsies ont également mis en évidence des niveaux élevés de PD-L1 sur les cellules de DLBCL en latence III de l'EBV *via* LMP1 combinée à EBNA2 (Anastasiadou et al., 2019b). Cependant, l'EBV n'est pas le seul facteur causal de l'augmentation de l'expression de PD-L1 car elle a pu être observée lors d'analyses du microenvironnement tumoral de patients atteints de BLBCL EBV<sup>-</sup> (Barzyk and Sheriff, 2020).

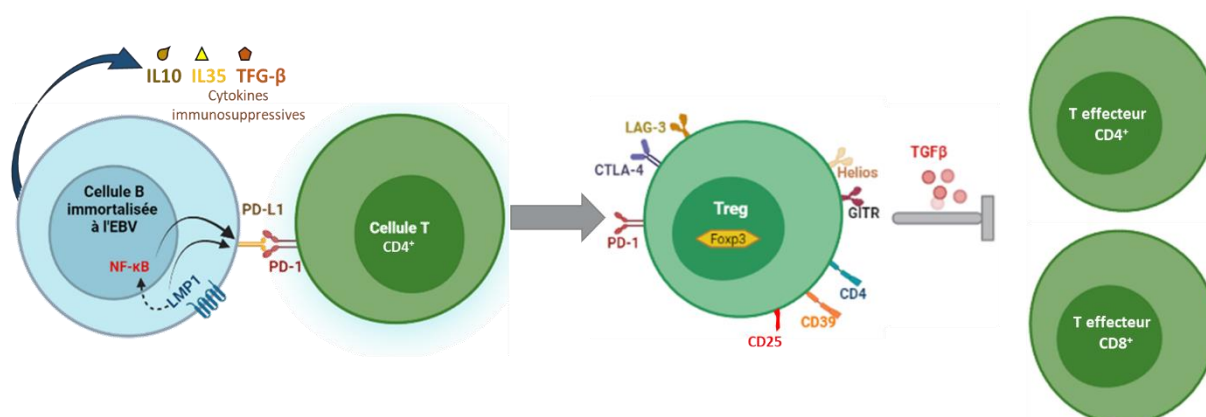
Chez les patients atteints de lymphomes T/NK, PD-L1 est régulée positivement par le sous-programme NF- $\kappa$ B activé par LMP1. Sa surexpression est corrélée à un mauvais pronostic (Bi et al., 2016b).

Le LH est considéré comme un lymphome représentatif de l'échappement à l'immunosurveillance. Une étude a montré que l'EBV peut induire l'expression de PD-L1 suite à l'expression de LMP1, *via* les voies JAK/STAT et AP-1, d'où une évation immunitaire pouvant être fortement associée à cette maladie (Satou and Nakamura, 2021).

Dans le cas des tumeurs gastriques EBV<sup>+</sup>, la surexpression de LMP1 est observée chez 34 à 92% des patients selon les études. L'expression de PD-L1 et son rôle pronostic est souvent contradictoire : dans certains cas elle est associée à un bon pronostic, toutefois sa faible expression est caractéristique de tumeurs EBV<sup>-</sup> (de Fátima Aquino Moreira-Nunes et al., 2021).

Une étude menée au laboratoire a permis de mettre en évidence les mécanismes mis en jeu dans l'inhibition de la réponse T anti-tumorale par les lymphocytes B en latence III de l'EBV *via* la surexpression membranaire de PD-L1. Son interaction avec PD-1, dans un modèle B/T autologue conduit à l'expansion de lymphocytes CD4<sup>+</sup> régulateurs anergiques, conventionnels (CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>) ou non (CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup>) permettant d'inhiber les CD4 et CD8 effecteurs par sécrétion de TGF $\beta$ . Il a été mis en évidence que ces cellules, en surexprimant PD-L1 et en sécrétant des cytokines immunosuppressives, miment les cellules B régulatrices

(Bregs) qui jouent un rôle essentiel dans l'immunosuppression de la réponse immunitaire T (Auclair et al., 2019; Jiang et al., 2019) (Figure 28).



**Figure 28. L'échappement à l'immunosurveillance des cellules B en latence III de l'EBV via l'axe PD-1/PD-L1**

Les cellules B en latence III de l'EBV sécrètent des cytokines immunosuppressives (IL-10, IL-35, TGFβ) et surexpriment PD-L1, qui par sa liaison à PD-1 à la surface des lymphocytes T CD4+, entraîne l'expansion des Tregs. Les Tregs, par la sécrétion de TGF-β, inhibent les lymphocytes T effecteurs CD4+ et CD8+ (Réalisée par Jennifer SALIBA).

### III-2. a) i-3/ Immunothérapie visant l'axe PD-L1/PD-1

Les immunothérapies anti-PD-L1 et anti-PD-1 ont montré des résultats prometteurs pour différents types de tumeurs solides (mélanome, poumon, rein...) ou liquide (lymphome de Hodgkin) en termes de survie et de réponse durable. Les traitements sont plus efficaces chez les patients ayant une immunité anticancéreuse préexistante (forte densité des infiltrats de T CD8+, forte sécrétion de chimiokines, expression de PD-1 à la surface des cellules immunitaires et sécrétion élevée d'IFN-γ) (Kim and Chen, 2016).

Les médicaments actuellement approuvés par la FDA sont pour l'immunothérapie anti-PD-1, le Nivolumab (Opdivo, Bristol-Meyers Squibb) et le Pembrolizumab (Keytruda, Merck) et pour l'immunothérapie anti-PD-L1 l'Atezolizumab (Tecentriq), l'Avelumab (Bavencio) et le Durvalumab (Imfinzi). Il s'agit d'anticorps IgG humanisés bloquant les interactions entre PD-L1 et PD-1 (Frydenlund and Mahalingam, 2017). De nouvelles stratégies thérapeutiques sont proposées en combinant le blocage de PD-L1 et l'inhibition de la biogenèse des exosomes, en considérant que le PD-L1 exosomal peut être un biomarqueur potentiel en plus du PD-L1 cellulaire et du PD-L1 soluble (Zhou et al., 2020).



Malgré l'efficacité de ces traitements, il y a des effets secondaires indésirables comme la fatigue (16% à 37% des cas), une éruption cutanée suivie de diarrhée et de colite (1% à 5% des cas), ce qui peut limiter le traitement. Des effets plus graves peuvent également survenir comme des troubles auto-immuns systémiques (Frydenlund and Mahalingam, 2017).

### III-2. a) ii- PD-L2 (B7-DC)

De même que PD-L1, PD-L2 (Program Death Ligand 2, B7-DC ou CD273) est un ligand inhibiteur de PD-1. Ce point de contrôle a longtemps été négligé, malgré sa forte interaction avec PD-1 (deux à six fois supérieure à celle de PD-L1).

PD-L2 est moins présent que PD-L1 chez les cellules tumorales mais peut s'exprimer en son absence ; il existe des cellules T spécifiques de PD-L2. Les cellules PD-L2<sup>+</sup> inhibent la sécrétion d'IL-2 (la restauration de l'expression a lieu après blocage de l'axe PD-L2/PD-1) et exercent des fonctions suppressives importantes envers les lymphocytes CD4<sup>+</sup> forts producteurs d'IL-2 (Solinas et al., 2020). La suppression de la réponse immune causée par PD-L2 semble être aussi importante que celle induite par PD-L1 car les traitements bloquants montrent des activités cliniques similaires. Le rôle de PD-L2 dans la suppression de l'immunité anticancéreuse chez l'homme reste toutefois mal compris (Kim and Chen, 2016).

Des études ont montré qu'il existait des variants structurels de PD-L2 exclusivement chez les cellules de lymphomes B, alors que des variants de PD-L1 ont pu être détectés dans une grande variété de cancers solides, de lymphomes à cellules NK/T et de lymphomes B (Satou and Nakamura, 2021).

PD-L2 est surexprimé à la surface des cellules de LH, modèle d'évasion des réponses immunes (Satou and Nakamura, 2021). Il peut être surexprimé par les cellules de DLBCL EBV<sup>+</sup>, bien que certains auteurs aient observé des expressions similaires avec les DLBCL EBV<sup>-</sup> ; la régulation positive de ce point de contrôle semble plutôt être due à des altérations génétiques concomitantes à l'infection par l'EBV (Biggi and Elgui de Oliveira, 2022).

PD-L2 est actuellement considéré comme une cible potentielle en immunothérapie et les recherches sur l'utilisation d'anticorps anti-PD-L2 s'accumulent progressivement (Solinas et al., 2020).

### III-2. a) iii- CD80 (B7-1)

La protéine B7-1, également connue sous le nom CD80, est une molécule dont le rôle est complexe. Elle peut conduire à la stimulation ou à l'inhibition selon le récepteur avec lequel elle interagit. En conditions physiologiques, lorsqu'elle est exprimée sur les CPAs activées, elle peut stimuler les lymphocytes T en se liant à CD28 puis, la perte d'expression de ce dernier et la mise en place de celle de CTLA-4 (CD152), conduit à l'inhibition de la réponse, permettant de la réguler (Dembic, 2015). Lorsque les deux récepteurs sont exprimés simultanément CD80 a une plus grande affinité pour CTLA-4 que pour CD28.

En ce qui concerne les lymphomes B, l'expression de CD80 est retrouvée chez environ 97% des lymphomes folliculaires, 90% des DLBCL et 75% des lymphomes à cellules du manteau (MCL) (Charette and Houot, 2018). Son expression est par ailleurs associée à la transformation par l'EBV (G. B. Park et al., 2011).

Outre les fonctions activatrices ou inhibitrices de CD80 lors de son interaction avec les récepteurs CD28 ou CTLA-4, cette molécule peut signaler chez la cellule qui l'exprime mais il s'agit en général de signaux inhibiteurs. La signalisation de CD80 chez les cellules de lymphome B peut limiter leur prolifération en régulant positivement des molécules pro-apoptotiques et négativement des molécules anti-apoptotiques (Mir and Agrewala, 2008; G. B. Park et al., 2011). Par ailleurs, l'expression induite lors de la transformation par l'EBV peut conduire à une inhibition de croissance, l'apoptose et la baisse d'expression de la molécule d'adhésion CD54 (ICAM-1) (G. B. Park et al., 2011), de même qu'à l'expression des molécules pro-apoptotiques Fas et FaL (Park et al., 2013).

Il est important de souligner que lorsque CD80 est co-exprimé avec PD-L1 (membranaire ou soluble) la réponse est en faveur du maintien de l'activité cytotoxique des lymphocytes T. Comme observé dans plusieurs types de cancers, la liaison de CD80 avec PD-L1 empêche les interactions PD-L1/PD-1 de s'établir (et ce de manière encore plus efficace que les anticorps bloquants anti-PD-L1 et anti-PD-1). La co-expression de CD80 et de PD-L1 peut ainsi contrecarrer l'inhibition médiée par l'axe PD-L1/PD-1 (Haile et al., 2013).

Les immunothérapies anti-CTLA-4 ont été annoncées pour la première fois en 2011 lorsque l'ipilimumab a été utilisé comme drogue ciblant ce récepteur inhibiteur dans les traitements de mélanome. Les études ont montré que l'anticorps anti-CTLA-4 a amélioré la capacité du système immunitaire à tuer les cellules tumorales. En effet, l'ipilimumab peut interagir avec le CTLA-4 fortement surexprimé par les Trégs. Cette interaction baisse le nombre des Trégs par cytotoxicité cellulaire médiée par les NK et les macrophages (Pol and Kroemer, 2018; Sobhani et al., 2021).

Plusieurs autres études ont révélé de meilleurs résultats de survie lorsque l'anticorps bloquant anti-CTLA-4 a été combiné à l'anticorps anti-PD-1 ou anti/PD-L1 dans le cas de mélanome ou de cancer pulmonaire non à petites cellules, notamment chez des patients ayant une immunité antitumorale préexistante (Chae et al., 2018; Rotte, 2019; Seidel et al., 2018). Wei et al. ont déterminé qu'une immunothérapie combinée (anti-CTLA-4 et anti-PD-1) a induit des réponses cellulaires cumulées des deux monothérapies. Mais elle induit également des réponses cellulaires différentes de celles induites par les monothérapies. En effet, elle provoque le passage de l'expansion des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> à l'expansion des lymphocytes T CD8 effecteurs activés (Wei et al., 2019).

### III-2. a) iv- CD86 (B7-2)

B7-2 (CD86) est une molécule bien connue de la famille B7. De même que CD80, elle a un rôle activateur si elle interagit avec CD28 et inhibiteur si elle interagit avec CTLA-4 (Dembic, 2015).

Les cellules B l'expriment faiblement (G. B. Park et al., 2011). Chez les cellules tumorales, son expression peut également être faible. Ceci est généralement le cas lors de l'infection par les herpès virus, en raison de l'endocytose rapide et de la dégradation lysosomale des glycoprotéines de surface mettant en jeu la protéine k5 (Hu and Usherwood, 2014). Dans le cas des DLBCL, sa baisse d'expression semble associée à une baisse des infiltrats de lymphocytes T (Charette and Houot, 2018).

La transformation des cellules B par l'EBV induit par contre généralement l'expression de CD86. De même que CD80, sa signalisation conduit à la baisse d'expression de la molécule d'adhésion CD54 (G. B. Park et al., 2011) et à l'expression des molécules pro-apoptiques Fas et FasL (Park et al., 2013).

### III-2. a) v- B7-H3

L'ARNm de B7-H3 est détecté dans divers tissus normaux mais son expression protéique est faible, possiblement en raison d'un certains mécanismes de contrôle post-transcriptionnels (Feng et al., 2021). Au contraire, elle est retrouvée comme étant surexprimée dans un grand nombre tissus tumoraux (sein, poumon, os, prostate, œsophage, estomac, pancréas, colon, ovaire, col de l'utérus) et corrélée à un mauvais pronostic (Flem-Karlsen et al., 2020, p.; Khan et al., 2021). Son récepteur putatif est TLT-2, mais il n'existe pas suffisamment de preuves scientifiques à ce sujet ; il pourrait être présent sur les cellules T et

NK car B7-H3 permet d'inhiber les fonctions immunes de ces deux types cellulaires (Khan et al., 2021; Yang et al., 2020).

B7-H3 contribue à la mise en place d'un microenvironnement immunosuppresseur par production d'IL-10 et de TGF- $\beta$ 1, ce qui est favorable à la progression tumorale (Feng et al., 2021). Dans le cas du cancer du sein, elle contribue à la sécrétion d'IL-10 (Yang et al., 2020). La capacité inhibitrice de B7-H3 envers les cellules T a été découverte récemment. Sa surexpression conduit à l'inhibition de la prolifération des cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, suite à baisse de production d'IL-2, d'IL-13 et d'IFN- $\gamma$  et à l'inactivation des voies NF- $\kappa$ B et des MAP kinases (Yang et al., 2020; Zhou and Jin, 2021). Conformément à son rôle suppresseur de l'immunosurveillance, l'expression de B7-H3 par les cellules tumorales est négativement corrélée à l'infiltration des lymphocytes T au sein de la tumeur (Feng et al., 2021). Par ailleurs, B7-H3 inhibe l'activité des cellules NK en diminuant la libération d'IFN- $\gamma$  et de granzyme B, ce qui affaiblit également la réponse anti-tumorale (Feng et al., 2021; Zhou and Jin, 2021).

La protéine B7-H3 peut être présente à la surface des cellules tumorales, dans des vésicules intra et extracellulaires, ou sous forme soluble (Khan et al., 2021). La forme soluble suffit à inhiber la prolifération des lymphocytes T et à baisser les productions d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  dans les surnageants. De même que la forme membranaire, elle contribue à favoriser l'invasion et la migration des cellules tumorales et est associée aux statuts tumoraux avancés (Khan et al., 2021). La forme sécrétée baisse lorsque la forme de surface est élevée, indiquant que la production de B7-H3 soluble est médiée par les métalloprotéases.

B7-H3 semble avoir un potentiel important dans les traitements par immunothérapie compte-tenu de son effet sur les immunités innée et adaptative et son rôle dans l'agressivité des tumeurs, d'autant plus que sa surexpression est limitée aux tissus normaux. Une exploration plus approfondie de ce point de contrôle semble prometteuse (Khan et al., 2021; Yang et al., 2020).

### III-2. a) vi- B7-H4

L'expression de B7-H4 est très limitée dans les tissus normaux mais cette protéine peut être surexprimée dans les tissus tumoraux et est associée à la progression tumorale et à un mauvais pronostic.

Contrairement à PD-L1, B7-H4 n'est pas régulé par l'IFN $\gamma$ . Les cytokines IL-6, IL-10 ou TGF $\beta$  favorisent son expression. Son récepteur n'est pas encore bien défini, certains auteurs ont proposé une interaction inhibitrice possible au complexe Sémaphorine 3a/Plexine A4/Neuropiline-1 (Li et al., 2018; Podojil et al., 2018).

B7-H4 est un point de contrôle co-inhibiteur de la prolifération des cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. Il est capable d'inhiber la prolifération et l'activation des cellules T *in vitro* et d'altérer la production de cytokine inflammatoires. *In vivo*, la délétion du gène B7-H4 conduit à l'augmentation de l'infiltration des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dans les tumeurs et à la baisse d'expression des marqueurs d'épuisement (Li et al., 2018).

Altan et ses collaborateurs ont montré que B7-H4 est fortement exprimé par les cellules de cancer du sein, indépendamment des différents sous-types. De plus, ils ont mis en évidence un type de tumeur particulier avec surexpression de B7-H4 et sans expression de PD-L1 ; l'échappement à l'immunosurveillance est maintenu par B7-H4, avec une baisse des taux de lymphocytes T infiltrants et une altération de la réponse immunitaire (Altan et al., 2018).

Il existe des formes solubles de B7-H4, retrouvées dans plusieurs types de cancer (poumon, gastrique, ovarien, vessie, os...). Des études sur modèles animaux ont montré leur efficacité dans l'inhibition de la prolifération des cellules T. Par ailleurs, chez les patients atteints de cancers, une forte production sérique de B7-H4 est associée à l'invasion et à la progression de la tumeur et à un mauvais pronostic (Khan et al., 2021).

Un anticorps anti-B7-H4 (CH17) a récemment été généré en vue de réaliser des traitements par immunothérapie. Il restaure la prolifération des cellules T CD8<sup>+</sup> ainsi que la production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$ . Son efficacité a été étudiée en combinaison avec un anticorps anti-PD-1 sur modèle animal, montrant un effet thérapeutique prometteur. Il se caractérise par une double fonction : le blocage du point de contrôle et l'augmentation de la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (Miao and Sun, 2021).

### III-2. b) Famille des Nectines : Nectin-2 (CD112) et Necl5 (CD155)

La Nectin-2 (connue sous le nom de CD112) et la Necl5 (connue sous le nom de CD155) appartiennent à la famille des glycoprotéines de type nectines, qui sont des molécules d'adhésion appartenant à la grande famille des Ig.

La protéine CD112 est exprimée par les cellules immunitaires et par les cellules tumorales (Zeng et al., 2021). Elle joue un rôle immunorégulateur des cellules T et NK. CD112 peut interagir avec ses trois récepteurs, CD226, TIGIT ou CD112R, exprimés sur les cellules T et NK. Sa liaison à CD226 est activatrice, tandis que celle à TIGIT ou CD112R est inhibitrice. CD112 a toutefois une affinité beaucoup plus grande pour CD112R, et cette voie est très étudiée à l'heure actuelle, en vue du développement de nouvelles immunothérapies anti-tumorales (Jin and Park, 2021; Zeng et al., 2021). TIGIT est exprimé par les cellules T CD4<sup>+</sup>

et CD8<sup>+</sup>, les Tregs et les NK. Son activation chez les Tregs contribue à la suppression de la réponse T par production d'IL-10.

La protéine CD155 n'est généralement pas exprimée dans les tissus normaux mais régulée positivement chez des cellules tumorales. Elle peut interagir avec ses trois récepteurs, CD226, CD96 ou TIGIT, exprimés sur les cellules T et NK. Sa liaison à CD226 est activatrice, celle à CD96 dépend du contexte et celle à TIGIT est inhibitrice. CD155 a une affinité beaucoup plus grande pour TIGIT (Jin and Park, 2021). Elle est impliquée dans l'évasion immunitaire des cellules tumorales, favorise la migration, l'invasion tumorale et l'échappement à l'immunosurveillance. L'expression de CD155 est de mauvais pronostic (Oyama et al., 2022). Des immunothérapies anti-TIGIT sont en développement.

### III-2. c) Famille des CEA (CarcinoEmbryonic Antigen) : CEACAM1

CEACAM1 (CEA-related Cell Adhesion Molecule 1) est une protéine transmembranaire contenant plusieurs domaines extracellulaires essentiels à sa fonction, notamment l'interaction avec son récepteur TIM-3 sur les cellules de l'immunité. Elle est régulée positivement par IFN- $\gamma$  et IL-27 (Kim et al., 2019; Markel et al., 2004).

TIM-3 est une molécule de la classe des Ig actuellement bien identifiée pour son implication dans la tolérance et l'épuisement des lymphocytes T. Sa fonction inhibitrice peut être induite par son interaction avec CEACAM1 lorsqu'il est présent à la surface de cellules tumorales. Ce dernier est un co-récepteur inhibiteur indépendant de la liaison au CMH-I ce qui lui permet de contribuer également à l'évasion à la réponse NK.

La surexpression de CEACAM1 a été mise en évidence chez de nombreux types de cellules tumorales et corrélée à la progression tumorale et à la présence de métastases. L'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-CEACAM1 est actuellement proposée afin de limiter le développement des cellules tumorales par réactivation de la réponse immunitaire (Fangazio et al., 2021).

### III-2. d) Famille des TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) : HVEM

HVEM joue un rôle dans l'infection virale d'une part, et en tant que point de contrôle immun inhibiteur d'autre part. L'EBV peut mettre en jeu des protéines complémentaires de celles classiquement décrites pour son entrée dans les cellules. L'interaction avec le récepteur HVEM (Herpes Virus Entry Mediator) contribue à la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire. Il peut toutefois être présent sur des cellules ne

constituant pas des cibles productives de l'infection virale *in vivo*, telles que les cellules immunitaires T, Tregs, NK ou cellules dendritiques (Demerlé et al., 2021).

Son expression joue un rôle important dans la survie du virus en modulant la réponse des lymphocytes T de l'hôte (Eisenberg et al., 2012).

Ce point de contrôle est par ailleurs retrouvé comme étant surexprimé à la surface des cellules tumorales, comme dans le cas de nombreux cancers solides (mélanome, glioblastome, cancer colorectal...). Pour les cellules des mélanomes, il est même plus fortement exprimé que PD-L1 (Malissen et al., 2019). Certains auteurs ont montré que l'oncoprotéine LMP1 peut induire sa surexpression (Cahir-McFarland et al., 2004). Les récepteurs de HVEM, BTLA (B and T Lymphocyte Attenuator) ont des fonctions similaires aux récepteurs CTLA-4 et PD-1, en particulier chez les lymphocytes T. BTLA a des effets inhibiteurs sur la prolifération et l'activation des lymphocytes B et T, ainsi que la production d'IL-2 (Watanabe et al., 2003). De faibles niveaux d'expression de BTLA et de PD-1 sont suffisants pour inhiber la réponse T CD8<sup>+</sup> (Malissen et al., 2019). Ce point de contrôle interagit également avec les protéines LIGHT des cellules de défense, ce qui active des voies de signalisation assurant la survie des cellules tumorales (PI3K/AKT, NF-κB). Cependant, cette interaction peut aussi stimuler la production de cytokines et le développement des lymphocytes T mémoires (Desai et al., 2017), ce qui fait de HVEM un ligand relativement complexe. HVEM se lie également au CD160 sur les lymphocytes T, ce qui conduit à abaisser l'activité des T CD4<sup>+</sup> mais aussi à améliorer celle des T CD8<sup>+</sup>. L'interaction HVEM/CD160 contrôle de plus la production de l'IFN $\gamma$  par les cellules NK (W. Liu et al., 2021).

### III-2. e) Famille des lectines : galectines -3 et -9

Les galectines appartiennent à la grande famille de lectines. Les interactions galectines/ligands régulent un très grand nombre de fonctions biologiques spécifiques à certains types cellulaires ou tissus. Les cellules du système immunitaire sont très sensibles à l'action de ces petites protéines essentielles. Certaines d'entre elles constituent d'excellents régulateurs négatifs de la réponse immune en mettant en place un microenvironnement favorable à l'échappement tumoral. Deux d'entre elles sont particulièrement étudiées pour leurs fonctions immuno-inhibitrices : la galectine-3 et la galectine-9.

### III-2. e) i- Galectine-3

De même que les autres galectines, la galectine-3 s'associe aux glucides de type  $\beta$ -galactosides et est depuis récemment considérée comme un acteur important du microenvironnement tumoral avec de nombreux rôles (apoptose, métastase, inflammation, trafic moléculaire et immunosurveillance). Elle peut être retrouvée à la surface des cellules, dans leur cytoplasme et dans leur noyau. Elle a de plus été détectée dans les exosomes des cellules dendritiques, des cellules tumorales du cancer de la vessie et des cellules leucémiques, bien que le mécanisme de chargement par les exosomes n'est pas encore bien défini. (Ruvolo, 2016).

La forme protéique de la galectine-3 n'est pas retrouvée dans les tissus lymphoïdes et les lymphocytes naïf. En revanche, certains stimuli comme l'IL-2 peuvent induire sa production intracellulaire chez les lymphocytes, sans qu'elle ne soit sécrétée dans l'espace extracellulaire (Farhad et al., 2018).

Son récepteur inhibiteur sur les lymphocytes T activés est le gène 3 d'activation des lymphocytes (LAG-3). Elle peut également constituer un ligand inhibiteur soluble du récepteur de surface NKp30, des cellules NK (Guo et al., 2020; Ruvolo, 2016). La galectine-3 peut ainsi inhiber les réponses anti-tumorales T et NK.

La galectine-3 a été retrouvée surexprimée dans plusieurs types de tumeurs solides (cancer de sein, de la thyroïde ou de la prostate) et liquides (lymphomes, leucémie lymphoblastique chronique - LLC). Sa localisation dans l'espace intracellulaire semble associé à la prolifération des cellules tumorales, comme dans le cas du cancer de prostate et des LLC (Ruvolo, 2016). Sa surexpression intracellulaire chez des lymphocytes T Jurkat inhibe l'apoptose induite par l'anticorps anti-Fas (Farhad et al., 2018; Guo et al., 2020). De plus, la forme intracellulaire de la galectine-3 peut se lier à Bcl-2 par des interactions protéine-protéine et inhiber l'apoptose. (Farhad et al., 2018; Guo et al., 2020; Ruvolo, 2016). Durant la transition des cellules normales en cellules tumorales, l'expression de la galectine-3 baisse dans le noyau et augmente dans le cytoplasme (Guo et al., 2020). Sa forme extracellulaire semble quant à elle impliquée dans l'induction de l'apoptose des thymocytes et lymphocytes T par interaction avec le CD45 et le CD71.

La galectine-3 inhibe la réponse anti-tumorale. Des co-cultures de cellules tumorales avec des lymphocytes T autologues conduisent à l'expansion d'un nombre élevé de cellules T réactives à la tumeur lors de l'inhibition de la galectine-3. Par ailleurs, elle modifie la polarisation des macrophages d'un profil M1 (macrophage anti-tumoral) à un profil M2 (macrophage pro-tumoral) et induit l'apoptose des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Farhad et al., 2018). De plus, elle inhibe



la réponse immunitaire des cellules NK par interaction avec leur récepteurs LAG-3 (Ruvolo, 2016).

Le rôle immunosuppresseur de la galectine-3 a conduit à développer des molécules chimiques inhibitrices. La molécule GCS-100 restaure l'activité des lymphocytes T *in vitro* et induit la production d'IFN- $\gamma$ . *In vivo*, le GCS-100 a permis de restaurer l'immunosurveillance des T envers des cellules tumorales du mastocytome murin (Farhad et al., 2018; Ruvolo, 2016). Un autre inhibiteur de la galectine-3, le GR-MD-02, a été testé dans un cadre préclinique chez des patients atteints de mélanomes métastatiques, en combinaison avec des immunothérapies anti-CTLA-4 ou anti-PD-1. Il a conduit à l'expansion de cellules T spécifiques de la tumeur (Farhad et al., 2018). Des immunothérapies combinées avec des anticorps dirigés vers le récepteur LAG-3 ont montré des améliorations par comparaison avec les monothérapies. Cependant, les anticorps anti LAG-3 employés seuls ne sont pas aussi efficaces que les traitements par anti-PD-1 ou anti-PD-L1 (Kim and Chen, 2016).

### III-2. e) ii- Galectine-9

De même que la galectine-3, la galectine-9 s'associe aux glucides de type  $\beta$ -galactosides. Elle est généralement exprimée au niveau cytoplasmique puis sécrétée.

La galectine-9 a des propriétés inhibitrices vis-à-vis de l'immunité adaptative et innée par interaction avec le récepteur TIM-3. Sa liaison au récepteur TIM-3 exprimé sur les lymphocytes T activés entraîne leur apoptose. Les IFN- $\beta$  et  $\gamma$  favorisent, ensemble ou indépendamment, son expression et sa sécrétion (Ungerer et al., 2014; R. Yang et al., 2021). A son tour la galectine-9 sécrétée favorise les réponses T auxiliaires 1 (Th1) libérant de l'IFN- $\gamma$ . Toutefois, par auto-limitation de la réponse immune, les Th1 matures exprimant TIM-3 entrent en apoptose (Klibi et al., 2009). Kim et al. ont aussi montré que la galectine-9 induit la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Tregs, ce qui atténue les réponses immunitaires lymphocytaires (Kim et al., 2015).

La galectine-9 augmente l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-1 $\beta$  et IL-6. Ceci est médié par la dégradation accélérée de la protéine STING, protéine transmembranaire responsable de l'activation de la production d'interférons intervenant dans les réponses immunitaires, ainsi une immunosuppression est induite par la galectine-9 en supprimant la signalisation STING (Zhang et al., 2020).

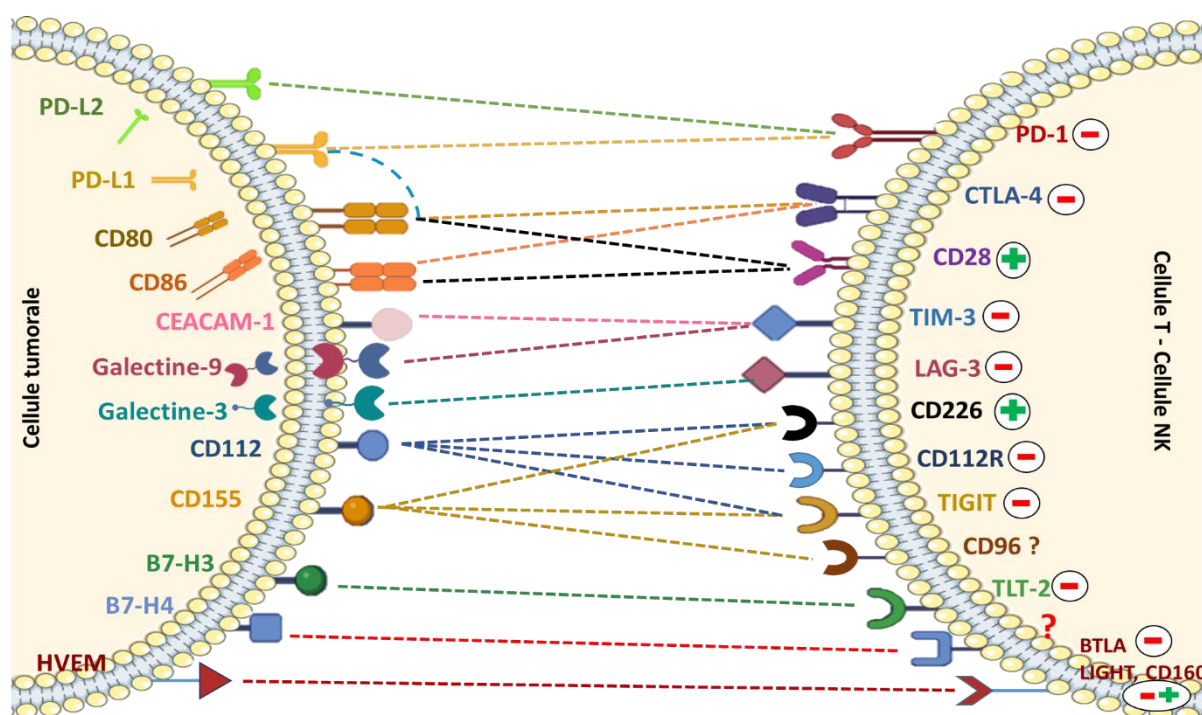
La surexpression de la galectine-9 est associée à un mauvais pronostic dans divers types de cancers humains (R. Yang et al., 2021). Des concentrations élevées de galectine-9 dans les tumeurs ou le plasma de patients atteints de carcinome nasopharyngé (CNP) sont corrélées

## Partie 2. Surveillance immunitaire de l'infection par l'EBV et échappement tumoral

à une baisse de la survie (Zhang et al., 2020). Klibi et ses collaborateurs ont montré que les cellules tumorales de CNP associés à l'EBV produisent des exosomes Galectine-9<sup>+</sup>. Ces derniers peuvent induire l'apoptose de cellules CD4<sup>+</sup> spécifiques à l'EBV. L'utilisation d'anticorps bloquants anti-TIM-3 ou anti-galectine-9 supprime cet effet apoptotique (Klibi et al., 2009).

La co-expressions de plusieurs récepteurs immunosuppresseurs sur les cellules T et NK oriente vers des immunothérapies combinées : anti-PD-L1/PD-1 et/ou anti-TIM-3. Dans des modèles précliniques, anti-TIM-3 employé seul n'a pas permis d'obtenir des effets suffisants tandis qu'une combinaison avec anti-PD-1/anti-PD-L1 a permis d'améliorer les réponses antitumorales (Kim and Chen, 2016).

Les différents points de contrôle décrits ci-dessus sont actuellement proposés comme des molécules avec des fonctions inhibitrices importantes vis-à-vis des réponses immunitaires médiées par les lymphocytes T et NK. Leurs effets immunosuppresseurs en font des cibles, déjà identifiées ou prometteuses, pour leur utilisation en immunothérapie. Les différents points de contrôle inhibiteurs cités et leurs récepteurs sur les cellules T ou NK sont schématisés dans la figure 29.



**Figure 29. Principaux points de contrôle inhibiteurs des cellules tumorales impliqués dans l'échappement à l'immunosurveillance et leurs récepteurs sur les lymphocytes T ou les cellules NK.**  
(Réalisée par Jennifer SALIBA)

### III-3. Cytokines immunosuppressives et infection par l'EBV

Certaines cytokines immunosuppressives sont sécrétées par les cellules tumorales et contribuent à mettre en place un microenvironnement favorable à l'émergence et au développement de tumeurs. Cette partie se focalise sur les cytokines que nous avons mises en évidence comme étant sécrétées par les lymphocytes B en latence III de l'EBV : IL-10 et TGF $\beta$  (fréquemment associées aux microenvironnements immunosuppresseurs), ainsi que l'IL-35 (moins fréquemment retrouvé).

#### III-3. a) Interleukine-10

L'IL-10 est une protéine particulière dans le cas de l'EBV car il existe également une forme virale, v-IL10, produite durant le cycle lytique. Cette dernière régule négativement la protéine de transport TAP1 (Transport Antigen Protein 1), associée à la présentation antigénique ; il y a une diminution d'expression des molécules du CMH-I à la surface des lymphocytes B, ce qui affecte par la suite la reconnaissance des cellules B infectées par les T cytotoxiques (Zeidler et al., 1997). La vIL-10 protège les lymphocytes B immortalisés de l'élimination par les cellules NK : elle empêche la sécrétion de cytokines antivirales et supprime ainsi les fonctions des T effecteurs CD4<sup>+</sup> spécifiques de l'EBV. La reconnaissance immunitaire, et donc l'élimination des cellules nouvellement infectées par l'EBV, est ainsi baissée (Jochum et al., 2012). La vIL10 exprimée pendant la phase lytique induit l'expression de l'IL-10 cellulaire pendant la phase de latence.

Bejarano et Masucci ont montré que l'IL-10 régule négativement les fonctions inhibitrices des lymphocytes T par baisse de la production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$ , ce qui favorise la prolifération des lymphocytes B infectés par l'EBV (Bejarano and Masucci, 1998). Durant la phase de latence de l'EBV, l'IL-10 est surexprimée par les cellules infectées, inhibant ainsi la réponse immunitaire cellulaire et favorisant la croissance des cellules infectées, ce qui, dans les cas d'immunodéficience en particulier, induit l'émergence de lymphomes (Dueñas et al., 2017). La production d'IL-10 par les lymphocytes B en latence III de l'EBV dans leur microenvironnement contribue à la surexpression de PD-L1 à leur surface, ce qui conduit à l'expansion des Tregs et à l'inhibition des fonctions des T effecteurs (Auclair et al., 2019) (Frydenlund and Mahalingam, 2017).

Chez des patients atteints de CNP associés à l'EBV, le nombre de cellules IL-10<sup>+</sup> est supérieur à celui de patients CNP EBV-séronégatif, suggérant le rôle important que joue IL-10 dans le développement de la maladie (Budiani et al., 2002). Certaines études ont cependant montré

que l'IL-10 peut avoir des effets sur la pathogénicité aiguë sans affecter la réactivation du virus ou sa phase de latence (Lindquister et al., 2014).

### III-3. b) TGF $\beta$

Le facteur de croissance tumoral  $\beta$  (TGF $\beta$ ) est une cytokine immunosuppressive qui affecte la différenciation et l'homéostasie cellulaire ainsi que le développement et l'induction de la tolérance des cellules immunitaires. Il y a trois isoformes de TGF $\beta$  : TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 et TGF $\beta$ 3. Cette cytokine est impliquée dans le développement des cancers, car elle favorise l'échappement des cellules tumorales à l'immunosurveillance (Sheng et al., 2015). Aux premiers stades du développement des cancers, la signalisation TGF $\beta$  fonctionne comme suppresseur de tumeur : elle inhibe la progression des cellules de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire et induit leur apoptose. En revanche, au stade avancé du cancer, TGF $\beta$  agit comme promoteur de tumeur en induisant la transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT), l'invasion, les métastases, et la suppression des réponses immunitaires (Velapasamy et al., 2018). Cette cytokine semble plus particulièrement associée au développement des tumeurs plutôt qu'à leur émergence.

Dans le microenvironnement tumoral, les cellules cancéreuses recrutent les lymphocytes Tregs et favorisent leur expansion par la production de cytokines immunosuppressives telles que le TGF $\beta$ . Ce dernier, associé à la baisse de ligands inhibiteurs des cellules tumorales, conduit à suppression de la réponse immunitaire antitumorale chez la plupart des patients atteints de lymphomes (Joshi and Ansell, 2020). Dans le cas de tumeurs avec inflammation, le TGF $\beta$  inhibe les fonctions cytotoxiques des cellules T et NK, dont la production de la perforine et des granzymes (Kim and Chen, 2016).

Dans le cas de l'infection par l'EBV, l'activation du gène BZLF1, avec la coopération des protéines Smad et cJun/c-Fos et de TGF $\beta$  réactive le passage des cellules de la phase de latence au cycle lytique, ce qui contribue au maintien de l'infection latente (Iempridee et al., 2011; Liang et al., 2002; Velapasamy et al., 2018). Par ailleurs, l'expression de TGF $\beta$ 1 peut être régulée par l'oncoprotéine LMP1 et moduler l'adhésion cellulaire (Morris et al., 2016). Dans le sérum des patients atteints de CNP, les niveaux de TGF $\beta$ 1 détectés sont supérieurs à ceux d'individus sains ou à des stades plus précoces de la maladie (Xu et al., 1999).

### III-3. c) Interleukine-35

L'interleukine-35 (IL-35) est une cytokine hétérodimérique composée du gène 3 induit par l'EBV (EBI3) et de l'IL-12p35. Dans le microenvironnement tumoral, IL-35 est un médiateur important favorisant une forte activité immunosuppressive et une progression tumorale.

Par la diminution simultanée des T effecteurs, des Th1, des Th17 et des macrophages, IL-35 contribue fortement à l'expansion des cellules Tregs et Breg, anergiques et possédant des fonctions immunosuppressives. L'activité immunosuppressive principale de l'IL-35 reste cependant l'altération des réponses cytotoxiques des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> par épuisement. Cette suppression n'est pas directe : l'IL-35 régule la molécule costimulatrice CD28 à la surface des cellules T CD8<sup>+</sup> immatures et bloque leur différenciation en T cytotoxiques anti-tumoraux ; elle peut également perturber l'activation des Th1 afin de supprimer la cytotoxicité antitumorale (K. Liu et al., 2021). Cette cytokine immunosuppressive peut de plus contribuer à augmenter l'expression des récepteurs inhibiteurs membranaires (PD-1, CTLA-4, TIM-3 ou LAG-3) des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> infiltrants les tumeurs et moduler leurs sécrétions de cytokines, causant ainsi leur épuisement (K. Liu et al., 2021; Zhang et al., 2019).

Les cellules immortalisées par l'EBV et en programme de latence III surexpriment IL-35 (Auclair et al., 2019), ce qui peut participer à l'inhibition des fonctions des T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> effecteurs et favoriser l'échappement à l'immunosurveillance. Des études ont montré une corrélation directe entre la production d'IL-35 et l'expression de PD-L1 (cellules tumorales IL-35<sup>+</sup>/PD-L1<sup>+</sup>), suggérant une nouvelle combinaison lors des traitements par immunothérapie : anti-IL-35 associé aux anti-PD-L1/anti-PD-1 (Heim et al., 2019; Ye et al., 2021).

## **Partie 3. Fucoïdane : polysaccharide thérapeutique**

---



Depuis plusieurs décennies, la découverte de nouvelles molécules naturelles bioactives a attiré l'attention de la communauté scientifique. Les algues sont devenues des ressources marines d'intérêt vu leur taux de croissance rapide, la diversité de substances chimiques qu'elles produisent et le grand nombre d'applications possibles. Les cultures asiatiques incorporent la consommation d'algues dans leur régime alimentaire et les utilisent pour différents problèmes de santé. Malgré la longue histoire des algues comme agents thérapeutiques, les fucoïdanes, polysaccharides extraits d'algues brunes, n'ont été bien documentés qu'après leur découverte au XX<sup>ème</sup> siècle. C'est ainsi que la recherche sur les propriétés bioactives d'extraits de fucoïdanes fut lancée, particulièrement à des fins thérapeutiques.

Dans cette partie nous présenterons l'historique, la structure chimique et les différents facteurs qui affectent les activités biologiques des fucoïdanes. Ensuite, les doses d'administration de ces molécules seront décrites avec leur métabolisme et leur internalisation cellulaire. Une section sera consacrée aux effets des fucoïdanes sur les facteurs de l'immunité et les cellules tumorales. Un autre paragraphe permettra de décrire l'implication de ces extraits dans différentes voies de signalisation croisées avec l'immunosurveillance. Enfin, le dernier paragraphe traitera des applications dans la recherche clinique.

## I- Historique

Depuis l'année 77 av. J.-C, la consommation d'algues à des fins thérapeutiques a été recommandée par l'historien romain Gaius Plinius Secundus et le médecin grec Dioscorides Pedanius, notamment pour traiter la goutte, les éruptions cutanées, les problèmes intestinaux et les troubles hépatiques. Au 17<sup>ème</sup> siècle, le botaniste anglais John Gerard, auteur du livre botanique du siècle « *Generall Historie of Plantes* », a noté l'utilisation des algues pour toutes sortes de maux. En 1913, le professeur suédois Harald Kylin a été le premier chimiste à décrire et isoler un film visqueux sur les algues nommé « fucoïdine », ultérieurement appelé « fucoïdane » (Figure 30). Il s'est concentré particulièrement sur certaines espèces d'algues : *Laminaria digitata*, *Laminaria saccharina*, *Ascophyllum nodosum* et *Fucus vesiculosus*. La caractérisation des fucoïdanes a débuté avec lui et a été suivie par d'autres chimistes ; toutes leurs analyses ont permis de déterminer les fucoïdanes en tant que polymères sulfatés riches en fucose.





**Figure 30. Pr Suédois Harald Kylin, premier chimiste ayant décrit et isolé le film visqueux de « fucoïdine » sur les algues**

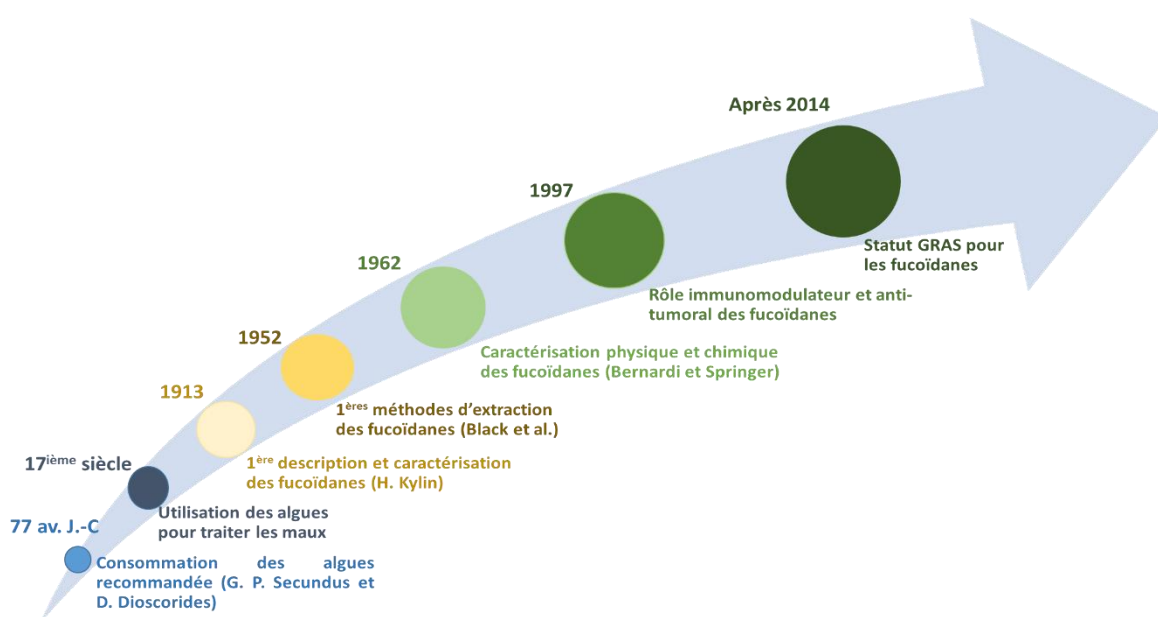
Les flèches rouges montrent le film visqueux sur *Fucus vesiculosus*.

En 1952, à l'institut de recherche sur les algues au Royaume-Uni, l'équipe de Black et al. a déterminé les premières méthodes d'extraction et d'isolement des fucoïdanes d'algues brunes. Dix ans plus tard, Springer et Bernardi ont examiné des fractions de fucoïdanes hautement purifiées, ce qui a permis de mieux comprendre les caractéristiques physiques et chimiques de ces molécules (Bernardi and Springer, 1962; Black et al., 1952; Hoagland and Lieb, 1915). Les premières utilisations médicales ont été mis en évidence à Monte Verde (Chili) ; en 1970, des archéologues ont pu mettre à jour l'idée de la consommation d'algues, cuites ou mâchées crues, seules ou mélangées à d'autres plantes. Le fucoïdane brut du *Fucus vesiculosus* est devenu disponible dans le commerce auprès de la société Sigma Inc (États-Unis), permettant d'élargir l'éventail d'opportunités au niveau de la recherche mondiale sur ces polysaccharides. Les premiers rapports sur les effets anti-cancéreux des fucoïdanes ont émergé tout d'abord au Japon, tels que les travaux de Yamaoto et al., montrant des effets anti-tumoraux. A partir des années 1980, plusieurs autres rapports ont révélé le rôle des fucoïdanes dans le support des réponses immune et inflammatoire, le blocage des récepteurs membranaires, le retard du développement des tumeurs *in vivo* et l'inhibition des infections virales (Sugawara and Ishizaka, 1982).

Suite à l'ensemble de ces découvertes, après une dizaine d'années, l'intérêt des fucoïdanes s'est répandu dans tout le Japon, l'Europe, jusqu'en Australie. En 1997, les recherches sur le rôle des fucoïdanes dans la modulation des réponses immunes ont commencé au Japon et en Russie.

En 2003, la compagnie australienne Marinova a commencé à récolter l'algue *Undaria pinnatifida* pour produire des fucoïdanes ; elle a développé les premières techniques d'extraction aqueuse différentes des techniques traditionnelles, dont le produit final préserve sa structure chimique et n'est pas contaminé par des solvants résiduels.

Les fucoïdanes extraits de l'algue brune *Fucus vesiculosus* possède le statut « Généralement Reconnu comme Sûr » (GRAS) avec l'approbation de l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (USFDA – U.S. Food and Drug Administration) et de l'Union Européenne pour les nouveaux aliments (Citkowska et al., 2019a; Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), 2014) (Figure 31).

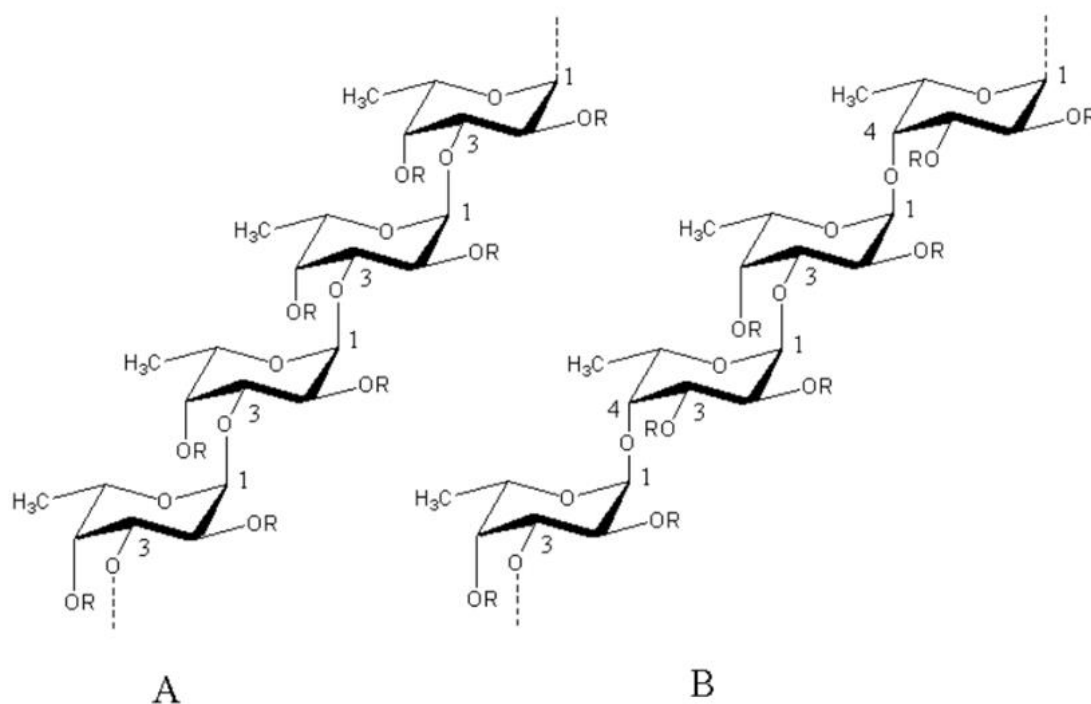


**Figure 31. Chronologie de l'histoire des fucoïdanes**

L'intégration des fucoïdanes sur plusieurs pistes de recherche a donné plus de 2300 articles scientifiques soutenant leur bioactivité. Toutes ces recherches ont désormais diversifié les applications des fucoïdanes : compléments alimentaires, dispositifs médicaux et formules pour la dermatologie.

## II- Structure et composition chimique

Le fucoïdane est généralement le terme utilisé et précisé par l'Union Internationale de la Chimie Pure et Appliquée (IUPAC) pour désigner les polymères sulfatés constitués de L-fucose tels que les fucanes sulfatés ou d'autres polysaccharides riches en fucose. Il s'agit d'un hétéropolysaccharide, soluble dans l'eau, dérivé des parois cellulaires des algues brunes et d'autres tissus d'invertébrés marins. Il est composé principalement de groupes de L-fucose sulfatés dont le principal monosaccharide est le L-fucose-4-sulfate (environ 34 à 44%). D'autres petites proportions de monosaccharides dont le galactose, le xylose, le mannose, le rhamnose, le glucose, l'arabinose, l'acide uronique, ainsi que des groupes d'acétyle et de protéines sont également présents. Deux structures de chaîne peuvent constituer le squelette du fucoïdane : une avec des résidus (1→3)- $\alpha$ -L-fucopyranose et l'autre une combinaison alternative de résidus avec l' $\alpha$ -L-fucopyranose lié par (1→3) et (1→4). Des substitutions simples et doubles dans les groupes sulfate aux positions C-2 ou C-4 des deux squelettes peuvent se produire dans certains fucoïdanes (Holtkamp et al., 2009; Wang et al., 2010, 2008) (Figure 32).



**Figure 32. Chaînes de structure squelettique des fucoïdanes**

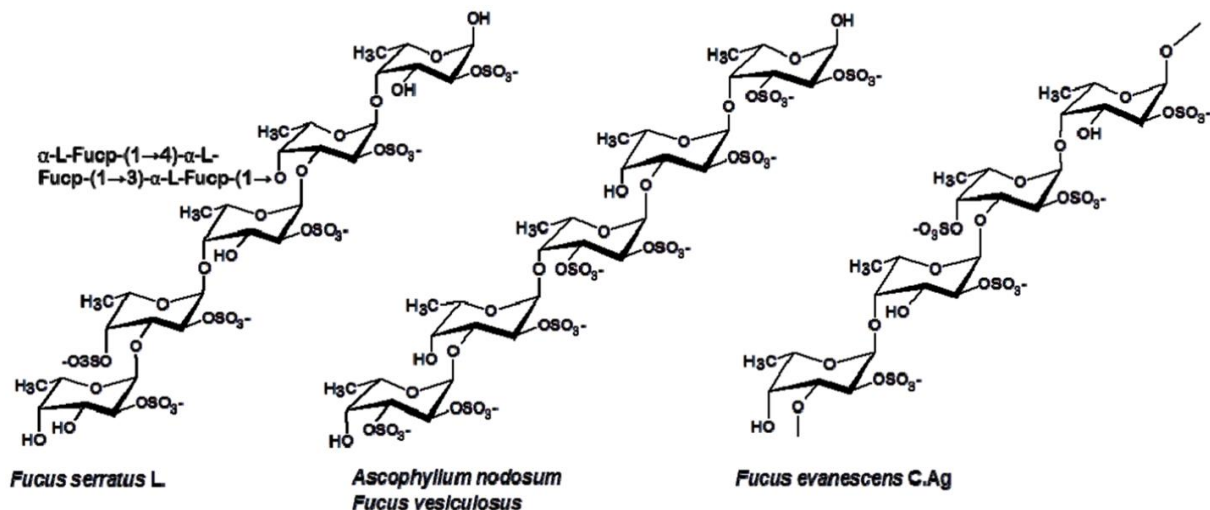
(A) chaîne constituée uniquement de résidus  $\alpha$ -L-fucopyranose liés à la répétition (1 → 3)

(B) chaîne constituée d'une alternance de résidus  $\alpha$ -L-fucopyranose liés à (1 → 3) et (1 → 4).

D'après Lin et al., 2020.

Le squelette du fucoïdane ne couvre pas toute la structure de la molécule, beaucoup plus complexe avec des ramifications diverses. Pourtant, c'est le squelette qui est le plus souvent utilisé comme référence de classification des molécules.

La structure des fucoïdanes et leur composition chimique diffèrent entre les différentes espèces d'algues (Figure 33) ; et peut notamment changer au sein d'une même espèce dépendamment de plusieurs facteurs : le site géographique de récolte, le moment de la récolte et les techniques d'extraction.



**Figure 33. Structure typique des fucoïdanes de différentes espèces d'algues brunes**

D'après Ale et al., 2011

### III- Facteurs influençant les activités biologiques des fucoïdanes

Plusieurs facteurs définissent les activités biologiques des fucoïdanes dont la composition chimique (contenu en sulfate, degré de dépolymérisation (poids moléculaire - PM), ratio de monosaccharides et liaison des résidus de sucre), la méthode d'extraction et l'environnement marin.

En fonction du poids moléculaire, trois classes de fucoïdanes existent : le fucoïdane de bas poids moléculaire (Low Molecular Weight Fucoïdan - LMWF) (<10 kDa), le fucoïdane de poids moléculaire moyen (Medium Molecular Weight Fucoïdan - MMWF) (10-10 000 kDa) et le fucoïdane de haut poids moléculaire (High Molecular Weight Fucoïdan - HMWF) (> 10 000 kDa). Des études de Yang et al. ont montré que le LMWF de *Undaria pinnatifida* présente une

activité anti-tumorale deux fois plus élevée que le fucoïdane natif de la même espèce et aux mêmes concentrations (Wang et al., 2019; Yang et al., 2008).

Dans les lignées cellulaires du cancer du sein, le LMWF (*Cladosiphon navae-caledoniae*) a induit les plus hauts pourcentages d'apoptose. D'autres rapports ont révélé que l'effet angiogénique du fucoïdane dépend lui aussi du PM. En effet, le LMWF a induit une angiogénèse sur les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine, tandis que le HMWF a montré un effet inhibiteur (Van Weelden et al., 2019). Cependant, certaines études ont révélé des activités anti-tumorales similaires du fucoïdane de *Sargassum hornery* natif ou dépolymérisé (Ermakova et al., 2011a; Wang et al., 2019).

Généralement, la teneur en sulfate est importante pour la bioactivité du fucoïdane. Des études ont montré que la présence de différents sucres comme le galactose ou le xylose dans les molécules de fucoïdane, n'est pas en elle-même importante, mais ce sont les groupes sulfates attachés qui constituent l'élément clé. Les fractions sursulfatées de *Undaria pinnatifida* ont montré des activités anti-cancéreuses plus considérables que celles intactes ayant une teneur de sulfate basale dans le cas de lignées cellulaires du cancer gastrique (Cho et al., 2010). Le LMWF (*U. pinnatifida*) sursulfaté (56,8 %) a inhibé plus efficacement la croissance des cellules cancéreuses (Van Weelden et al., 2019). L'inhibition de la prolifération des cellules d'ostéosarcome par le fucoïdane a été espèce et PM-dépendant. Les meilleurs résultats de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et l'accumulation des cellules en phase sub-G1 ont été observés avec le fucoïdane natif dérivé du *Fucus vesiculosus*, plus riche en sulfate que celui dérivé du *Sargassum filipendula* et également avec les plus hauts PM. Quant à l'apoptose, le PM moyen, le plus riche en sucre et sulfate, a le plus induit l'apoptose (Gupta et al., 2020). Zayed et ses collaborateurs ont rapporté que le contenu en sulfate est important pour l'activité cytotoxique et anticancéreuse ; plus particulièrement, le sulfate en C-4 joue un rôle important contre l'infection par l'herpès simplex virus, et en C-2 ou C-3 pour l'activité anti-coagulante (Zayed et al., 2020). Ces résultats suggèrent que la sursulfatation augmente la charge négative responsable d'une plus importante bioactivité.

Certaines espèces d'algues brunes contiennent plusieurs structures de fucoïdanes. La diversité des techniques d'extraction et de purification conduisent aux différentes structures de ces molécules, et sont alors deux autres déterminants importants de la structure et de la bioactivité associée. Par exemple, la méthode de purification fait qu'une même espèce d'algue soit capable de produire deux structures distinctes de fucoïdanes - à savoir les uronofucoïdanes et les galactofucanes. De plus, le type de la méthode d'extraction définit la bioactivité finale du LMWF. L'hydrolyse acide, souvent utilisée, résulte en une bioactivité réduite à cause de la perte de ramification. Au contraire, la dégradation enzymatique du HMWF

entraîne un LMWF plus bioactif, grâce à la rétention des groupes sulfate (Van Weelden et al., 2019).

L'environnement marin est un élément clé dans la structure du fucoïdane surtout la saison de récolte définie principalement par le pH de l'eau, sa température, sa salinité et l'exposition à la lumière. La saison de récolte des algues affecte la structure de ses composants tels que le fucoïdane, en modifiant sa composition du sucre. Lorsque l'algue *Undaria pinnatifida* a été récoltée dans différentes conditions et saisons, le fucoïdane dérivé a présenté des caractéristiques et une bioactivité distinctes (Van Weelden et al., 2019).

#### IV- Dose et voies d'administration

La structure hautement ramifiée du fucoïdane et la grande taille de cette molécule définissent le cadre posologique des études menées sur ces polysaccharides sulfatés.

Dans les études *in vitro*, le dosage du fucoïdane se situe dans une plage de  $\mu\text{g/mL}$ , la plupart inférieure à  $1\text{mg/mL}$ , et non de  $\text{ng/mL}$ . Cependant, il existe quelques rapports d'utilisation allant jusqu'à  $3\text{mg/mL}$ . Néanmoins, la marge des doses dans les études reste très variable, surtout en raison des différentes sources et méthodes de purification. Les résultats après 24h de traitement des cellules tumorales du côlon avec du fucoïdane (*Saccharina cichorioides*) de concentrations entre 100 et  $800\ \mu\text{g/mL}$  ont montré une faible cytotoxicité et moins de 15% de réduction du nombre de cellules même avec la dose de  $800\ \mu\text{g/mL}$  (Vishchuk et al., 2013). D'autres études sur le cancer du poumon (A549) ont révélé une inhibition de 50% de la prolifération cellulaire en présence de  $100\ \mu\text{g/mL}$  fucoïdane pour 48h d'incubation (Y. Lin et al., 2020). En revanche, d'autres auteurs ont rapporté que, pour les mêmes lignées cellulaires,  $20\ \mu\text{g/mL}$  de fucoïdane du *Fucus vesiculosus* ont été suffisants pour inhiber la croissance de 37% des cellules après 72 h. Bien que la différence entre les durées de traitements ne soit pas négligeable, la différence entre les doses reste considérable (Kim et al., 2010) ce qui suggère que la source de fucoïdane soit un facteur principal dans la variation des résultats, à côté de la durée d'incubation et du dosage (Atashrazm et al., 2015).

Quant aux études *in vivo*, la posologie du fucoïdane est principalement de l'ordre de  $\text{mg/Kg}$  de poids corporel, associée aussi à la route d'administration. Les souris ont été traitées avec diverses doses de fucoïdane allant de 5 à  $500\ \text{mg/kg}$  de poids corporel. Dans la plupart des études, l'injection de fucoïdane à  $100\ \text{mg/kg}$  de poids corporel a montré les meilleurs taux de survie, en moyenne après un mois.

D'autres études, chez des souris C57 transplantées avec un adénocarcinome pulmonaire de Lewis, ont utilisé diverses doses de fucoïdane (*Fucus evanescence*) avec de multiples injections, et les auteurs ont constaté qu'une seule injection de 25 mg/kg de poids corporel de fucoïdane n'a pas inhibé la prolifération des cellules cancéreuses, alors que trois injections de 10 mg/kg de poids corporel ont significativement réduit la croissance tumorale (Atashrazm et al., 2015).

Concernant les voies d'administration, la plupart des études *in vivo* menées sur l'activité antitumorale ont utilisé des injections intrapéritonéales, ainsi que des voies sous-cutanée et intraveineuse. En outre, certaines études *in vivo* ont sélectionné le fucoïdane par voie orale pour ses propriétés anti-tumorales après l'induction de la tumeur ou inhibitrices de la transformation avant l'induction du cancer. Les différentes voies d'administration influencent le métabolisme de la molécule et conduit à des résultats variables (Atashrazm et al., 2015) et rendent la concentration et le taux métabolique de fucoïdane dans le corps significativement différents, ce qui à son tour conduit à des effets différents sur le développement de tumeurs (Jin et al., 2021; Y. Lin et al., 2020).

## V- Toxicité

Le fucoïdane est un aliment consommé sous la forme de 4% du poids sec total des algues brunes. Son utilisation en pharmacie et en biomédecine est possible car il est un composé non toxique, biodégradable et biocompatible. Les extraits d'*Undaria pinnatifida* et de *Fucus vesiculosus* ont été approuvés par la FDA en tant qu'aliments à des niveaux allant jusqu'à 250 mg/jour. En Europe, plusieurs pays tels que l'Autriche, la Belgique, la France, la Pologne, l'Espagne et le Royaume-Uni, ont enregistré des préparations contenant du *F. vesiculosus*. Bien que le fucoïdane est considéré comme aliment sûr, celui utilisé pour la recherche est hautement purifié.

Le fucoïdane a été testé *in vitro* sur des cellules normales en comparaison avec leurs cellules tumorales correspondantes. Par exemple, le fucoïdane n'a pas induit l'apoptose des fibroblastes normaux en comparant aux tumoraux. En revanche, des doses très élevées de fucoïdane allant jusqu'à 3 mg/mL ont baissé de 25% la viabilité des cellules mononucléées du sang périphérique de donneurs sains, sachant que ce pourcentage de suppression reste inférieur à celui dans les cinq autres lignées de T leucémiques (60 à 90%) (Atashrazm et al., 2015).

*In vivo*, après administration quotidienne de LMWF de *Laminaria japonica* à 2000 mg/kg de poids corporel par jour sur un modèle murin, aucune indication toxicologique n'a été observée, proposant l'utilisation de ces fractions de fucoïdanes comme complément alimentaire sûr

(Hwang et al., 2016). Une dose orale jusqu'à 1 g/mL/kg de poids corporel de fucoïdane (*Undaria pinnatifida*) n'a pas été toxique pour le modèle murin étudié, mais des doses de 2 g/mL/kg de poids corporel ont changé le poids de la thyroïde et altéré les niveaux d'activité des triglycérides.

Dans une autre étude chez des rats Wister pendant 6 mois, 300 mg/kg de poids corporel de fucoïdane (*Laminaria japonica*) n'a montré aucun effet secondaire indésirable, mais des doses de 900 à 2500 mg/kg de poids corporel ont entraîné une coagulopathie (Jin et al., 2021). Des chercheurs ont montré que chez des rats Sprague-Dawley, il n'y a pas eu d'effets secondaires lors de la prise de doses fucoïdane allant jusqu'à 1000 mg/kg de poids corporel par voie orale pendant 28 jours (Y. Lin et al., 2020).

Dans certaines études, le fucoïdane a été testé dans le contexte clinique principalement pour ses propriétés anticoagulantes et antivirales. Les participants ont pris quatre gélules contenant 560 mg de fucoïdane (*Undaria pinnatifida*) par jour pendant 24 mois, sans que ce traitement n'induisse aucun effet secondaire. Egalement, la consommation quotidienne de 5 capsules de 166 mg de fucoïdane (*C. okamuranus Tokida*) sur 12 mois pendant plus d'un an ; ou de 3 g de HMWF (*Undaria pinnatifida*) sur 12 jours, a été, dans les deux cas, sans danger. Par contre, l'administration d'une dose journalière plus élevée (6 g) de fucoïdane, pendant un mois, a causé une diarrhée chez 4 participants sur 17. L'administration de gélules de 187,5 mg de fucoïdanes mélangés de trois extraits différents (*Fucus vesiculosus* (85%), *Macrocystis pyrifera* (10%) et de *Laminaria japonica* (5%)) a induit un changement significatif du taux de potassium chez les volontaires après 28 jours, en revanche, ce changement est resté dans la plage de référence clinique (Atashrazm et al., 2015). Ces résultats suggèrent qu'une administration orale quotidienne d'une dose de fucoïdane pendant un an est tolérable et sans danger.

## VI- Métabolisme et internalisation cellulaire

Durant les dernières dizaines d'années, l'internalisation du fucoïdane dans la cellule n'a pas été profondément étudiée. Ce qui était notamment connu est que le fucoïdane de poids moléculaire élevé ne pouvait pas être absorbé par l'intestin humain par manque d'enzymes digestives correspondantes. En 2002, une étude *in vitro* de Deux et al. a montré que le LMWF (5 µg/mL à 37 °C) marqué par fluorescence est internalisé dans les vésicules endocytiques dans le cytosol et a été suivi jusqu'à la région périnucléaire des cellules de muscles lisses de lapin après 6 heures d'exposition, et que dans les 24 heures qui suivent, le



nombre de vésicules périnucléaires a augmenté, mais sans observer une internalisation nucléaire (Deux et al., 2002).

A partir de 2005, de nombreuses activités expérimentales et études cliniques ont été menées sur l'ADME, en d'autres termes, l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion du fucoïdane. Les premiers rapports ont montré une absorption du fucoïdane par les macrophages intestinaux et les cellules de Kupffer. Dans des autres essais cliniques, impliquant des volontaires japonais et d'autres nationalités, le fucoïdane a été détecté dans l'urine des personnes après l'administration orale du fucoïdane, mais avec des concentrations significativement plus importantes pour les japonais, différence justifiée par la consommation quotidienne du Mozuku par ces populations. Chez ces dernières aussi, les enzymes digestives des algues ont été aussi détectées. Cependant, ces enzymes ont été rarement détectées chez les autres volontaires dont le régime alimentaire quotidien ne contenait pas d'algues. Ces enzymes aident à l'absorption intestinale du fucoïdane qui va s'accumuler dans le foie et être excrété lentement avec l'urine. Les conditions acides dans l'estomac sont capables d'hydrolyser le fucoïdane de manière limitée, expliquant aussi la présence de fractions de fucoïdane altérées trouvées dans l'urine (Y. Lin et al., 2020). D'autres études d'absorption réalisées sur des volontaires sains ont montré qu'une partie du fucoïdane a été absorbée par endocytose et détectée dans le sérum et l'urine. Récemment, deux essais cliniques ont été menés sur la biodistribution et la tolérance du fucoïdane : le premier essai étant sur des volontaires sains (ClinicalTrials.gov : NCT03422055), et le deuxième (ClinicalTrials.gov : NCT03130829) sur des patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules, dans lequel le fucoïdane a été ajouté au traitement de chimiothérapie (Luthuli et al., 2019).

Certains rapports ont souligné la grande capacité des fucoïdanes à interagir avec les facteurs de croissance, les macrophages, les cytokines et la P-sélectine, d'où son grand potentiel à être un adjuvant précieux dans la technologie pharmaceutique, pour renforcer l'activité du médicament (Citkowska et al., 2019b). Des chercheurs ont rapporté que le fucoïdane natif de haut poids moléculaire a un faible taux d'absorption lorsqu'il est administré par voie orale. Ils ont montré que l'administration intraveineuse de LMWF (50 mg/kg de poids corporel) chez le lapin a entraîné une absorption rapide. Ces résultats suggèrent qu'il faut développer l'utilisation de LMWF à des fins cliniques vu son meilleur taux d'absorption et sa meilleure biodisponibilité (Van Weelden et al., 2019).

## VII- Effets biologiques des fucoïdanes

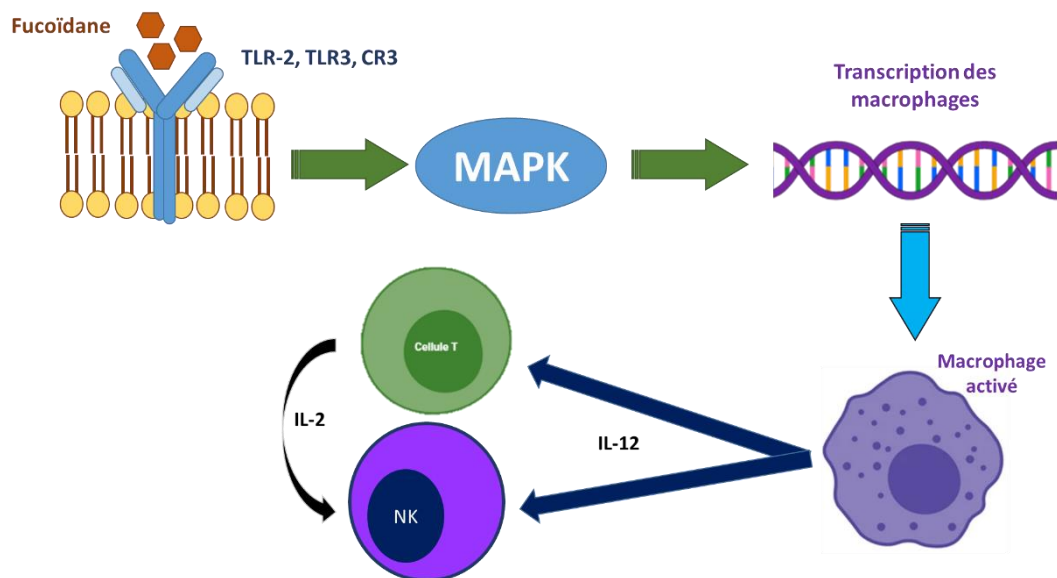
### VII-1. Action sur les cellules immunes

Le fucoïdane, surtout administré par voie orale, est une molécule très prometteuse dans le domaine de l'immunomodulation.

#### VII-1. a) Cellules dendritiques

Li et ses collaborateurs ont montré que les effets immunostimulants et de maturation du fucoïdane de *F. vesiculosus* sur les cellules dendritiques sont effectués via une voie impliquant NF- $\kappa$ B (Li et al., 2008). En outre, l'équipe d'Ale et al. a confirmé que le fucoïdane est capable de se lier à des récepteurs glycoprotéiques spécifiques dans les membranes cellulaires des macrophages pour activer les MAPKs et induire ainsi leur transcription. Les macrophages activés induisent la production d'IL-12 qui à son tour stimule le développement des cellules T. Ces dernières produisent l'IL-2 qui va activer la prolifération des NK produisant l'IFN- $\gamma$ , qui peuvent en outre provoquer la participation des macrophages à la stimulation des lymphocytes T via l'induction d'IL-12 (Ale et al., 2011) Dans une étude sur les cellules tumorales YAC-1, le fucoïdane de *Macrocystis pyrifera* a favorisé l'activation des cellules NK et leur activité cytotoxique contre les cellules cibles (YAC-1), ainsi que celles des cellules dendritiques de la rate et des cellules T. Le fucoïdane *Fucus vesiculosus* a amélioré lui aussi la fonction des cellules dendritiques de la rate et la réponse immunitaire adaptative par activation des lymphocytes T cytotoxiques. Le fucoïdane *Ascophyllum nodosum* a pu induire la maturation des cellules dendritiques et améliorer la réponse immunitaire *in vitro* et *in vivo*. Des études ont démontré que les fucoïdanes de *Laminaria japonica*, *Laminaria cichorioides* et *Fucus evanescens* peuvent se lier aux TLRs (TLR-2 et TLR-4), récepteurs transmembranaires clés de la réponse immune innée, ce qui active le médiateur NF- $\kappa$ B pour stimuler les réponses immunitaires (Fitton et al., 2015).

La figure 34 représente schématiquement le mode d'action des fucoïdanes sur l'activation des macrophages, des lymphocytes T et des cellules NK.



**Figure 34. Mécanisme d'action des fucoïdanes dans l'activation des macrophages, des lymphocytes T et des cellules NK**

Les fucoïdanes se lient aux récepteurs à la surface membranaire des macrophages pour induire l'activation de leur transcription. Une fois activés, les macrophages produisent des cytokines comme l'IL-12 qui va activer les lymphocytes T et les cellules NK. Ces dernières peuvent être aussi activées par l'IL-2 produite par les cellules T (Inspiré d'après Lin et al., 2020).

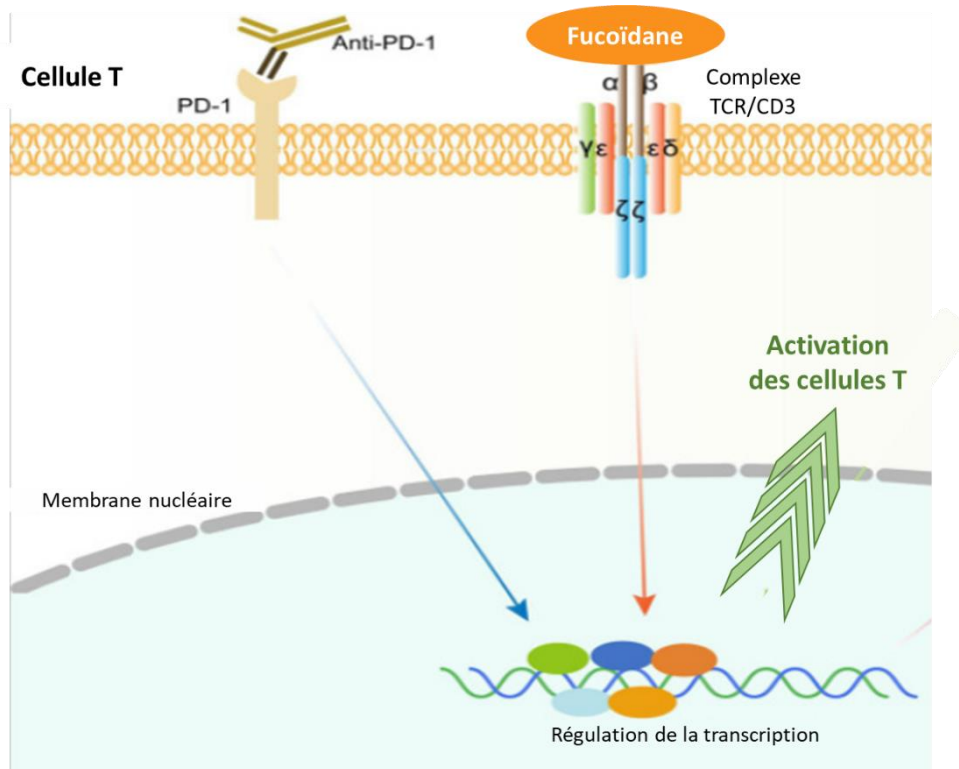
L'intégrine  $\beta 2$  ou CR3 est la seule intégrine qui contient un domaine de type lectine de liaison aux glucides. Des études ont montré que certains polysaccharides naturels peuvent activer les cellules immunitaires, dont les NK, via CR3. De plus, le fucoïdane se lie au TGF- $\beta 1$  et inhibe son activation ; cette inhibition est principalement liée au poids moléculaire du fucoïdane (Z. Lin et al., 2020). Des monocytes ont été isolés des moelles osseuses de souris et différenciés en cellules dendritiques, suivi de traitements de fucoïdanes : *Ascophyllum nodosum* ou *Fucus vesiculosus*. Le fucoïdane extrait du *F. vesiculosus* a fortement régulé à la hausse les niveaux d'expression de CD40, CD80, CD86 et CMH-II, marqueurs conventionnels de maturation des cellules dendritiques (Wang et al., 2019; J. Yang et al., 2021).

## VII-1. b) Lymphocytes T et cellules NK

Xue et ses collaborateurs ont montré qu'après le traitement au fucoïdane, le nombre de cellules NK et les proportions des lymphocytes T (CD4 et CD8) ont augmenté dans le sang des rats. En plus, le pourcentage des Tregs (CD3<sup>+</sup> et Foxp3<sup>+</sup>) a aussi augmenté dans le sang des rats traités, en parallèle aux baisses significatives des niveaux de l'IL-10 et TGFβ dans le sérum des rats traités au fucoïdane en comparant avec les rats modèles. Les auteurs ont aussi rapporté des augmentations des taux sériques de l'IL-6 et l'IFNγ chez les rats traités au fucoïdane. Le plus intéressant a été la diminution de l'expression de PD-L1, immuno-inhibiteur des T effecteurs, dans les cellules tumorales, en présence du fucoïdane (Xue et al., 2017). Une autre étude effectuée sur des souris C57BL/6 injectées des cellules tumorales B16 de mélanome, a montré également une augmentation dans la population de cellules T CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>, des cellules NK dans leur rate, et des T infiltrant la tumeur, après un traitement combiné du fucoïdane (*Ascophyllum nodosum*) avec un anticorps bloquant anti-PD-1. Il n'y a pas eu des variations évidentes du pourcentage des cellules T et NK dans le sang et les ganglions lymphatiques en présence du traitement. Ces résultats indiquent qu'un traitement combiné de fucoïdane avec des anticorps anti-PD-1 pourrait améliorer l'efficacité thérapeutique de l'immunothérapie. L'activation des lymphocytes T a été plus remarquable lorsque les souris ont été prétraitées au fucoïdane, suggérant que l'activité anti-tumorale du fucoïdane peut être attribuée à la modulation des réponses immunes même avant le déclenchement de la croissance tumorale. Ensuite, les auteurs ont évalué la stimulation directe de l'activité des cellules T par le fucoïdane, en utilisant des signaux de co-stimulation anti-CD3 et anti-CD28. Les résultats ont montré une augmentation de la production des cytokines IFNγ et TNFα, indiquant une fonction effectrice accrue des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> primaires (J. Yang et al., 2021).

Le complexe TCR/CD3 déclenche la transduction du signal du récepteur des lymphocytes T (TCR) lors de leur activation, ce qui conduit à la propagation du signal *via* la voie Ca<sup>2+</sup>/calcineurine (translocation nucléaire du facteur des T activés), la voie de signalisation NF-κB (translocation nucléaire de REL/NFKB) et la voie MAPK (polymérisation de l'actine). Plusieurs auteurs ont rapporté que le fucoïdane peut activer toutes ces voies régies par la signalisation du TCR ; par conséquent, Yang et al., ont étudié la possibilité d'une interaction fucoïdane-TCR/CD3 pour augmenter l'activation des lymphocytes T. Ils ont utilisé un marqueur (FITC-UEA-I) capable de reconnaître spécifiquement le squelette fucose du fucoïdane. Les résultats de cytométrie en flux ont révélé que les lymphocytes T ont été marqués par la FITC-UEA-I, lors des traitements au fucoïdane. Ensuite, par surexpression du CD3E - composant majeur du complexe TCR/CD3 - humain fluorescent, ils ont confirmé que le fucoïdane se lie

au TCR/CD3 à la surface des cellules T. En effet, le fucoïdane marqué et visualisé par FITC-UEA-I a été partiellement colocalisé avec la fluorescence du CD3E et donc avec le complexe TCR/CD3 sur la surface cellulaire des lymphocytes T (J. Yang et al., 2021) (Figure 35).



**Figure 35. Mécanisme d'action des fucoïdanes combinés avec l'anticorps anti-PD-1 pour l'activation des lymphocytes T**

Le fucoïdane interagit avec le complexe TCR/CD3, avec un traitement bloquant de PD-1, ce qui active la transcription et par conséquent les lymphocytes T (Modifié d'après Yang et al., 2021).

Des rapports ont révélé que le traitement fucoïdane (HMWF et LMWF) des cellules NK-92 humaines pendant 24 h a augmenté la prolifération des cellules tueuses traitées de manière dose-dépendante, mais qui a été plus significative avec le HMWF que le LMWF. Ces résultats ont été comparables à ceux avec la concanavaline A, un mitogène lymphocytaire qui augmente la prolifération des NK. Quant à l'activité cytotoxique des cellules NK contre les cellules de lymphomes YAC-1, celle des cellules traitées par HMWF a été similaire à l'activité cytotoxique cellulaire du groupe traité par la concanavaline A. La cytotoxicité des cellules NK est médiée par l'expression de granules cytolitiques contenant la granzyme B et la perforine, pour initier la réduction du nombre de cellules tumorales. En effet, une autre série de résultats

a montré que la production de granzyme B a également augmenté de manière significative dans le groupe traité par le HMWF (Yoo et al., 2019).

En plus, l'administration du fucoïdane par voie systémique à des souris a régulé à la hausse la production d'IL-6, d'IL-12 et de TNF- $\alpha$ , et a amélioré l'équilibre immunitaire Th1/Th2, ce qui renforce les fonctions immunitaires (Jin et al., 2014; Wang et al., 2019). Un HMWF de *Cladosiphon okamuranus* a fortement augmenté la proportion de lymphocytes T cytotoxiques murins. En plus, la stimulation des lymphocytes T cytotoxiques par les cellules dendritiques a été plus efficace, lorsque ces dernières ont été traitées au fucoïdane : lorsque les cellules T cytotoxiques ont été co-cultivées avec les cellules dendritiques traitées au fucoïdane, leur niveau de lyse spécifique des cellules tumorales a été élevé (Atashrazm et al., 2015). Des études menées sur des souris transplantées avec des cellules de leucémie ont montré que le traitement fucoïdane du *Fucus vesiculosus* a augmenté efficacement l'activité destructrice des cellules NK (Y. Lin et al., 2020). D'autres chercheurs ont observé que le traitement fucoïdane chez des souris atteintes de tumeurs du côlon a induit rapidement une augmentation du nombre de cellules NK dans la rate des souris (Jin et al., 2021).

Les propriétés immunomodulatrices du fucoïdane améliorent la réponse immunitaire et proposent l'utilisation du fucoïdane dans un cadre clinique pour développer des traitements particuliers et ciblés.

## VII-2. Actions sur les cellules tumorales

Le cancer reste le premier parmi les causes mondiales de mortalité. Bien que la chimiothérapie constitue un des principaux traitements actuels, ses effets secondaires restent non négligeables, notamment les nausées et la multirésistance développée chez certains patients. Par conséquent, l'intégration de nouveaux composés antitumorales efficaces et à faible toxicité est primordiale dans le domaine thérapeutique. Le fucoïdane est connu pour ses propriétés antiprolifératives, apoptotiques et anti-cancéreuses dans plusieurs types de tumeurs solides et liquides. Ces activités biologiques des fucoïdanes est surtout définie par le poids moléculaire, la teneur en groupe de sulfate et la liaison des résidus de sucres.

## VII-2. a) Tumeurs solides

### VII-2. a) i- Induction de la mort cellulaire

L'apoptose dans les cellules tumorales est généralement médiée par des dommages à l'acide désoxyribonucléique ce qui cause une condensation chromosomique. La voie des caspases active l'induction intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose. Les caspases sont clivées par le complexe constitué du cytochrome C (Cyt-c) qui va ensuite être libéré des mitochondries et régulé par les membres de la famille Bcl-2.

Des études ont révélé les effets antiprolifératifs des fucoïdanes sur des lignées cellulaires de cancer de poumons (A549). En effet, le fucoïdane natif a inhibé la croissance des cellules tumorales de manière dose-dépendante (Yang et al., 2008). Ale et al. ont étudié les effets du fucoïdane brut extrait de *Sargassum sp.* et de celui commercialisé du *Fucus vesiculosus* sur des cellules de carcinome pulmonaire de Lewis et des cellules de mélanome B16. Les deux fucoïdanes ont été capables de baisser significativement le nombre de cellules vivantes de manière dose-dépendante (Ale et al., 2011). D'autres rapports sur une lignée de carcinome bronchopulmonaire humain non à petites cellules (NSCLC-N6) ont montré que le fucoïdane (*Bifurcaria bifurcata*) a inhibé irréversiblement les cellules cancéreuses. Il a été rapporté également que la croissance des cellules de carcinome pulmonaire de Lewis, en présence des fucoïdanes, a été supprimée de manière dose-dépendante, contrairement aux cellules épithéliales rénales normales. Sur le modèle murin C57BL/6 transplanté du cancer du poumon de Lewis, les études ont montré que le fucoïdane a pu atténuer les symptômes viraux et inhiber les métastases pulmonaires (Y. Lin et al., 2020).

Les effets des fucoïdanes ont été aussi étudiés sur des cellules tumorales du côlon. L'incubation des lignées cellulaires du cancer du côlon HCT116 avec le fucoïdane de *Saccharina cichorioides Miyabe* a légèrement (12%) inhibé la croissance cellulaire après 72h de traitement (Vishchuk et al., 2013). Sur la même lignée cellulaire, Wang et ses collaborateurs ont découvert que le LMWF a déclenché l'arrêt des cellules en phase G1 du cycle cellulaire et a induit l'apoptose de ces cellules (Wang et al., 2019). Dans d'autres études sur les effets du fucoïdane (*Undaria pinnatifida*) sur des lignées cellulaires d'adénocarcinome du côlon humain, les résultats ont montré une inhibition significative de la prolifération des cellules cancéreuses et une cytotoxicité faible sur les cellules normales. Des résultats sur deux lignées cellulaires du cancer du côlon (HT-29 et HCT116) ont montré que le fucoïdane induit l'apoptose de cellules tumorales *via* les voies apoptotiques médiées par les mitochondries. Des études *in vivo* ont rapporté que lorsque le MMWF a été administré à des souris porteuses de tumeurs du côlon, une inhibition considérable de la croissance tumorale est observée et le temps de survie des souris administrées de LMWF ou HMWF a été plus long que celui du groupe témoin

(Y. Lin et al., 2020). Le fucoïdane a baissé également le nombre de cellules viables des lignées du cancer du côlon humain (HT-29 et HCT116) de manière dose-dépendante. En plus, il a induit l'apoptose des cellules HT-29 avec une augmentation des niveaux de caspases-8, -9, -7 et -3 clivées ; et a amélioré la perméabilité de la membrane mitochondriale et la libération de Cyt-c (Kim et al., 2010). Lorsque les cellules cancéreuses du côlon HT29 ont été traitées par 50 et 100 µg/mL du fucoïdane (*F. vesiculosus*), la croissance cellulaire a été significativement inhibée, avec une augmentation de l'expression de l'inhibiteur de kinase dépendant de la cycline 1 p21WAF1 – associée à la phase G1 du cycle cellulaire - et une suppression de l'expression de la cycline (Han et al., 2015).

Dans un modèle *in vivo* de cancer de sein, le fucoïdane extrait du *Fucus vesiculosus* a induit l'apoptose par clivage de la caspase 3 et par la suite a causé la libération de Cyt-c (Van Weelden et al., 2019). Dans le cadre des études sur des lignées cellulaires MCF-7 du cancer du sein, le traitement au fucoïdane a induit l'apoptose par une voie dépendante de la caspase-8 et a induit la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN nucléaire. Sur la même lignée cellulaire, d'autres chercheurs ont rapporté également les effets antiprolifératifs du fucoïdane (*Undaria pinnatifida*) accompagné d'une faible cytotoxicité pour les cellules des tissus normaux. En plus, le traitement fucoïdane a causé un arrêt dans la phase G1 du cycle cellulaire et une induction de l'apoptose, avec une diminution de l'expression de gènes liés au cycle cellulaire et l'apoptose. Sur un modèle murin du cancer du sein (T-47D), les auteurs ont rapporté une inhibition efficace de la prolifération cellulaire (Y. Lin et al., 2020).

Ermakova et ses collaborateurs ont montré la capacité anti-tumorale du fucoïdane pour inhiber la formation de colonies dans le mélanome humain (SK-MEL-28) et les cellules cancéreuses du côlon (DLD-1) (Ermakova et al., 2011b). Dans une étude *in vitro* sur des lignées cellulaires de carcinome mucoépidermoïde (glandes salivaires) humain, le fucoïdane du *F. vesiculosus* a induit l'apoptose par activation de la caspase-3 (Van Weelden et al., 2019). Le traitement pendant 48 h de 550 µg/mL de fucoïdane extrait du *F. vesiculosus* a montré des inhibitions significatives de la prolifération cellulaire et une induction de l'apoptose des cellules de mélanome B16 (Luthuli et al., 2019). Les fucoïdanes dérivés des algues brunes *Sargassum henslowianum* ou *Fucus vesiculosus*, ont été capables de sensibiliser les cellules de mélanomes *in vitro* en induisant l'apoptose par clivage de la caspase-3 (Van Weelden et al., 2019).

Dans des études sur des cellules du cancer ovarien humain (SKOV-3, A2780, OVCAR-3, TOV-112D et Caov-3) en comparaison avec des cellules épithéliales ovariennes humaines normales (IOSE80), Liu et al. ont montré que le fucoïdane a inhibé de manière dose et temps-dépendante la prolifération des cellules cancéreuses avec peu d'effet sur les cellules



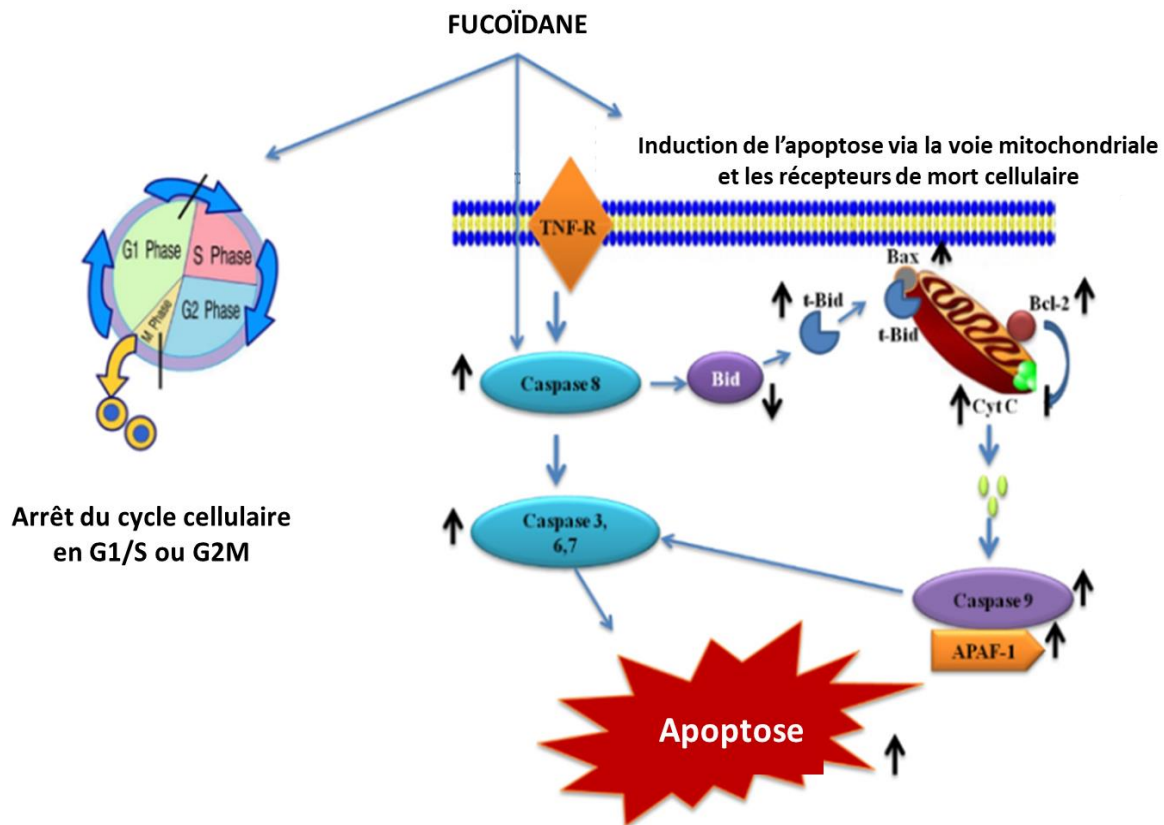
épithéliales normales. En outre, l'inhibition maximale a été observée après 48h du traitement dans toutes les lignées tumorales. Le fucoïdane a arrêté le cycle cellulaire à la phase G0/G1 dans les cellules SKOV-3 et Caov-3, et a diminué efficacement les niveaux d'expression des protéines CDK-4, CDK-6, cycline-E et cycline-D1. Le traitement au fucoïdane a augmenté aussi significativement le nombre de cellules apoptotiques de manière dose-dépendante. Il a augmenté l'expression des caspases et a baissé le niveau d'expression de la protéine anti-apoptotique, Bcl-2, sans avoir aucun effet apoptotique significatif sur les cellules épithéliales ovariennes normales. *In vivo*, après trois semaines d'administration de fucoïdane (10 mg/kg) à un modèle murin, la taille, le volume et le poids des tumeurs ont été réduits en comparant au témoin, ainsi que le poids des souris. Le traitement a aussi ralenti la croissance de la tumeur. Les différences significatives de l'expression protéique de Bax et Bcl-2 entre les tissus tumoraux et les témoins confirment les effets pro-apoptotiques des fucoïdanes *in vivo* (Liu et al., 2020).

Les études sur l'impact du fucoïdane sur la croissance des cellules cancéreuses de la vessie ont révélé une réduction de la viabilité des cellules T24 en induisant l'arrêt du cycle cellulaire G1, et ceci a été lié à l'augmentation de l'expression d'un inhibiteur des CDK. D'autres scientifiques ont constaté que le traitement au fucoïdane des cellules tumorales de la vessie humaine 5637 a supprimé la croissance tumorale, et ceci a été aussi confirmé par l'expression de p21WAF1, ainsi que l'inhibition de l'expression de la cycline. De plus, l'induction de l'apoptose par ce polysaccharide a été liée à l'augmentation du rapport Bax/Bcl-2, à la destruction structurelle des membranes mitochondriales et à la libération de Cyt-c (Y. Lin et al., 2020).

Dans les lignées cellulaires de cancer de prostate (PC3), le fucoïdane a régulé positivement l'expression de p21WAF1 et négativement l'expression des protéines liées au cycle cellulaire E2F-1. Il a aussi induit l'apoptose des cellules tumorales (Boo et al., 2013).

Le traitement de cellules d'hépatome humain SMMC-7721 avec du fucoïdane a inhibé la croissance et a induit une apoptose (Y. Lin et al., 2020).

Le schéma de la figure 36 représente les mécanismes des fucoïdanes dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose.



**Figure 36. Mode d'action des fucoïdanes dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose**

Le fucoïdane peut induire le blocage du cycle cellulaire en phases G1/S et G2/M. Il est aussi capable d'induire l'apoptose des cellules tumorales par les voies intrinsèque et extrinsèque (Modifié d'après Senthilkumar et al., 2013).

## VII-2. a) ii- Effets immunomodulateurs

Les études de Xue et al. sur les effets immunomodulateurs du fucoïdane *Fucus evanescens* sur la carcinogénèse mammaire expérimentale induite par le 7,12-diméthyl benz[a]anthracène (DMBA) chez le rat ont montré une baisse de l'incidence des tumeurs et du poids moyen des tumeurs ainsi qu'une prolongation de la latence de la tumeur. En plus, le fucoïdane a baissé le pourcentage des Tregs dans le sérum et l'expression de PD-L1 dans les tissus tumoraux. Ces effets semblent être protecteurs pour améliorer la réponse immunitaire contre la carcinogénèse mammaire (Xue et al., 2017). L'équipe de Teruya et al. ont analysé les effets du LMWF sur l'expression de PD-L1 et PD-L2 dans des lignées cellulaires de fibrosarcome HT1080.

Ils ont montré que le LMWF, même à des concentrations inférieures à 100 µg/mL, baisse la croissance des cellules tumorales et supprime l'expression des deux points de contrôle PD-L1 et PD-L2, sans avoir aucun effet suppresseur significatif sur des lignées cellulaires normales TIG-1 même avec des concentrations élevées de 500 µg/mL. Le LMWF a régulé à la baisse les expressions de l'ARNm, de protéines totale et membranaire de PD-L1 d'une manière proportionnelle en comparant avec les cellules témoins. Ces auteurs ont montré aussi que le LMWF n'interagit pas avec PD-1 ou PD-L1, ce qui suggère que les fucoïdanes pourraient agir sur d'autres protéines de surface et sur les transducteurs intracellulaires impliqués dans l'expression de PD-L1 (Teruya et al., 2019).

La capacité du fucoïdane à réguler l'expression de PD-L1 dans les cellules tumorales semble être une alternative pour le traitement des cancers à forte expression de PD-L1.

#### VII-2. a) iii- Effets inhibiteurs de la métastase, la migration et l'invasion

Des études ont montré que plusieurs fucoïdanes extraits de différentes espèces d'algues brunes (*L. saccharina*, *L. digitata*, *F. serratus*, *F. distichus* et *F. vesiculosus*) ont bloqué l'adhésion des cellules de lignées du carcinome mammaire MDA-MB-231, ce qui pourrait être impliqué dans les métastases tumorales. En plus, d'autres auteurs ont révélé une liaison fucoïdane/fibronectine, capable d'inhiber l'adhésion des cellules MDA-MB-231 à la fibronectine en modulant la réorganisation de la sous-unité  $\alpha 5$  de l'intégrine et en baissant l'expression de vinculine. (Li et al., 2008). Des études ont montré que dans le cas de cellules tumorales de cancer du sein (MDA-MB-231) traitées au fucoïdane, ce dernier est entré dans les cellules, a modifié morphologiquement le cytosquelette et a réorganisé la répartition de la sous-unité de l'intégrine à la surface cellulaire (Liu et al., 2005). Hyeseon et son équipe ont montré que les cellules préostéoblastiques (MC3T3-E1) traitées au fucoïdane (*Undaria pinnatifida*) de 50 à 200 µg/mL se sont rétrécies et devenues arrondies. Ces changements morphologiques ont été cohérents avec la baisse de l'adhésion cellulaire et par conséquent l'augmentation de la migration par rapport aux cellules témoins. La corrélation entre la migration légèrement accrue des cellules et les changements morphologiques, en présence des fucoïdanes, suggèrent l'implication de ces derniers dans la régénération et la reconstruction des os (Hyeseon et al., 2015). Des études sur l'effet anti-métastatique ont montré que le fucoïdane est capable d'arrêter l'invasion des cellules hépatiques cancéreuses. Un autre modèle d'étude des effets du fucoïdane sur les métastases hépatiques est le modèle MH134. Les auteurs ont constaté une grande diminution du nombre de foyers de métastases

hépatiques par comparaison au groupe témoin et du diamètre maximal des métastases hépatiques chez les souris traitées au fucoïdane en comparant au groupe témoin (Y. Lin et al., 2020).

#### VII-2. a) iv- Effets anti-angiogéniques

L'angiogenèse est un processus complexe important dans lequel les facteurs pro-angiogéniques et les inhibiteurs se coordonnent. Si cet équilibre est rompu, le système vasculaire serait incapable de réparer les vaisseaux sanguins altérés. L'angiogenèse implique la différenciation et la migration des cellules endothéliales matures et est régulée notamment par le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF). L'inhibition de l'angiogenèse est un des mécanismes anti-tumoraux du fucoïdane. Ce dernier peut réguler l'expression du VEGF des cellules endothéliales HUVEC et inhiber leur angiogenèse sur matrigel. Le fucoïdane extrait de l'algue brune *Sargassum fusiforme* a inhibé l'angiogenèse des cellules endothéliales microvasculaires humaines de manière dose-dépendante. Un autre groupe de chercheurs a montré que le fucoïdane sursulfaté de *Laminaria japonica* a causé une inhibition significative de l'angiogenèse *in vitro*, alors que celui plus pauvre en sulfate n'a pas pu inhiber la formation de tubes HUVEC (Wang et al., 2019).

#### VII-2. b) Tumeurs liquides

Dans le cas de lignées cellulaires de lymphome humain HS-Sultan, un traitement pour 48h de 10 ou 100 µg/mL du fucoïdane du *Fucus vesiculosus* a inhibé la prolifération cellulaire de manière dose-dépendante, accompagnée d'une augmentation aussi dépendante du pourcentage des cellules dans la phase sub-G1 du cycle cellulaire. Les auteurs ont également montré que le fucoïdane a induit l'apoptose des cellules tumorales avec l'activation de la caspase-3, et une baisse du potentiel mitochondrial dans les cellules HS-Sultan 24 heures après le traitement au fucoïdane. Ceci indique que l'induction de l'apoptose implique la voie mitochondriale (Aisa et al., 2005). D'autres chercheurs ont rapporté une inhibition significative de la croissance des cellules mononucléées du sang périphérique des patients atteints de la leucémie à cellules T de l'adulte et des lignées de cellules T infectées par HTLV-1, sans avoir d'effet sur les cellules mononucléaires du sang périphérique normales. Dans une étude sur un modèle murin, les souris ont pris un régime alimentaire contenant 1% de fucoïdane de Mekabu sur une durée de 10 jours, puis elles ont été inoculées par voie sous-cutanée avec des cellules leucémiques A20. Les animaux ont été nourris avec le régime

contenant du fucoïdane pendant 40 jours et les résultats ont montré un effet inhibiteur des tumeurs de 65,4% (Li et al., 2008).

Yang et al., ont déterminé l'activité anticancéreuse du fucoïdane sur des lignées cellulaires (SUDHL-4, OCI-LY8, NU-DUL-1, TMD8, U2932, et DB) de DLBCL. *In vitro*, le fucoïdane a inhibé la croissance cellulaire de manière dose et temps-dépendante accompagné d'un arrêt du cycle cellulaire G0/G1, une augmentation de l'expression de p21 (transition G1/S) et une baisse des cyclines D1, Cdk4 et Cdk6. Les résultats ont aussi montré que le fucoïdane a induit le clivage des caspases -3, -8 et -9, ainsi que le clivage de PARP. De plus, en présence du fucoïdane, le potentiel transmembranaire mitochondriale a été perdu et le Cyt-c libéré. *In vivo*, dans des modèles murins NOD/SCID injectés des cellules OCI-LY8, l'administration orale de fucoïdane a inhibé la croissance des cellules tumorales. En effet, les souris administrées du fucoïdane ont montré un volume et un poids de tumeur inférieur à celui du groupe témoin. Par contre, le poids corporel des souris n'a pas été différent entre les groupes traités au fucoïdane et les groupes témoins (Yang et al., 2015). Plusieurs recherches ont été menées pour étudier l'effet anti-leucémique du fucoïdane. Le traitement des cellules leucémiques HL-60, NB4 et THP-1 par du fucoïdane a induit l'activation des caspases-3, -8, -9 et a modifié la perméabilité de la membrane mitochondriale. En revanche, le même traitement au fucoïdane n'a pas induit l'apoptose de la lignée cellulaire leucémique K562 (Jin et al., 2010). Dans les cellules U937, les auteurs ont constaté que l'augmentation de l'apoptose est liée à l'hydrolase des caspases et à la libération du Cyt-c des mitochondries au cytoplasme. Dans une étude sur les cellules NB4, le fucoïdane a induit l'apoptose et a augmenté l'expression de p21, WAF1 et CIP1 ce qui a entraîné l'arrêt du cycle cellulaire (Y. Lin et al., 2020).

Le tableau 3 résume les principaux effets des fucoïdanes extraits de différentes algues étudiés sur plusieurs types de cellules tumorales (Tableau 3).

**Tableau 3. Mécanismes d'action des fucoïdanes sur les cellules tumorales**

Mécanismes d'action	Types cellulaires	Algues d'origine	Références
Inhibition de la prolifération cellulaire Arrêt du cycle cellulaire en phase G1 Induction de l'apoptose	Tumeurs solides	Cancer du poumon (lignées : A549 et NSCLC-N6)	Yang et al., 2008
		Cancer du côlon (lignées : HCT116, HT-29 et DLD-1)	Ale et al., 2011
		Cancer du sein (lignées : MCF-7 et T-47D)	Vishchuk et al., 2013
		Cancer ovarien (lignées : SKOV-3, A2780, OVCAR-3, TOV-112D et Caov-3)	Wang et al., 2019
		Cancer de la vessie (lignées : T24, 5637)	Kim et al., 2010
		Cancer de la prostate (lignée : PC3)	Han et al., 2015
		Mélanome (lignées : SK-MEL-28 et B16)	Y. Lin et al. 2020
			Luthulin et al., 2019
	Tumeurs liquides	Lymphome de Burkitt (lignée : HS-Sultan)	Van Weelden et al., 2019
		Leucémie à cellules T	Ermakova et al., 2011
		Leucémie (lignées : A20, HL-60, NB4 et THP-1)	Boo et al., 2013
		DLBCL (ABC: U2932, NU-DUL-1, TMD8 et GCB : SUDHL-4, OCI-LY8, DB)	Aisa et al., 2005
Immunomodulation (Baisse de l'expression relative de PD-L1)	Cancer du sein (modèle murin)	<i>Fucus vesiculosus</i>	Li et al., 2008
	Fibrosarcome (lignée : HT1080)		Jin et al., 2010
Effet anti-métastatique et inhibition de la migration et de l'invasion	Cancer du sein (modèle murin)	<i>Fucus evanescens</i>	Yang et al., 2015
			Xue et al., 2017
	Cancer hépatique (lignée : MH134)	<i>Latissima Saccharina</i>	Teruya et al., 2019
		<i>Laminaria digitata</i>	Liu et al., 2005
Ostéosarcome (lignée : MG63)	<i>Fucus serratus</i>	Li et al., 2008	
	<i>Fucus distichus</i>	Hyeseon et al., 2015	
Effet anti-angiogénique	Cellules endothéliales (lignée : HUVEC)	<i>Fucus vesiculosus</i>	Gupta et al., 2020
		<i>Undaria pinnatifida</i>	Wang et al., 2019

Les fucoïdanes sont les polysaccharides les plus connus à avoir d'autres propriétés que les propriétés thérapeutiques classiques (antivirales, anti-inflammatoires, antitumorales sélectives, anticoagulantes et cytotoxiques) notamment cosméceutiques, pharmaceutiques et diagnostiques. Le fucoïdane a été utilisé comme vecteur de médicaments pour les traitements anticancéreux et les antibiotiques, particulièrement parce qu'il est capable d'améliorer la biodisponibilité et l'efficacité des médicaments dans les formulations pharmaceutiques (nanoparticules, liposomes, microparticules) (Zayed and Ulber, 2020) (Tableau 4).

**Tableau 4. Applications peu courantes et nouvelles des extraits de fucoïdanes de différentes espèces d'algues**

(Modifié d'après Zayed et Ulber, 2020).

	Application	Algue d'origine
Diagnostique	Imagerie de maladies cardiovasculaires	<i>Ascophyllum nodosum</i>
Cosméceutique	Anti-âge	<i>Ecklonia cava</i>
	Éclaircissement de la peau et réduction des taches de vieillesse	<i>Fucus vesiculosus</i>
	Immunité cutanée, apaisement et protection	<i>Undaria pinnatifida</i>
	Reconstruction de la peau	<i>Fucus vesiculosus</i>
Synthèse verte de nanoparticules d'argent		
Pharmaceutique	Comme véhicule pour l'administration de médicaments	<i>Fucus vesiculosus</i>

## VIII- Fucoïdanes et voies de signalisation

Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans la prolifération et la survie des cellules cancéreuses, dont la famille des MAPKs (JNK1/2, ERK1/2 et p38) et la voie PI3K-AKT, avec lesquelles s'entrecroisent les mécanismes d'action des fucoïdanes.

Les études des effets du fucoïdane sur l'apoptose des cellules leucémiques humaines (HL-60, NB4, THP-1 et K562) ont montré que le fucoïdane a augmenté la phosphorylation de ERK1/2 10 à 15 minutes après le traitement ; par contre, après une heure, la phosphorylation est revenue à ses niveaux de base. Le fucoïdane a également augmenté la phosphorylation de JNK 6 heures après le traitement et a été maintenue 24 heures. Cette augmentation a été observée pour trois des lignées cellulaires traitées au fucoïdane, mais pas pour la lignée K562. Par contre, le fucoïdane n'a pas favorisé la phosphorylation de p38 MAPK. Ces données indiquent le rôle important que joue le fucoïdane dans l'activation de ERK1/2 et JNK pour

induire des changements dans les protéines apoptotiques (Jin et al., 2010). L'équipe de Lee et al. a mené des études sur les voies de signalisation influencées par le fucoïdane dans le cas d'une lignée cellulaire de cancer du poumon humain (A549) hautement métastatique. Elle a montré que le fucoïdane a réduit progressivement la phosphorylation de la voie ERK1/2 de manière dose et temps dépendante, mais sans avoir un effet sur p38 et JNK1/2. En plus, le fucoïdane a inhibé la phosphorylation de PI3K et de sa cible en aval, AKT, de manière dose et temps dépendante. La phosphorylation de mTOR a également été inhibée d'une manière dose-dépendante en présence du fucoïdane. Les auteurs ont aussi étudié l'effet des fucoïdane sur NF- $\kappa$ B et le signal de transduction I $\kappa$ B $\alpha$ . En effet, le fucoïdane a inhibé la phosphorylation de I $\kappa$ B $\alpha$  tandis que sa forme totale a été inversement augmenté par le fucoïdane. Dans la même direction, l'indicateur de l'activation de NF- $\kappa$ B par la dégradation des I $\kappa$ B $\alpha$ , phospho p-65 a été diminué par le traitement au fucoïdane, indiquant l'inhibition significative de NF- $\kappa$ B par le fucoïdane dans les cellules A549 (Lee et al., 2012). D'autres études sur les cellules cancéreuses pulmonaires (A549) ont révélé que l'effet anti-métastatique du fucoïdane est dû à son intervention dans les voies ERK1/2 et PI3K-AKT qui régulent les métastases du cancer. En effet, le fucoïdane a inhibé, de manière dépendante de la concentration, la phosphorylation de PI3K-AKT, régulateur en amont de la voie de signalisation mTOR, et aussi la phosphorylation de la voie ERK1/2. Comme l'inhibition de NF- $\kappa$ B et AP-1 (Activating Protein-1) entraîne la suppression de la tumeur et de la métastase, les auteurs ont étudié l'effet du fucoïdane sur ces deux facteurs. Ils ont constaté que le fucoïdane a inhibé la phosphorylation de I $\kappa$ B dans les cellules cancéreuses du poumon A549. De plus, le fucoïdane a supprimé la phosphorylation de ERK et JNK par l'inhibition de la phosphorylation induite par l'EGF de l'EGFR, ce qui a induit par la suite une inhibition de l'activité d'AP-1 (Senthilkumar et al., 2013). Boo et ses collaborateurs ont montré que l'activation de l'apoptose des cellules cancéreuses de prostate (PC-3) par le fucoïdane (*Undaria pinnatifida*) a été médiée par l'activation de la protéine kinase de la voie ERK1/2 qui va à son tour activer les caspases, et de l'inactivation de la p38 MAPK et de la phosphatidylinositol 3-kinase PI3K/AKT (Boo et al., 2013). Des études sur les lignées cellulaires 5637 et T-24 du cancer de la vessie ont montré que le traitement au fucoïdane peut induire l'activation de la signalisation AKT, qui a été inhibée par la suite en présence de la wortmannine, inhibiteur spécifique de PI3K. Lorsque la fonction AKT a été bloquée, l'inhibition de la prolifération cellulaire médiée par le fucoïdane a été inversée ainsi que l'expression accrue de p21WAF1 associée à la phase G1 et la réduction des protéines du cycle cellulaire. L'inhibition de la croissance tumorale a été attribuée à une diminution de l'expression de MMP-9 (Matrix Metalloproteinase-9), médiée par la baisse de l'activité de liaison d'AP-1 et de NF- $\kappa$ B. En plus, le fucoïdane a induit la phosphorylation d'AKT après un

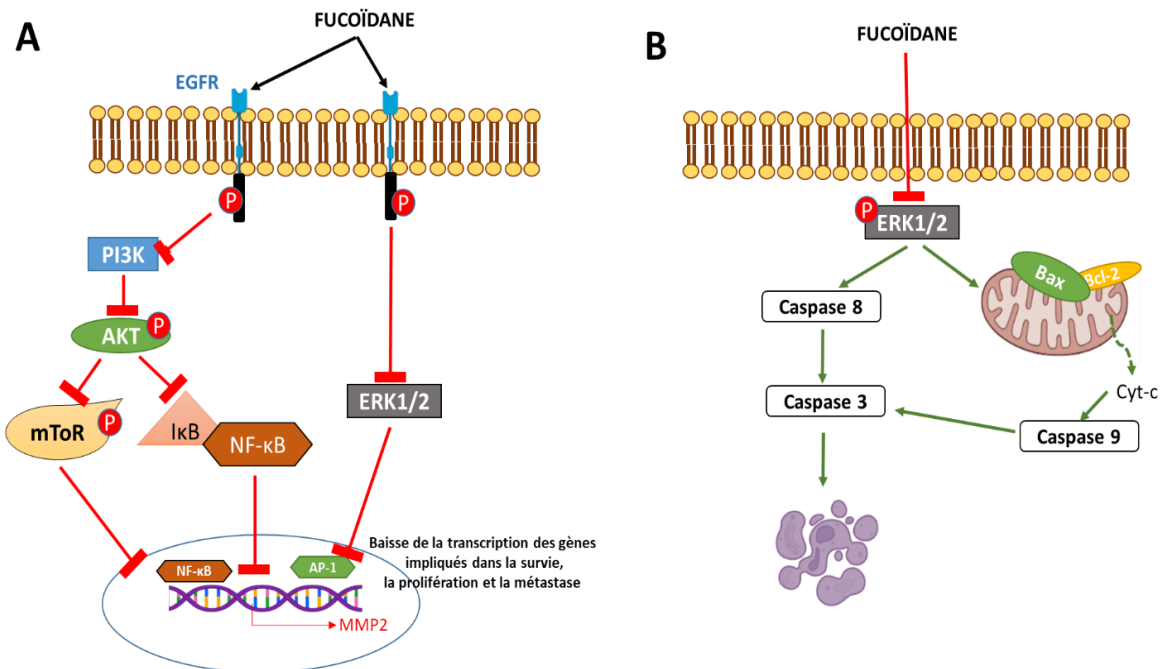


traitement d'une à six heures, et cette phosphorylation a été inhibée en présence de la wortmannine. En revanche, le fucoïdane n'a pas induit la phosphorylation de JNK1/2, ERK1/2 ou p38 dans les cellules 5637 traitées. Ces résultats indiquent que l'activation de la signalisation AKT est impliquée dans l'inhibition de la croissance des cellules tumorales et que le fucoïdane inhibe cette prolifération cellulaire via la phosphorylation de la voie AKT (Cho et al., 2014). L'équipe de Liu et al. a montré dans des études sur des cellules du cancer ovarien humain (SKOV-3, A2780, OVCAR-3, TOV-112D et Caov-3) en comparaison avec des cellules épithéliales ovariennes humaines normales (IOSE80), que les effets antitumoraux du fucoïdane *in vivo* et *in vitro* sont liés à l'inhibition de la voie de signalisation PI3K-AKT. Les auteurs ont découvert que le fucoïdane (100 µg/mL) est capable de réduire significativement l'expression de PI3K et la phosphorylation d'AKT (Liu et al., 2020).

Cependant, dans le cadre des études sur les cellules cancéreuses du côlon humain (HT29), Han et al. ont constaté que le traitement au fucoïdane a activé la voie de signalisation AKT, et que l'inhibition de cette dernière a inversé la diminution de la prolifération cellulaire induite par le fucoïdane. Ces données suggèrent un nouveau mécanisme de la signalisation AKT dans l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses du côlon traitées au fucoïdane (Han et al., 2015).

Park et ses collaborateurs ont étudié le potentiel des fucoïdanes dans le traitement des maladies neurodégénératives accompagnées d'une activation microgliale, médiée par des macrophages cérébraux activés en réponse au stress environnemental et à l'exposition au lipopolysaccharide (LPS). En effet, le fucoïdane a inhibé la translocation de la sous-unité NF-κB p65 du cytosol vers le noyau, induite par l'exposition au LPS. Comme la molécule de signalisation AKT est capable de déclencher l'activation de NF-κB, les auteurs ont montré que la phosphorylation d'AKT, augmentée après la stimulation par le LPS, a été bloquée significativement avec un prétraitement au fucoïdane. Le LPS active aussi rapidement les phospho-MAPKs (p38, ERK et JNK). Cependant, le prétraitement au fucoïdane a pu inhiber la phosphorylation de p38, ERK et JNK dans la microglie BV2 stimulée par le LPS. Cette étude suggère que le fucoïdane peut empêcher la production de médiateurs pro-inflammatoires en perturbant les principales voies de transduction du signal activées par le LPS dans la microglie BV2 (H. Y. Park et al., 2011). Des études ont montré que dans les macrophages M2, le fucoïdane est capable d'inhiber la migration des cellules tumorales et le recrutement des lymphocytes en supprimant une chimiokine de type M2 CCL22. Ce mécanisme est possible grâce à l'inhibition de la phosphorylation de p65-NF-κB par le fucoïdane, annonçant un rôle prometteur de ce polysaccharide dans l'immunothérapie tumorale (Sun et al., 2016).

La figure 37 représente le mode d'action des fucoïdanes sur la prolifération, la métastase et l'apoptose des cellules tumorales impliquant différentes voies de signalisation.



**Figure 37. Mécanismes soulignant les propriétés (A) antiprolifératives, anti-métastatiques et (B) pro-apoptotiques des fucoïdanes dans les cellules tumorales.**

## IX- Recherche clinique

### IX-1. Immunothérapie

Yang et al. ont montré dans des études sur un modèle de mélanome murin, que lorsque le fucoïdane est présent dans un régime alimentaire, il est capable d'améliorer les activités antitumorales des anticorps anti-PD-1. En revanche, son administration tout seul n'a pas montré d'effet antiprolifératif et apoptotique sur les cellules de mélanome *in vitro*, et n'a également pas inhibé la croissance tumorale du mélanome *in vivo*. Ces données montrent la synergie entre le fucoïdane et anti-PD-1 pour bloquer la croissance tumorale et participer à la modulation de la réponse immunitaire. En effet, le fucoïdane est connu pour favoriser l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> infiltrant la tumeur, soutenant les synergies avec l'immunothérapie. Ces travaux annoncent le rôle prometteur de ce complément alimentaire lorsqu'il est combiné à des immunothérapies dans les cancers (J. Yang et al., 2021).

## IX-2. Co-traitement avec les fucoïdanes

En comparant avec les médicaments synthétisés chimiquement, le fucoïdane fait partie des extraits naturels qui ont gagné beaucoup d'intérêt dans les dernières années, en raison de leur activité biologique élevée, de leur diversification de sources et de leurs faibles effets secondaires. Plusieurs études confirment leur utilisation comme drogues antitumorales ou comme adjuvant aux thérapies actuelles.

Des études *in vivo* sur les activités antitumorales et antimétastatiques du fucoïdane (*Fucus evanescens*) dans le cas d'adénocarcinome pulmonaire de Lewis, ont montré qu'après administration unique et répétée de fucoïdane à 10 mg/kg de poids corporel à des souris C57Bl/6, une modération des effets antitumoraux et antimétastatiques a été observée, accompagnée d'une potentialisation des activités antimétastatiques, mais pas antitumorales, du cyclophosphamide. L'injection unique avec augmentation de la dose de fucoïdane jusqu'à 25 mg/kg de poids corporel a potentialisé l'effet toxique du cyclophosphamide (Li et al., 2008). Dans une étude sur des DLBCLs, ces dernières ont été traitées avec des combinaisons de fucoïdane et de plusieurs agents chimiothérapeutiques couramment utilisés pour traiter le DLBCL. Le fucoïdane a potentialisé les activités du carfilzomib dans la destruction des cellules tumorales. Par contre, il n'a pas amélioré l'efficacité du cyclophosphamide, de la doxorubicine, de la vincristine, de la prednisone ou du vorinostat. En plus, la combinaison du carfilzomib et de fucoïdane a augmenté la cytotoxicité des cellules DLBCL. L'ajout du fucoïdane avant, avec ou après l'ajout de carfilzomib n'a montré aucune différence significative (Yang et al., 2015). Les résultats sur des souris C57 transplantées de cellules LLC-1 ont montré une plus grande efficacité de la combinaison de cisplatine et de fucoïdane pour la répression du volume tumoral en comparaison avec son utilisation seule (Y. Lin et al., 2020). Vishchuk et ses collaborateurs ont révélé, dans leur étude sur la lignée cellulaire de cancer du côlon humain HCT116, que le fucoïdane (*Saccharina cichorioides*) a amélioré l'activité antiproliférative du resvératrol à des doses non toxiques et a facilité l'apoptose induite par le resvératrol. En effet, la pré-incubation de cellules HCT116 avec du fucoïdane (200 µg/mL) pendant 24h a baissé le nombre et la taille des colonies HCT116 par la sensibilisation des cellules tumorales au resvératrol. Cette inhibition a été supérieure à l'effet de l'un ou l'autre agent seul, et même à l'effet de la combinaison des deux agents en même temps. Ces données suggèrent que la combinaison du fucoïdane avec le resvératrol peut être une thérapie potentielle contre le cancer du côlon humain (Vishchuk et al., 2013).

# **Résultats**



Le chapitre bibliographique nous a permis de présenter le virus de l'EBV et son cycle biologique, ainsi que de caractériser particulièrement les cellules B en latence III de l'EBV (programme de prolifération cellulaire). Nous avons également mis en évidence l'échappement au contrôle par système immunitaire des cellules infectées, ce qui peut conduire à l'émergence et au développement de tumeurs associées à l'EBV, en particulier *via* le rôle des CMH et des points de contrôle immuns inhibiteurs. Enfin, nous avons présenté les fucoïdanes, qui sont des polysaccharides sulfatés possédant de nombreuses activités biologiques, dont des fonctions immunomodulatrices, en particulier lorsqu'ils sont de bas poids moléculaire.

Afin de mieux comprendre les processus d'émergence de lymphomes et de lymphoproliférations associés au virus, il est en particulier important de caractériser les lymphocytes B en latence III de l'EBV. Durant ce programme tous les gènes de latence sont exprimés. Certaines protéines, fortement immunogènes, permettent normalement au système immunitaire des individus immunocompétents d'éliminer et de contrôler la prolifération des cellules infectées grâce notamment aux réponses immunes innée et adaptative mettant fortement en jeu les cellules NK activées et les lymphocytes T cytotoxiques. Ceci permet d'établir un équilibre hôte/virus durant toute la vie de l'individu. Cet équilibre peut être rompu dans le cas de déficits immunitaires, ce qui ne permet plus d'éliminer les lymphocytes B en latence III de l'EBV qui vont se multiplier et conduire à l'émergence de lymphomes. Il peut également être rompu chez des individus immunocompétents ce qui pose la question de leur échappement à la surveillance du système immunitaire mais également des thérapies permettant de restaurer la réponse immune.

L'équipe 2MB2C (Molecular Mechanisms of B Cell Cancerogenesis) du laboratoire UMR CNRS 7276 INSERM 1262 CRIBL (Contrôle de la Réponse Immune B et Lymphoproliférations) s'intéresse depuis plusieurs années au rôle de l'EBV dans les mécanismes de lymphomagenèse. Il a en particulier été mis en évidence la surexpression du point de contrôle immunitaire inhibiteur PD-L1 à la surface des lymphocytes B en latence III de l'EBV et son rôle dans l'inhibition de la réponse T anti-tumorale par mimétisme des cellules B régulatrices (production de cytokine immunosuppressives, expansion de Treg anergiques et inhibition de la prolifération des T effecteurs) (Auclair et al., 2019; Durand-Panteix et al., 2012). Un traitement proposé pour la restauration de la réponse immune dans le cas de cellules surexprimant PD-L1 est l'immunothérapie. Cependant, en raison des limitations de cette dernière et des défis pour en éviter les effets toxiques, de nouvelles stratégies nécessitent d'être explorées, tels que le développement d'adjuvants permettant de baisser le niveau

d'expression de PD-L1 avant les traitements par immunothérapie. Une molécule candidate est le fucoïdane, pour lequel une baisse de l'expression transcriptionnelle de PD-L1 a été rapportée dans la littérature.

La question générale posée pour ma thèse porte sur les points de contrôle immuns inhibiteurs des réponses immunes T et NK exprimés par les lymphocytes B en latence III de l'EBV et sur l'effet des fucoïdanes sur leur expression, en particulier PD-L1.

Dans le cadre de notre collaboration avec le laboratoire LIENSs (UMR 7266, La Rochelle), notre intérêt a porté sur deux formules originales d'oligosaccharides de fucoïdanes de très bas poids moléculaire vLMW-F (very Low Molecular Weight) : F1 et F2. Très peu de travaux publiés jusqu'à présent concernent l'effet des fucoïdanes (natif ou de bas poids moléculaire) sur les tumeurs liquides et très peu de données existent sur les mécanismes moléculaires mis en jeu en amont des effets observés.

La première partie de ce chapitre (**Résultats I**) consiste en un article scientifique soumis dans *Journal of Clinical Immunology*. Son objectif est d'étudier *in vitro* les effets des deux formules de vLMW-F, par comparaison à la forme native, sur la prolifération, l'apoptose et l'expression de PD-L1 chez des cellules de lymphomes B, ainsi que les mécanismes moléculaires mis en jeu. L'étude porte sur les lymphocytes B en latence III de l'EBV mais également sur des cellules de DLBCL (Diffuse Large B Cell Lymphoma), ce qui permet d'élargir notre étude à un autre modèle de lymphome B.

Les DLBCLs sont un type courant de lymphomes B, caractérisés par un envahissement ganglionnaire de cellules B anormalement grandes (environ le double d'un lymphocyte normal). La structure du ganglion est dénaturée par un envahissement qualifié de « diffus ». Les cellules de DLBCL expriment les marqueurs des cellules B (CD19, CD20, CD22 et CD79A), ainsi que le marqueur de prolifération Ki67 et peuvent surexprimer PD-L1. Deux sous-types moléculaires sont décrits : le sous-type GCB (Germinal Center B-cell like) et le sous-type ABC (Activated B-Cell like). Le sous-type GCB représente environ 60% des cas, les cellules ont un profil d'expression génique proche des cellules du centre germinatif (site de prolifération et d'hypermutation somatique). Le sous-type ABC, de moins bon diagnostic, représente environ 30% des cas et est caractérisé par un profil d'expression génique de type post-centre germinatif proche de celui des lymphocytes B périphériques activés, avec activation constitutive du BCR (B-cell receptor) et de la voie NF- $\kappa$ B. Dans ce sous-type, la mutation MYD88 L265P est retrouvée dans environ 30% des cas (Susanibar-Adaniya and Barta, 2021). Environ 10% des DLBCL ne sont pas classées.

Cette première partie de résultats est suivie d'une conclusion en français reprenant les différents points clés et faisant le lien avec la seconde partie des résultats.

La partie **Résultats II** consiste en la caractérisation des lymphocytes B en latence III de l'EBV par rapport à l'expression de molécules pouvant intervenir dans l'inhibition des réponses antitumorales T et NK : CMH de classe I et II et points de contrôles immuns. Les points de contrôles choisis pour l'étude sont ceux pour lesquels il existe des immunothérapies de routine ou en cours de développement. Nous avons également étudié l'effet des vLMW-F sur l'expression des points de contrôle trouvés comme étant surexprimés.





# Résultats I : Article scientifique

---



**Anti-proliferative and pro-apoptotic vLMW fucoidan formulas decrease PD-L1 surface expression in EBV latency III and DLBCL tumoral B-cells by decreasing actin network**

Saliba Jennifer <sup>1</sup>, Manseur Chanez <sup>2</sup>, Groult Hugo <sup>2</sup>, Akil Hussein <sup>1</sup>, Tannoury Mona <sup>3</sup>, Troutaud Danielle <sup>1</sup>, Maugard Thierry <sup>2</sup>, Feuillard Jean <sup>1,4</sup>, Arnaud Ingrid <sup>2</sup> and Jayat-Vignoles Chantal<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UMR CNRS 7276, INSERM 1262, Laboratoire CRIBL, Faculté de Médecine, Université de Limoges, France

<sup>2</sup> UMR CNRS 7266, Laboratoire LIENSs, Université de La Rochelle, France

<sup>3</sup> Faculté des Sciences II, Université Libanaise, Liban

<sup>4</sup> Laboratoire d'Hématologie, CHU Dupuytren, 2 Avenue Martin Luther King, 87042 Limoges Cedex, France

**Corresponding author:** Chantal Jayat-Vignoles

E-mail: [chantal.vignoles@unilim.fr](mailto:chantal.vignoles@unilim.fr)

Tel: 33 (0) 5 19 56 42 21; Fax: 33 (0) 5 55 43 58 97

**Abstract**

The Epstein Barr virus (EBV) infects 95% of world's population and persists latently in the body. It has the ability to immortalize B cells and is associated with lymphomas. We have shown that LCLs (Lymphoblastoid Cell Lines, EBV latency III B-cells) inhibit the anti-tumor T-cell response. They overexpress the immune checkpoint PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1) responsible for effector T-cell inhibition, through the PD-L1/PD-1 interaction. PD-L1 is expressed by many cancer cells including EBV associated and DLBCLs (Diffuse Large B Cell Lymphomas) B lymphomas. It is often targeted in immunotherapies. Thus, most of the immunotherapy approaches propose inhibitors to limit the PD-L1/PD-1 interactions. Here we aim to find new strategies to improve immunotherapy efficacy by decreasing PD-L1 expression. Interestingly, fucoidan, a polysaccharide extracted from brown seaweed, exhibited immunomodulatory and anti-tumor activities, depending mainly on their polymerization degree. If many data have been reported on their effect against solid tumors, very few data have been reported on lymphoma cells or on immune checkpoints. Three LCLs and four DLBCLs were treated with native fucoidan or with original very Low Molecular Weight Fucoidan formulas (vLMW-F). We observed a cell proliferation decrease and apoptosis induction with the vLMW-F and no toxicity on normal B-cells and T-cells. We also highlighted a transcriptional and cell surface PD-L1 decrease of viable cells more efficient for vLMW-F than for the native form. This result is explained by actin network alteration, suggesting a lower fusion of secretory vesicles carrying PD-L1 with the plasma membrane. Altogether, we demonstrated that vLMW-F could be a potential adjuvant to immunotherapy, due to its anti-proliferative and proapoptotic effects and its ability to decrease PD-L1 membrane expression.

**Keywords: PD-L1, fucoidan, vLMW-F, EBV latency III, DLBCLs, actin network**

## Introduction

The EBV is an oncogenic virus that infects about 95% of worldwide adult population. After the primo-infection, it remains hidden in the nucleus of memory B cells, resulting in a life-long persistent infection. During infection, including transient reactivation, some infected B cells enter the lytic cycle or the EBV latency III program (also called proliferation program), with transcription of the full range of latent genes [1]. In immunocompetent host, the balance established between the immune system and the virus avoids the development of cancers. However, a rupture in the equilibrium can occur causing EBV lymphoproliferative disorders, such as Hodgkin lymphomas (HL), Burkitt lymphomas (BL) or DLBCLs [2] which is the most common of the non-Hodgkin lymphomas. This aggressive tumor affects B-lymphocytes and have two major biologically distinct subtypes: Germinal Center B-cell (GCB) and Activated B-Cell (ABC) [3]. ABC-DLBCL is associated with the worse outcomes when treated with chemotherapy, the standard care used in clinic for this pathology.

Inhibitory immune checkpoints exert inhibitory effects on the adaptive and innate immune systems. They are crucial for self-tolerance but also mediate the immune evasion of cancer cells, contributing to tumor emergence and development [4]. PD-L1 (also known as B7-H1 or CD274) is expressed on a sizeable fraction of tumor types and is one of the most critical [5]. It can interact with its receptor PD-1, which is expressed on numerous cells involved in the anti-tumor response (such as activated T cells, dendritic cells or NK cells) and leads to inhibitory signals [6]. We have previously shown that PD-L1 is also overexpressed on EBV latency III B-cells and strongly inhibit the anti-tumoral T-cell response in an autologous B/T model; the expansion of anergic conventional and unconventional CD4<sup>+</sup> Tregs (Regulatory T-cells) leads to the inhibition of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> effector T-cells proliferation [7]. PD-L1/PD-1 axis is also critical for numerous B-cell lymphomas, such as HL and non-Hodgkin lymphomas, am

ong them follicular lymphoma and DLBCL (which variably express PD-L1) [8,9]. PD-L1 overexpression in many cancer types and the strong immune response inhibition following interaction with PD-1, have led to the development of anti-PD-L1 and anti-PD-1 immunotherapies to block the PD-L1/PD-1 axis and restore immune response [10,11]. However, immune checkpoint inhibitors have some limitations since tolerance breakdown is not limited to the tumor; related adverse events can affect multiple organ systems (gut, skin, endocrine glands, liver or lung) [12–14]. While keeping the advantage of immunotherapy, new therapeutic strategies can be considered, such as the use of adjuvants capable of decreasing PD-L1 membrane expression and consequently lowering antibody doses [15].

Fucoidans are a non-allergenic, non-irritating, biodegradable and biocompatible sulfated fucose-based polysaccharides constituents of brown seaweeds [16,17]. Extracts from *Fucus vesiculosus* algae are approved by FDA (Food and Drug Administration) as GRAS (Generally Recognized As Safe). In Europe, preparations that contain fucoidans are registered by EMA (European Medicines Agency) for use as an ingredient in food categories [17,18]. Numerous studies report bioactive properties with health benefits, predominantly dependent on the natural source, extraction method, sulfate groups content and molecular weight of the polysaccharide. For instance, fucoidans possess antioxidant, anticoagulant, anti-pathogens and anti-inflammatory activities [19–21]. They also exhibit *in vitro* and *in vivo* anticancer properties, almost exclusively studied on solid tumor cells (colon, breast, lung, bladder, hepatoma or melanoma). Mechanisms of action described are generally cell cycle arrest, apoptosis, anti-metastatic effects and stimulation of macrophages, T-cells and NK cells. Nevertheless, scarce studies raise a decrease in the PD-L1 checkpoint [22,23], which can be consistent with the fact that fucoidan impairs pathways responsible for PD-L1 expression: PI3k/AKT, NF- $\kappa$ B or RAS/ERK1/2 [24–29]. Fucoidan extracts can also protect against side effects associated with

chemotherapeutic drugs and radiation-induced damages [16,30]. As suggested by some authors who evaluated pre-clinical safety of fucoidan extracts [31], they may become an appropriate and natural anticancer therapeutic as an adjunctive antitumor drug. However, more information is needed, in particular in the field of hematological malignancies and immune checkpoints, such as PD-L1, which is the overall objective in this study. We evaluated the opportunity to use vLMW-F to decrease PD-L1 membrane expression and associated molecular mechanisms.

## Materials and methods

### Fucoidan samples

Native fucoidan of *Fucus vesiculosus* was obtained from Sigma-Aldrich. Original formulas were depolymerized by our collaborators from LIENSs laboratory (UMR CNRS 7266, Université de La Rochelle, France) from the native fucoidan using a radical H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-based hydrolysis method, previously published with other types of polysaccharides (32). Briefly, native fucoidan was dissolved in Milli-Q water (25 mg/mL), and then the solution was purged with argon and heated until 60°C. The addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (Sigma-Aldrich) at a weight/weight ratio of 0.5 and 1.5 resulted in the production of two different vLMW-F fractions, named F1 and F2, respectively after 96h and 72h of depolymerization. The chromatographic profile shows that F1 and F2 fractions are practically eluted at the same time and after the native fucoidan, which attest that the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-based hydrolysis reaction worked well (**Fig. S1**). The number-average molecular weights (M<sub>n</sub>), degree of polymerization (DP) and polydispersity index (I) were estimated by SEC-HPLC according procedures already published [32], using a calibrant curves made of pullulans standards (Polymer Standards Service GmbH, Mainz, Germany) for native fucoidan and heparin standards (Iduron, UK) for F1 and F2



fractions. Degree of sulfation (DS) was calculated by an Azure A based-colorimetric assay (Sigma-Aldrich) according to a state-of-the-art technique. Results of these characterizations are summarized in **Table 1**.

**Table 1 Characteristics of native fucoidan and vLMW-F (F1 and F2)**

Number-average molecular weights (Mn), degree of polymerization (DP), polydispersity index (I) and degree of sulfation (DS)

\*: calculated with Pullulans standards. \*\*: calculated with Heparin standards.

Sample	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (w/w)	Time (h)	Mn (Da)	DP	I	DS (% SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )
Native fucoidan	0	0	66744*	240.5*	1.4*	41.5 ± 0.7
F1 fraction	0.5	96	604**	3.5**	1.3**	6.0 ± 1.0
F2 fraction	1.5	72	562**	3.4**	1.1**	2.1 ± 0.4

As shown in **Table 1**, the F1 and F2 fractions contain a mixture of different fucoidan-derived compounds with similar very low mean DP between 3.4 and 3.5, but are distinct by their mean sulfation degree, 6% against 2.1%, respectively. Further LC-MS (data not shown) confirmed that these fractions contain predominantly di and tri-oligofucoidan with interestingly several unsaturated species.

### Cell culture conditions

Lymphoblastoid cell lines (LCLs - J1209, C0401, C1504) were established and characterized by the Genethon (Evry, France). They were cultured in RPMI 1640 medium (Eurobio Scientific) supplemented with 10% decompemented FBS (PAN<sup>TM</sup> Biotech). Amino acids, vitamins, sodium pyruvate, penicillin/streptomycin and 2mM L-glutamine were added at 1X concentrations from 100X stock solutions (all from Gibco, Thermofisher). Four cell lines of DLBCLs: two ABC subtypes (U2932 and OCILy10) and two GCB subtypes (SUDHL4 and SUDHL6) were cultured in the RPMI 1640 medium supplemented with 10% decompemented FBS, pyruvate (1X), Penicillin/Streptomycin (1X), L-glutamine (1X) and 10 mM of HEPES

buffer solution (Gibco Thermofisher). All cell lines were maintained at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and were mycoplasma free (MycoAlert Mycoplasma Detection Kit). Samples from healthy subjects were obtained from the University Hospital Center of Limoges after their informed consent.

### **Cell cycle analysis**

LCLs and DLBCLs cells were seeded in plates ( $5 \times 10^5$  cells/well) for 24h, then treated with 100µg/mL of native fucoidan or F1/F2 fractions. After 48h, cells were collected, washed twice in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS – Eurobio Scientific) and fixed with ice-cold 70% ethanol overnight. For Propidium Iodide (PI – Sigma Life Sciences) staining, fixed cells were washed twice with cold DPBS and incubated in 30µL of RNase working solution (10mg/mL) and 1 mL cold DPBS for 20 min at room temperature (RT). Then samples were stained with PI and analyzed using a BD FACSCalibur flow cytometer and Kaluza Analysis 2.1 Software (Beckman Coulter).

### **Apoptosis Analysis**

We followed the same protocol of seeding and treatments as described above for the cell cycle analysis. LCLs and DLBCLs ( $5 \times 10^5$  cells/well) cells were collected and washed with DPBS containing Ca<sup>2+</sup>. Then they were stained with Annexin V-FITC (Biolegend) and PI (5µg/mL) for 15 min, in the dark, at RT. Stained cells were analyzed using a BD FACSCalibur flow cytometer and Kaluza Analysis 2.1 Software.

### **Isolation of healthy PBMC and cell subtypes (B and T-cells) for apoptosis assay**

Isolated Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) from healthy donors were obtained after written consent and were issued from the cell biological collection of the Tissue and Cell bank CRBioLim of the Limoges Hospital University Center, this cell collection being declared

to and authorized by the French Health Ministry with the session n° “AC-2021-4790” according to the French law. PBMCs were isolated from leukocyte buffy coats by lymphocyte medium separation (MSL, Eurobio Scientific) density gradient centrifugation. T-cells were purified from PBMC by CD3/CD4 EasySep™ Human T cell isolation kit (STEMCELL Technologies) according to the manufacturer’s instructions. Activated T lymphocytes were obtained using T-cell activation/expansion kit (Anti-Biotin MACSiBead Particles and biotinylated antibodies against human CD2, CD3 and CD28) according to the manufacturer’s protocol (Miltenyi Biotec). All cell subtypes were seeded in plates ( $5 \times 10^5$  cells/well), and after 24h, were treated or not, with 100µg/mL of native fucoidan or vLMW-F. After 48h, Annexin V/PI staining was performed for cell apoptosis analysis as described above, for all cells groups. For flow cytometry analysis, B-cells were identified from mononuclear cells by staining with anti-CD19 (APC) conjugated antibody (Biolegend). The different antibodies and conjugated fluorochromes, as well as final dilutions are listed in **Table S1**.

### **RNA extraction, Reverse Transcriptase and Real-time quantitative PCR**

Total RNA was extracted using TRIZOL reagent (Life Technologies) from  $10^6$  LCLs and DLBCLs cells treated or not. Total RNA (1µg) was reverse transcribed using the High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer’s instructions, with 20µL of final reaction volume. Quantitative mRNA relative expression of PD-L1 was performed in triplicate, with 50 ng cDNA, using the Taqman Assay Gene Expression system of PD-L1 (Hs01125296\_m1) or GAPDH - internal control - (Hs02758991\_g1) (both from Thermofisher Scientific) with SensiFast Probe HiRox Mix (Bioline), on a Quant Studio3 cycler. Each quantitative PCR was performed in triplicate. The expression level of each gene was normalized to the GAPDH expression level. The calculated relative mRNA expression level was equal to  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

### Western blot analysis

Control or treated groups were dry pelleted after 48h of treatment, and lysed with equal volumes of 1X lysis buffer (1 mM PMSF and 1X protease Inhibitor Cocktail) on ice for 30 min. Then, they were sonicated and centrifuged at 18000G for 20 min at 4°C. Protein concentrations were determined by Bradford protein assay. Equal amounts of proteins (30µg) were separated by 12% SDS PAGE gel electrophoresis, and then transferred to PVDF membranes that were blocked in PBS 5% BSA containing 0.1% Tween 20 at room temperature for 1h. Afterward, the membranes were incubated with primary antibodies against PD-L1 (1:200) (Santa Cruz: Biotechnology) or  $\alpha$ -tubulin (1:5000) (Cell Signaling) overnight at 4°C. The next day, membranes were washed (PBS-0.1% Tween) and incubated with HRP-secondary antibody (1:5000) at room temperature for 1h. After washing, the protein bands were detected with a chemiluminescence detection system (ChemiDoc™ Touch Gel Imaging System - Bio-Rad Laboratories), which were quantified and numerated using Fiji software (Rasband, W.S., ImageJ).

### PD-L1 expression analysis: immunofluorescent staining and flow cytometry

For surface labeling, the same protocol of seeding and treatment as described above for the cell cycle analysis was followed. LCLs and DLBCLs cells were collected and washed with DPBS. Then, they were labeled for 15 min in the dark at RT with anti-PD-L1-PE (Biolegend) (**Table S1**). Intracellular PD-L1 staining was performed on LCLs and DLBCLs cells treated with native fucoidan or F1/F2 fractions, using the IntraPrep Permeabilization Reagent kit (Beckman Coulter), according to the protocol recommended by the supplier. Acquisitions were performed on FACSCalibur. Results were analyzed with Kaluza Analysis 2.1 Software. Fold change was

calculated based on the mean fluorescence intensity ratio of PD-L1 on its isotypic control, normalized to the control (untreated cells).

### **F-actin cytoskeleton immunofluorescence**

Following the same experimental protocol of treatment as described above, LCLs and DLBCLs cells were collected and washed with DPBS. After washing, they were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min at RT and washed with DPBS. Actin fibers were revealed using 405-Phalloidin-iFluor reagent (Abcam) as per the manufacturer's instructions.

Finally, after 30 min of phalloidin incubation, nuclei were stained with TOPRO-3 (1:1000 – Fisher scientific) for 15 min at RT. Cells were visualized using a ZEISS LSM 900 Confocal microscope (40×oil lens). Images were constructed using the Fiji software. For actin quantification by flow cytometry, the same experimental protocol was followed. Intracellular actin fibers labeling (45 min of phalloidin staining) was performed after permeabilization (IntraPrep Permeabilization Reagent kit - Beckman Coulter), according to the protocol recommended by the supplier. Acquisitions were performed on the Cytoflex cytometer (Beckman Coulter). Results were analyzed with Kaluza Analysis 2.1 Software. Fold change was calculated based on the mean fluorescence intensity ratio of phalloidin, normalized to the control.

### **Statistical analysis**

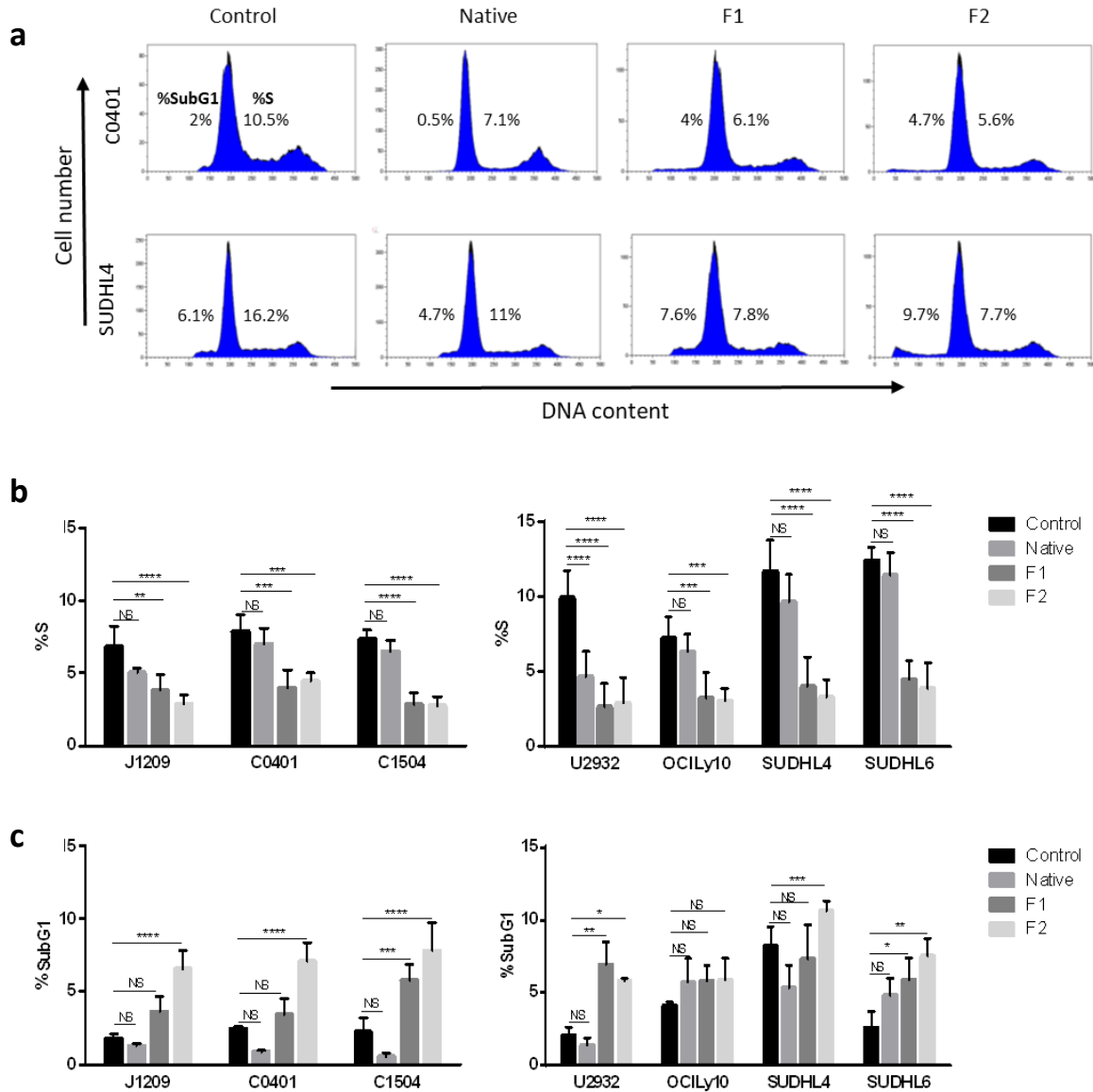
One-way or Two-way analysis of variance (ANOVA) and t-test were performed to identify significant differences between the control and experimental groups. All experimental data were acquired from at least three independent experiments. All statistical analysis was

performed with GraphPad Prism 6.05 for Windows. A probability (p) value of <0.05 was considered statistically significant.

## Results

### Proliferation inhibition and apoptosis induction of tumoral B-cells

Anti-cancer properties of fucoidan (mainly with extracted fucoidan of high molecular weight) were almost exclusively studied on solid tumors and emphasized anti-proliferative and pro-apoptotic events [33]. In order to confirm this role on lymphoma B-cells, we performed cell cycle analysis by flow cytometry on EBV latency III B cells (3 LCLs) and DLBCL cells (two ABC: U2932 and OCILy10 and two GCB: SUDHL4 and SUDHL6 cell lines), treated with the native or the vLMW-F formulas F1 and F2. Estimation of the cell population percentage in the different phases of the cell cycle highlighted a significant decrease in S phase after treatment with the vLMW-F formulas, in contrast to the native form (**Fig. 1a and 1b**). This was consistent with an inhibition of cell proliferation. A significant increase of the subG1 peak on DNA content histograms (subsequent to the fragmentation of nuclear DNA in late apoptosis) was also sometimes observed, depending on the cell types, for the treatment by the vLMW-F formulas, especially F2 (**Fig. 1c**).



**Fig. 1 vLMW-F decrease the percentage of LCLs and DLBCLs cells in S-phase**

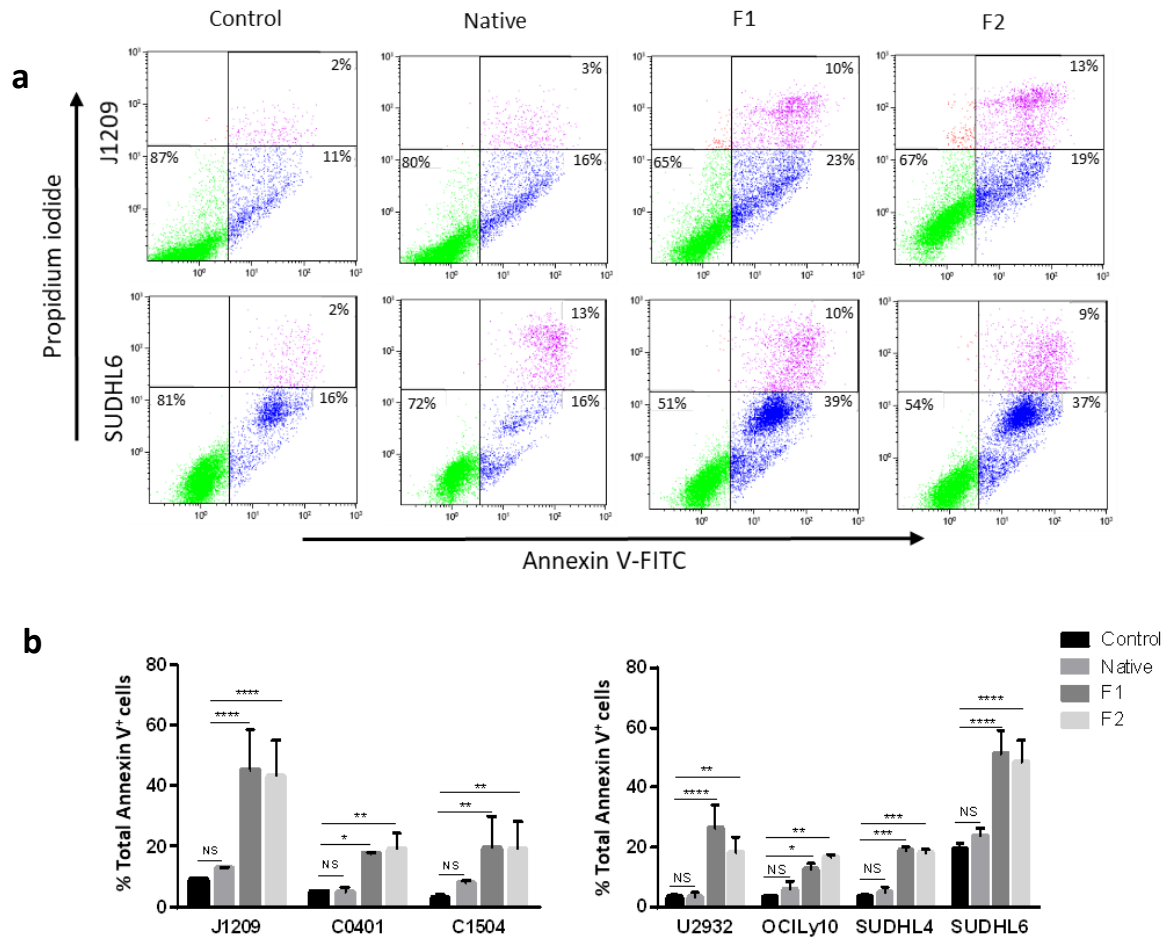
LCLs (J1209, C0401, C1504) and DLBCLs (U2932, OCILy10, SUDHL4, SUDHL6) cells were treated or not (control) with 100µg/mL of native fucoidan or vLMW-F (F1 and F2) for 48h. Flow cytometry analysis were performed to determine cell-cycle distribution in all tested conditions. Results were obtained from three independent experiments.

(a) Examples of cell cycle profiles for C0401 (LCL) and SUDHL4 (DLBCL). (b) Percentage of LCLs or DLBCLs cells in S-phase: fewer cells are in S-phase after 48h treatment of 100 µg/mL vLMW-F in contrast with the native form, and compared to the control. (c) Percentage of LCLs or DLBCLs cells in SubG1 phase: the increase of cell percentage in SubG1 phase occasionally observed suggests an apoptosis induction.

NS: Not significant; \* p< 0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001.

To refine the apoptotic response, we evaluated the percentage of apoptotic cells, from early to late stages, for the same cell lines and in the same treatment conditions. Annexin-V binding to externalized phosphatidylserine revealed apoptosis induction only with the two vLMW-F (**Fig. 2**). The importance of the process depended on the cell lines (up to 50% for J1209 and SUDHL6) and was similar for the two fractions. Our results emphasized that, unlike the native form, vLMW-F formulas possess anti-proliferative and pro-apoptotic properties for EBV latency III and DLBCL tumoral cells at the tested dose. This suggests a better cytotoxic effect for the vLMW-F. We verified that toxicity (viability and apoptosis) was due to the formulas and not to L-Fucose, since it is the smallest subunit of fucoidan skeleton (**Fig. S2**).





**Fig. 2 vLMW-F induce apoptosis in LCLs and DLBCLs**

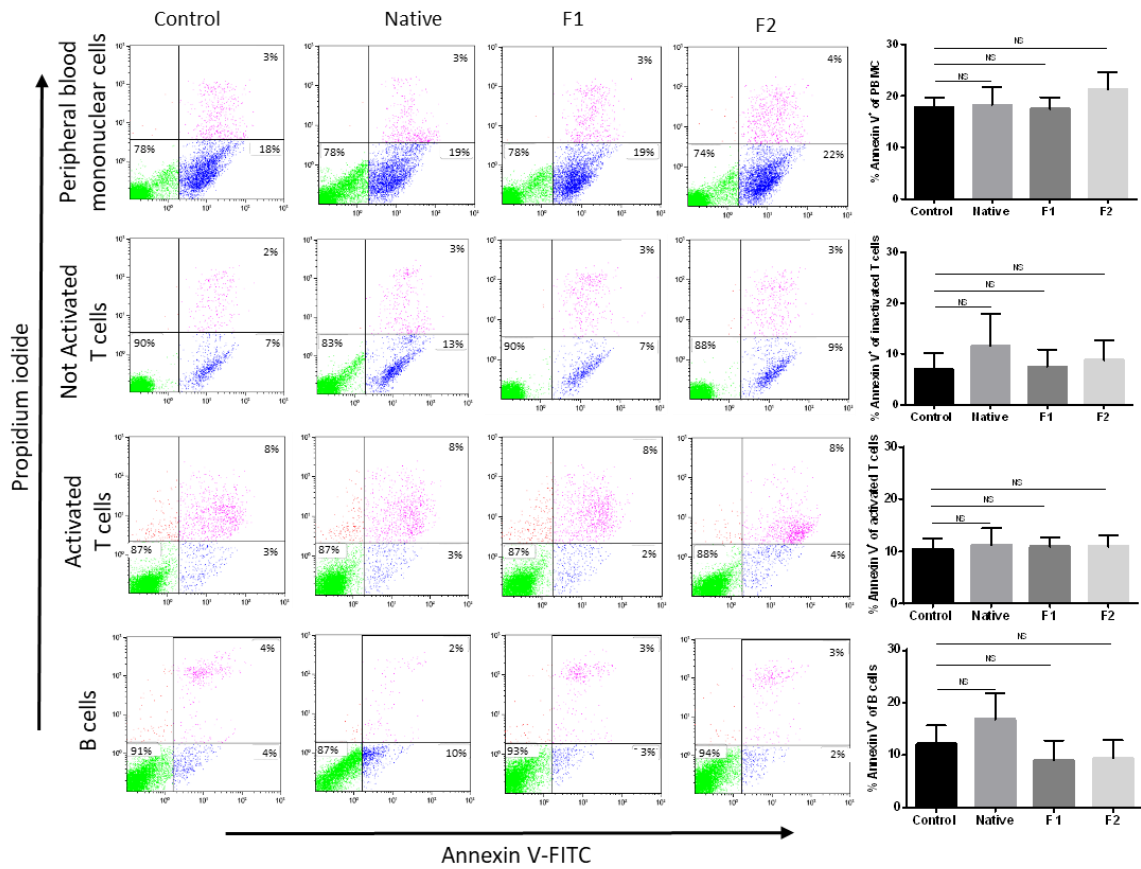
LCLs (J1209, C0401, C1504) and DLBCLs (U2932, OCILy10, SUDHL4, SUDHL6) cells were treated or not (control) with 100µg/mL of native fucoidan or vLMW-F (F1 and F2) for 48h, followed by apoptosis analysis (Annexin V/PI staining) by flow cytometry. Results were obtained from three independent experiments.

(a) Examples of cell apoptosis for J1209 (LCL) and SUDHL6 (DLBCL) are shown (intact cells: green events – early apoptotic cells: blue events – late apoptotic cells: purple events). (b) Percentage of LCLs or DLBCLs total Annexin V<sup>+</sup> cells. vLMW-F fractions induce a similar apoptosis.

NS: Not significant; \* p< 0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001.

**Absence of toxicity for normal B and T cells**

The potential use of native fucoidan or vLMW-F for a biomedical application and specificity of the treatment requires that they do not display toxicity for normal cells. We chose to focus on peripheral blood mononuclear cells and particularly on normal B-cells (for comparison with tumoral B-cells), T-cells and activated T-cells (frequently implicated in anti-tumor responses *via* the PD-L1/PD-1 axis). We have performed an Annexin V-based flow cytometry test, which allows assessing simultaneously apoptosis and viability. No cytotoxic effect was observed neither for the native form nor for the two vLMW-F formulas (**Fig. 3**).



**Fig. 3 Native fucoidan or vLMW-F are not toxic for normal lymphocyte cells**

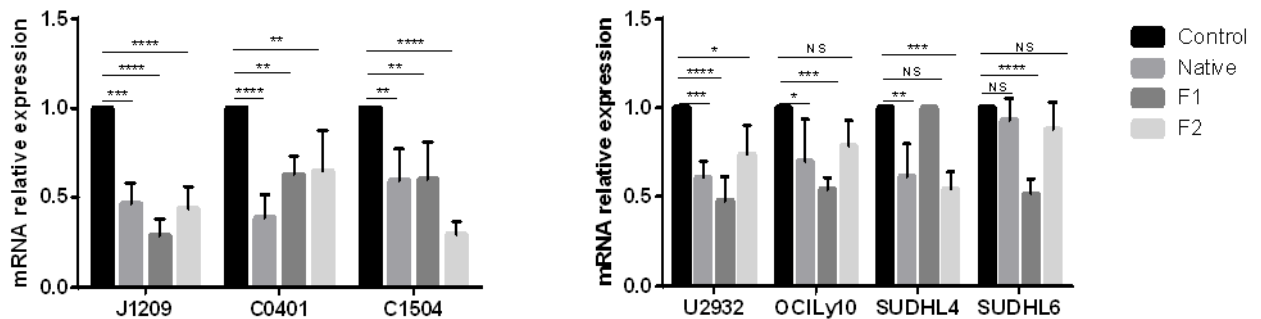
Normal cells (mononuclear cells, B-cells, T-cells activated or not) were treated or not (control) with 100µg/mL of native fucoidan or vLMW-F (F1 and F2) for 48h. Apoptosis analysis (Annexin V/PI staining) was realized by flow cytometry. Results were obtained from three independent experiments.

An example of each population is shown (intact cells: green events – early apoptotic cells: blue events – late apoptotic cells: purple events) as well as the percentage of total Annexin V<sup>+</sup> cells for each condition. No apoptosis induction was observed.

NS: Not significant; \* p< 0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001.

### Decrease of PD-L1 transcriptional expression

*PD-L1* transcriptional expression involves signaling pathway that can be inhibited by fucoidan, such as, PI3k/AKT, NF- $\kappa$ B or RAS/ERK1/2 [34–37]. Therefore, we studied the effect of the native and the vLMW-F (F1 and F2) on mRNA expression of *PD-L1* for the three LCLs and the four DLBCLs cell lines. We showed that it was strongly decreased in LCLs, regardless of the treatment, and in a less extent in DLBCLs (Fig. 4). Our results emphasized that the transcriptional expression of *PD-L1* can be strongly impaired by native fucoidan or vLMW-F.



**Fig. 4** Fucoidan downregulates the transcriptional expression of *PD-L1* in LCLs and DLBCLs cells

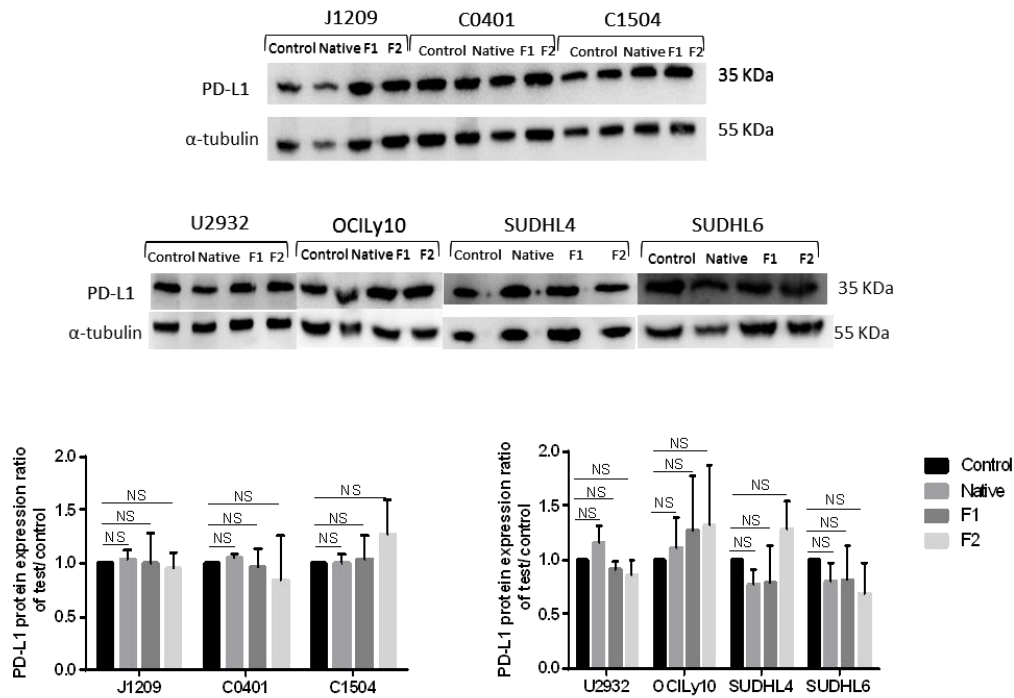
LCLs (J1209, C0401, C1504) and DLBCLs (U2932, OCILy10, SUDHL4, SUDHL6) were treated with 100 $\mu$ g/mL of native fucoidan or vLMW-F (F1 and F2) for 48h followed by RNA extraction and RT-qPCR. Results were obtained from three independent experiments. mRNA relative expression of *PD-L1* was decreased either for the native form or the fractions.

NS: Not significant; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

### Decrease of membrane, but not of total, PD-L1 protein expression

Since mRNA expression can differ from protein expression, especially due to the translational regulation, we studied the total protein expression of PD-L1 for the same cell lines and in the same treatment conditions. All the cell lines strongly expressed PD-L1 and surprisingly, despite the inhibition of transcriptional regulation, total PD-L1 expression remained unchanged or occasionally slightly modified, whatever was the cell line and the treatment, as observed by

western blot (**Fig. 5**) or by flow cytometry (**Fig. S3**). This could be explained by the fact that PD-L1 is stored in secretory lysosomes before their migration, *via* the actin network, and their fusion with the plasma membrane, which could mask transcriptional regulation.

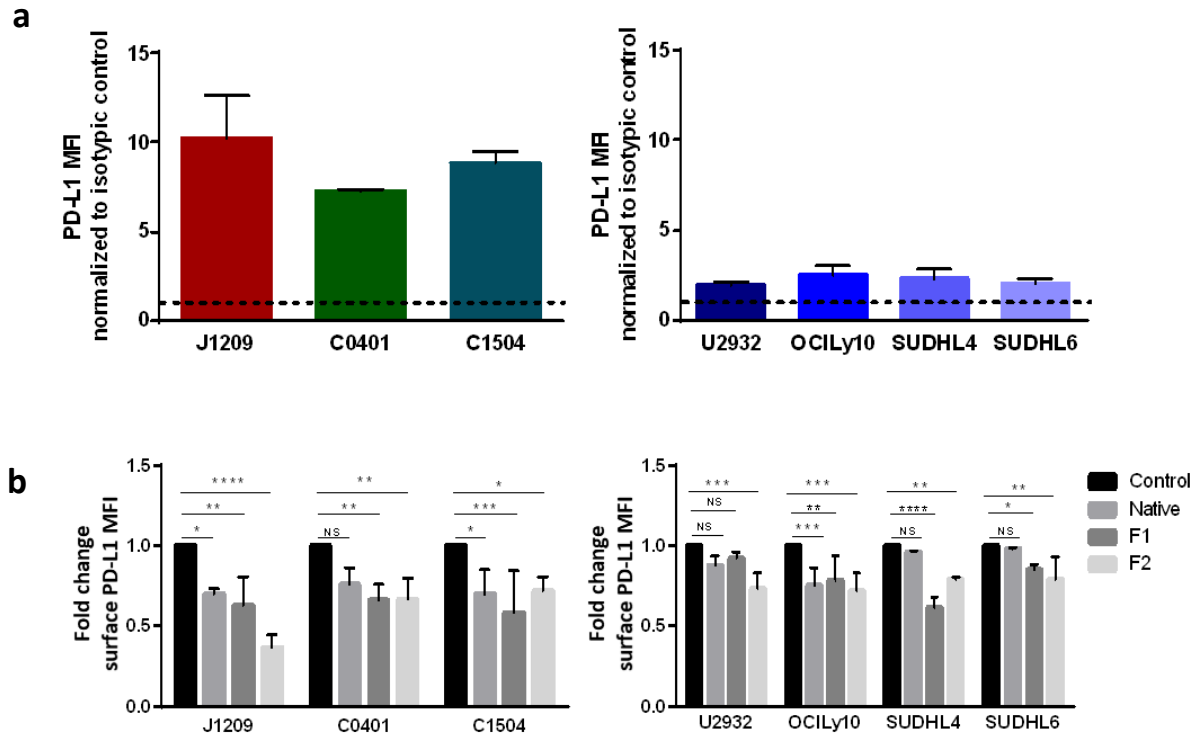


**Fig. 5 Native fucoidan or vLMW-F do not modify PD-L1 total expression**

PD-L1 total expression analysis for LCLs (J1209, C0401, C1504) and DLBCLs (U2932, OCILy10, SUDHL4, SUDHL6) by Western Blot after 48h of 100  $\mu$ g/mL native fucoidan or vLMW-F (F1 and F2) treatment. No significant change was observed for PD-L1 total expression. Results were obtained from three independent experiments.

NS: Not significant; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

Since the active fraction of PD-L1 responsible for interaction with PD-1 is that at the cell surface, we have also studied its specific expression. Cytometry analysis were carried out on viable cells populations, in order to not take into account the possible degradation of the protein on dead cells. As expected, cytometry analysis showed an overexpression of surface PD-L1 which was much higher for LCLs [38] than for DLBCLs cells [8] (**Fig. 6a**). However, unlike for total expression, fucoidan treatments significantly decreased PD-L1 membrane expression for the three LCLs as well as for the four DLBCLs, with generally better results for the vLMW-F formulas (**Fig. 6b**). Otherwise, PD-L1 decrease was more important for LCLs than for DLBCLs that have however a lower baseline expression. Our results emphasized a specific decrease of PD-L1 membrane expression in the presence of fucoidan species, especially effective on LCLs when treated with the vLMW-F. Since total expression remained unchanged, this could be due to a regulation of the membrane traffic. We verified that the decrease of membrane PD-L1 expression was due to the fractions of vLMW-F and not to L-Fucose, since it is the smallest subunit of fucoidan skeleton (**Fig. S4**).



**Fig. 6 vLMW-F decrease PD-L1 surface expression in LCLs and DLBCLs cells**

LCLs (J1209, C0401, C1504) and DLBCLs (U2932, OCILy10, SUDHL4, SUDHL6) cells were treated with 100µg/mL of native fucoidan or vLMW-F (F1 and F2) for 48h followed by immunofluorescent staining for PD-L1 analyzed by flow cytometry. Results were obtained from three independent experiments.

(a) PD-L1 is overexpressed by LCLs compared to DLBCLs. (b) Fold change (Ratio of MFI test/MFI control, both normalized to the isotypic control – MFI: Mean Fluorescence Intensity) of PD-L1 surface expression for LCLs and DLBCLs. vLMW-F generally decrease, more efficiently than the native form, PD-L1 surface expression for LCLs and DLBCLs.

NS: Not significant; \* p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001.

### Disruption of actin network and decrease of secretory activity

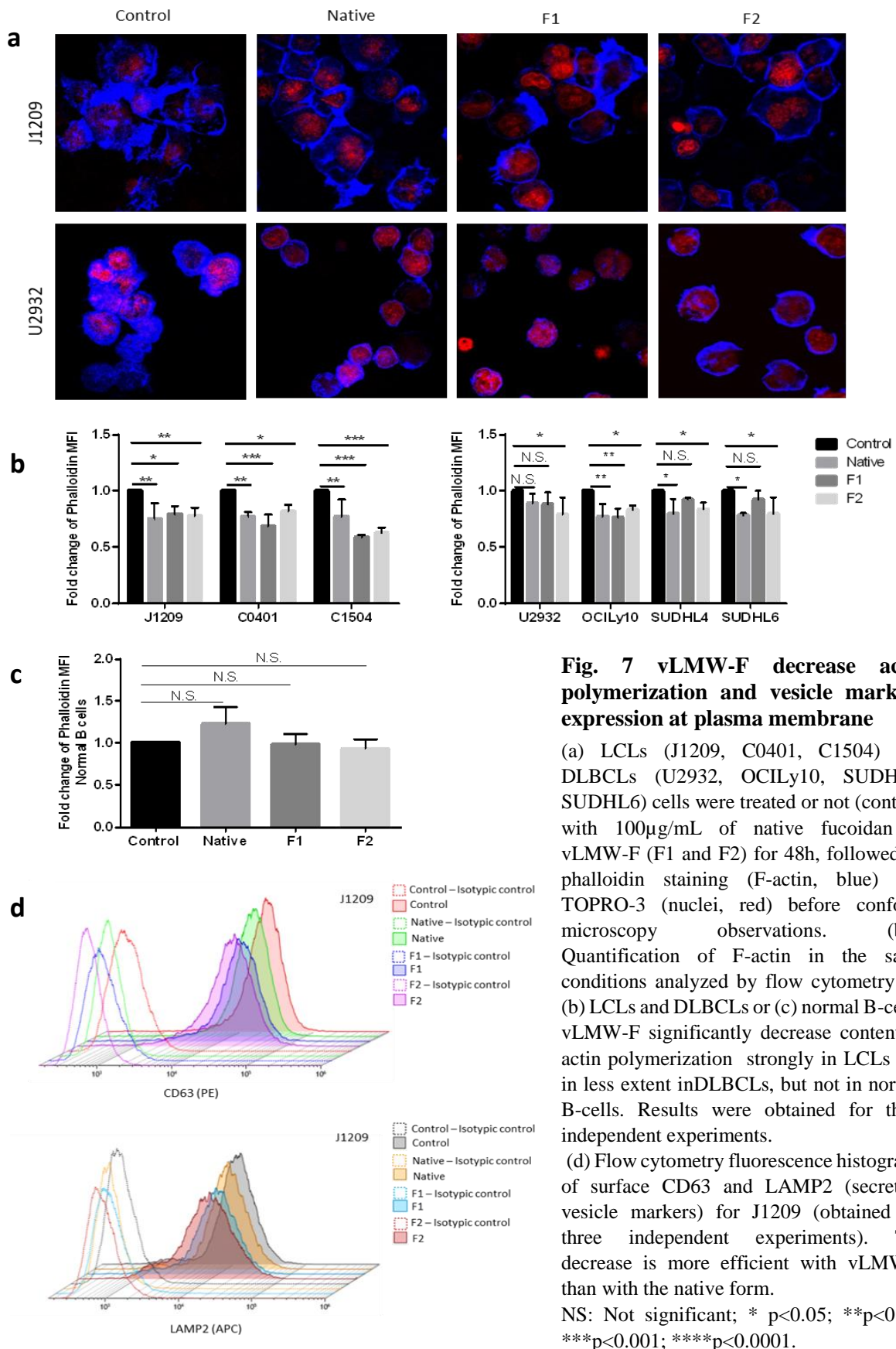
We have already shown for LCLs that PD-L1 membrane expression involved migration of secretory lysosome *via* the densified actin network and vesicular membrane traffic [38].

Therefore, we studied the impact of native and vLMW-F fractions F1 and F2 on actin network.

F-actin was stained by fluorescent phalloidin. We emphasized a marked decrease of actin polymerization, especially for LCLs and in a less extent for DLBCLs cells, as visualized by confocal microscopy (**Fig. 7a**) and quantified by flow cytometry (**Fig. 7b**). Furthermore, we

showed by quantifying the F-actin that for normal B-cells neither native fucoidan, nor vLMW-F modify actin network (**Fig. 7c**). To assess vesicular membrane traffic, we focused on LCLs, for which PD-L1 membrane expression as well as actin network were the more affected. We studied native fucoidan and vLMW-F effects on two specific reporter molecules, which are constitutive of intracellular vesicles and expressed at the plasma membrane following their fusion: CD63 and LAMP2. Moreover, LAMP2 is otherwise a lysosomal-associated protein expressed by secretory lysosomes (storage location of PD-L1). Analysis by flow cytometry showed a decrease of the two secretory vesicle markers at the plasma membrane for the native fucoidan and even more for the vLMW-F F1 and F2 (**Fig. 7d**). Our results suggest that fucoidan impede secretory activity through the actin network and vesicle fusion with plasma membrane, which lead to a decrease of PD-L1 membrane expression.





**Fig. 7 vLMW-F decrease actin polymerization and vesicle markers expression at plasma membrane**

(a) LCLs (J1209, C0401, C1504) and DLBCLs (U2932, OCILy10, SUDHL4, SUDHL6) cells were treated or not (control) with 100µg/mL of native fucoidan or vLMW-F (F1 and F2) for 48h, followed by phalloidin staining (F-actin, blue) and TOPRO-3 (nuclei, red) before confocal microscopy observations. (b-c) Quantification of F-actin in the same conditions analyzed by flow cytometry for (b) LCLs and DLBCLs or (c) normal B-cells. vLMW-F significantly decrease content of actin polymerization strongly in LCLs and in less extent inDLBCLs, but not in normal B-cells. Results were obtained for three independent experiments.

(d) Flow cytometry fluorescence histograms of surface CD63 and LAMP2 (secretory vesicle markers) for J1209 (obtained for three independent experiments). The decrease is more efficient with vLMW-F than with the native form.

NS: Not significant; \* p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001.

## Discussion

Ours results show that vLMW-F decrease cell proliferation and induce apoptosis of LCLs and DLBCLs tumoral B cells without being toxic for normal B and T-cells. Furthermore, these formulas decreased PD-L1 expression at the transcriptional and cell surface levels. This result seemed to be explained by actin network alteration that could be associated with a deregulation of cells secretory activity, reducing thereby PD-L1 externalization.

Numerous studies report *in vitro* and *in vivo* anti-cancer effects (such as anti-proliferative, pro-apoptotic, anti-angiogenic, and anti-metastatic) of fucoidan extracts or their low molecular weight derivatives, against multiple types of solid tumors, such as colon, breast, hepatocarcinoma, lung or bladder [16,33,39]. On the contrary, very few data is reported about their effects on liquid tumors, especially concerning the LMW derivatives of fucoidan. Only few studies have shown that native fucoidan extracted from *Fucus vesiculosus* can inhibit proliferation of myeloid and monocytic leukemia cell lines by inducing their apoptosis [24,30,40] or can arrest ABC- or GCB-DLBCL cell cycle [41]. Therefore, we first confirmed these effects previously reported on the lymphocytic B lineage and demonstrated for the first time that these anti-proliferative and pro-apoptotic activities are also extended to LCLs. We also highlighted that extremely depolymerized formulas (< 600 Da) maintain specific anti-tumor activity with more efficiency than native form, while being non-toxic for normal B and T-cells. This is consistent with the fact that depolymerized form are generally more potent [42,43] and in agreement with non-toxicity of fucoidans [16,33,44]. The use of depolymerized form allow being more specific with surely less unwanted effects.

We wanted to confirm the role of fucoidans since they, or derivatives, cover a wide range of immunomodulatory effects and can participate in the immune response against several cancer

and infectious diseases [45,46], sulfate and acetyl groups mainly contributing to its activity [47]. For instance, they have been shown to enhance dendritic cell maturation, cytotoxic T-cell activation, antibody production or memory T-cells production [48,49]. They can also increase the production of TNF $\alpha$  by neutrophils *in vitro* and *in vivo*, delaying their apoptosis [49,50] or induce NO synthesis [51] and activate *in vitro* and *in vivo* NK cells [49,52]. However, very few data exist either for solid or liquid tumors in regards to their effects on the inhibitory immune checkpoints responsible for the tumor cells escape from immune surveillance, especially about the PD1/PD-L1 axis. Yet, other data have shown that fucoidan impairs pathways responsible for PD-L1 expression such as PI3k/AKT, NF- $\kappa$ B or RAS/ERK1/2 [34–37], turning them very promising candidates for immune checkpoint modulation. To date, only two articles have reported a native fucoidan that can decrease PD-L1 expression in tumor tissues of experimental induced mammary cancer [53] and a LMW one that can decrease transcriptional expression of *PD-L1* and *PD-L2*, and PD-L1 protein level, in fibrosarcoma cells [54]. In this background, we found of particular interest to better understand effects on PD-L1 since it is one of the most critical in immune escape and nowadays of great interest in clinical care/immunotherapy approaches. The decrease of transcriptional expression that we found is in agreement with the other studies which have demonstrated that signaling pathways involved in PD-L1 expression (PI3k/AKT, NF- $\kappa$ B or RAS/ERK1/2) can be inhibited by fucoidan [34–37]. Especially, our results confirm such effect for the first time in B-lymphoma cells whether with the native form or the vLMW-F.

In tumor cells, transcriptional expression of *PD-L1* is often not directly related to the protein expression, due to stabilizing post-translational modifications like N-glycosylation and phosphorylation [55,56]. Also it can be accumulated in vesicles such as exosomes [57,56,58] or secretory lysosome, as we demonstrated for LCLs [59], where we observed a cytoplasmic

accumulation. The relevant fraction of PD-L1 is that expressed at cell surface and able to interact with the inhibitor receptor PD-1 expressed on anti-tumor immune cells. As expected, we observed an overexpression for LCLs [38] compared with DLBCLs cells [8]. Interestingly, we next showed a PD-L1 decrease on lymphoma B-cells after treatment by native and our two fucoidan fractions, with a little more efficiency for the vLMW-F than for the native form. It is of importance to note that PD-L1 decrease occurs on viable cells, since it reduces their inhibition towards anti-tumor immune cells, while some of them die by apoptosis. The same tests realized with L-fucose monomer showed no effect, clearly demonstrating the real added value for these original vLMW-F formulas.

Maintenance of high intracellular level of PD-L1 and decrease on cell surface emphasized that native fucoidan, as well as vLMW-F, can regulate membrane secretory traffic of this immune checkpoint. A prerequisite for vesicle secretion is their migration close to the plasma membrane *via* the actin network [60,61]. Remodeling and molecular modification of actin network occurs in tumor cells [62,63] and constitutes a specific and original therapeutic target [64,65]. We previously showed that actin network is increased in LCLs by the EBV latency III program and responsible for the fusion of secretory lysosome with plasma membrane, leading to PD-L1 overexpression at the cell surface [38]. Presently, we show that native fucoidan, as well as vLMW-F, decrease actin polymerization for LCLs and in less extent for DLBCLs cells, that can be associated with the reduction of PD-L1 membrane expression. This is also supported by the decrease of LAMP2 membrane expression, particularly after treatment with vLMW-F, which has been correlated with vesicles secretory activity of cells. Data in literature confirms some links between fucoidan and actin pathway, such as the decrease in the expression of genes implicated in polymerization, organization and stabilization [66] or disruption of F-actin stress fibers [67,68]. In this context and as first hypothesis, the difference between native and vLMW

forms might be explained by variation of the internalized amount of the different species especially for their molecular weight differences. No effect on normal cells, associated with the lack of toxicity, suggests a very interesting specific sensitivity for tumoral actin network. Our results also suggests that expression of other inhibitory immune checkpoints could also be decreased insofar as they pass through secretory vesicle [69], secretory lysosomes [59,70] or exosomes [71,72].

As native fucoidan is mainly composed of fucose and because the F1 and F2 fractions present a very low DP, such formulas may comprise mono, di- or tri-saccharides of fucose that are imputable of the effects observed on our cellular models. Results obtained with the single L-fucose monosaccharide did not show any effect. This suggests that the F1 and F2 present other original fucoidan-derived compounds of vLMW responsible for these bioactivities, maybe including glucuronic acid, galactose and xylose (the other principals sugar found in the fucoidan) [73], or backbone modifications because of the depolymerization method (opening or creation of insaturation because of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-based hydrolysis) [74].

Altogether, our results suggest that the efficiency of the vLMW-F is correlated to their low molecular weight (by comparison with the native form) which is consistent with the literature [23,75]. It will be interesting to study if this can be associated with different capacities of internalization. However, no noteworthy differences were observed between the two fractions F1 and F2 that differ mainly by their sulfation degree: at a very low fraction size, this parameter does not seem to be a key player in the bioactivities observed.

In translational medicine, fucoidan extracts are considered of great interest as adjuvant for cancer therapy [76,77]; benefits are also observed with anti-PD-L1 or anti-PD-1 immunotherapies in mice models. Fucoidan extracted from *Fucus vesiculosus* promoted the activation of tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> T cells and strongly inhibit growth of melanoma cells

when co-administrated with anti-PD-1, particularly when applied before immunotherapy [36]. Fucoidan extracted from three species of algae, among them *Fucus vesiculosus*, promoted proliferation and activity of *ex vivo* PBMCs and potentiated anti-PD-1 effects [78]. Intranasal administration of *Ecklonia cava*-extracted fucoidan enhanced the anti-PD-L1 mediated anti-cancer activities against melanoma and carcinoma tumor growth in lungs [79]. Fucoidan of *luminaria japonica* enhanced the anticancer efficacy of anti-PD-L1 antibodies against Lewis lung carcinoma [80].

Algal polysaccharides, such as fucoidan, could provide novel therapeutic alternatives and promising supplement, especially for cancer treatments. Clinical trials are actually in course for hepatocellular carcinoma (NCT04066660) and rectal cancer (NCT04342949). It could be useful combined with immune checkpoint blockade therapies to treat lymphoproliferative malignancies.

Our results suggest that vLMW-F (<600 Da) could be an effective potential adjuvant of anti-PD-L1 or anti-PD-1 immunotherapy thanks to its favorable anti-proliferative and pro-apoptotic effects associated with its ability to decrease membrane PD-L1 via the actin depolymerization. Functional *in vitro* studies on co-culture models with autologous T-cells or NK cells and *in vivo* studies on mice models are the next steps.

### **Acknowledgements**

We thank the flow cytometry and microscopy facilities of the BISCEM US 042 INSERM/UMS 2015 CNRS technological platform of the University of Limoges for their technical assistance as well as the immunology laboratory of the Limoges University Hospital Center.

---

## Statements & Declarations

### Funding

This work was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer and Ligue Régionale Contre le Cancer (Limousin, Charente-Maritime). Author S.J. has received research support from Hariri Foundation for Sustainable Human Development

**Conflict of interest** “The authors declare no potential conflicts of interest”

### Author contributions

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by Saliba Jennifer and Manseur Chanez. The first draft of the manuscript was written by Jayat-Vignoles Chantal and Saliba Jennifer and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### Data availability

The datasets generated and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

### Ethical approval

The cell biological collection issued from the Tissue and Cell bank CRBioLim of the Limoges Hospital University Center was declared to and authorized by the French Health Ministry with the session n° “AC-2021-4790” according to the French law.

### Consent to publish

Not applicable

### Consent to participate

Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

## References

- [1] Rowe M, Raithatha S, Shannon-Lowe C. Counteracting Effects of Cellular Notch and Epstein-Barr Virus EBNA2: Implications for Stromal Effects on Virus-Host Interactions. *J Virol* 2014;88:12065–76. <https://doi.org/10.1128/JVI.01431-14>.
- [2] Shannon-Lowe C, Rickinson A. The Global Landscape of EBV-Associated Tumors. *Front Oncol* 2019;9:713. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00713>.
- [3] Susanibar-Adaniya S, Barta SK. 2021 Update on Diffuse large B cell lymphoma: A review of current data and potential applications on risk stratification and management. *Am J Hematol* 2021;96:617–29. <https://doi.org/10.1002/ajh.26151>.
- [4] He X, Xu C. Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy. *Cell Res* 2020;30:660–9. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0343-4>.
- [5] Cha J-H, Chan L-C, Li C-W, Hsu JL, Hung M-C. Mechanisms Controlling PD-L1 Expression in Cancer. *Mol Cell* 2019;76:359–70. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.030>.
- [6] Wu Y, Chen W, Xu ZP, Gu W. PD-L1 Distribution and Perspective for Cancer Immunotherapy—Blockade, Knockdown, or Inhibition. *Frontiers in Immunology* 2019;10.
- [7] Auclair H, Ouk-Martin C, Roland L, Santa P, Mohamad HA, Faumont N, et al. EBV Latency III–Transformed B Cells Are Inducers of Conventional and Unconventional Regulatory T Cells in a PD-L1–Dependent Manner. *The Journal of Immunology* 2019;203:1665–74. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801420>.
- [8] Boussiotis VA. Cell-specific PD-L1 expression in DLBCL. *Blood* 2015;126:2171–2. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-08-663997>.
- [9] Yamamoto R, Nishikori M, Kitawaki T, Sakai T, Hishizawa M, Tashima M, et al. PD-1/PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma. *Blood* 2008;111:3220–4. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-05-085159>.
- [10] Gu D, Ao X, Yang Y, Chen Z, Xu X. Soluble immune checkpoints in cancer: production, function and biological significance. *J Immunother Cancer* 2018;6:132. <https://doi.org/10.1186/s40425-018-0449-0>.
- [11] Khan M, Arooj S, Wang H. Soluble B7-CD28 Family Inhibitory Immune Checkpoint Proteins and Anti-Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology* 2021;12.
- [12] Conroy M, Naidoo J. Immune-related adverse events and the balancing act of immunotherapy. *Nat Commun* 2022;13:392. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-27960-2>.
- [13] Michot JM, Bigenwald C, Champiat S, Collins M, Carbonnel F, Postel-Vinay S, et al. Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade: a comprehensive review. *European Journal of Cancer* 2016;54:139–48. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.11.016>.
- [14] Palmieri DJ, Carlino MS. Immune Checkpoint Inhibitor Toxicity. *Curr Oncol Rep* 2018;20:72. <https://doi.org/10.1007/s11912-018-0718-6>.
- [15] Wu M, Huang Q, Xie Y, Wu X, Ma H, Zhang Y, et al. Improvement of the anticancer efficacy of PD-1/PD-L1 blockade via combination therapy and PD-L1 regulation. *J Hematol Oncol* 2022;15:24. <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01242-2>.
- [16] Jin J-O, Chauhan PS, Arukha AP, Chavda V, Dubey A, Yadav D. The Therapeutic Potential of the Anticancer Activity of Fucoidan: Current Advances and Hurdles. *Marine Drugs* 2021;19:265. <https://doi.org/10.3390/md19050265>.



- [17] Citkowska A, Szekalska M, Winnicka K. Possibilities of Fucoïdan Utilization in the Development of Pharmaceutical Dosage Forms. *Mar Drugs* 2019;17. <https://doi.org/10.3390/md17080458>.
- [18] Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). Assessment report on *Fucus vesiculosus* L., thallus 2014:55.
- [19] Cumashi A, Ushakova NA, Preobrazhenskaya ME, D'Incecco A, Piccoli A, Totani L, et al. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoïdanes from brown seaweeds. *Glycobiology* 2007;17:541–52. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwm014>.
- [20] Fitton JH, Stringer DN, Karpinić SS. Therapies from Fucoïdan: An Update. *Mar Drugs* 2015;13:5920–46. <https://doi.org/10.3390/md13095920>.
- [21] Wang Y, Xing M, Cao Q, Ji A, Liang H, Song S. Biological Activities of Fucoïdan and the Factors Mediating Its Therapeutic Effects: A Review of Recent Studies. *Mar Drugs* 2019;17:E183. <https://doi.org/10.3390/md17030183>.
- [22] Xue M, Liang H, Tang Q, Xue C, He X, Zhang L, et al. The Protective and Immunomodulatory Effects of Fucoïdan Against 7,12-Dimethyl benz[a]anthracene-Induced Experimental Mammary Carcinogenesis Through the PD1/PDL1 Signaling Pathway in Rats. *Nutr Cancer* 2017;69:1234–44. <https://doi.org/10.1080/01635581.2017.1362446>.
- [23] Teruya K, Kusumoto Y, Eto H, Nakamichi N, Shirahata S. Selective Suppression of Cell Growth and Programmed Cell Death-Ligand 1 Expression in HT1080 Fibrosarcoma Cells by Low Molecular Weight Fucoïdan Extract. *Marine Drugs* 2019;17:421. <https://doi.org/10.3390/md17070421>.
- [24] Jin J-O, Song M-G, Kim Y-N, Park J-I, Kwak J-Y. The mechanism of fucoïdan-induced apoptosis in leukemic cells: involvement of ERK1/2, JNK, glutathione, and nitric oxide. *Mol Carcinog* 2010;49:771–82. <https://doi.org/10.1002/mc.20654>.
- [25] Lee H, Kim J-S, Kim E. Fucoïdan from Seaweed *Fucus vesiculosus* Inhibits Migration and Invasion of Human Lung Cancer Cell via PI3K-Akt-mTOR Pathways. *PLoS ONE* 2012;7:e50624. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050624>.
- [26] Boo H-J, Hong J-Y, Kim S-C, Kang J-I, Kim M-K, Kim E-J, et al. The Anticancer Effect of Fucoïdan in PC-3 Prostate Cancer Cells. *Mar Drugs* 2013;11:2982–99. <https://doi.org/10.3390/md11082982>.
- [27] Liu S, Yang J, Peng X, Li J, Zhu C. The Natural Product Fucoïdan Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis of Human Ovarian Cancer Cells: Focus on the PI3K/Akt Signaling Pathway. *Cancer Manag Res* 2020;12:6195–207. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S254784>.
- [28] Han Y, Lee JH, Lee SH. Antitumor Effects of Fucoïdan on Human Colon Cancer Cells via Activation of Akt Signaling. *Biomol Ther (Seoul)* 2015;23:225–32. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2014.136>.
- [29] Chen J, Jiang CC, Jin L, Zhang XD. Regulation of PD-L1: a novel role of pro-survival signalling in cancer. *Ann Oncol* 2016;27:409–16. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv615>.
- [30] Atashrazm F, Lowenthal RM, Woods GM, Holloway AF, Dickinson JL. Fucoïdan and Cancer: A Multifunctional Molecule with Anti-Tumor Potential. *Mar Drugs* 2015;13:2327–46. <https://doi.org/10.3390/md13042327>.
- [31] Mathew L, Burney M, Gaikwad A, Nyshadham P, Nugent EK, Gonzalez A, et al. Preclinical Evaluation of Safety of Fucoïdan Extracts From *Undaria pinnatifida* and *Fucus*

- vesiculosus for Use in Cancer Treatment. *Integr Cancer Ther* 2017;16:572–84. <https://doi.org/10.1177/1534735416680744>.
- [32] Groult H, Cousin R, Chot-Plassot C, Maura M, Bridiau N, Piot J-M, et al.  $\lambda$ -Carrageenan Oligosaccharides of Distinct Anti-Heparanase and Anticoagulant Activities Inhibit MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Migration. *Mar Drugs* 2019;17. <https://doi.org/10.3390/md17030140>.
- [33] Lin Y, Qi X, Liu H, Xue K, Xu S, Tian Z. The anti-cancer effects of fucoidan: a review of both in vivo and in vitro investigations. *Cancer Cell International* 2020;20:154. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01233-8>.
- [34] Reyes ME, Riquelme I, Salvo T, Zanella L, Letelier P, Brebi P. Brown Seaweed Fucoidan in Cancer: Implications in Metastasis and Drug Resistance. *Mar Drugs* 2020;18:E232. <https://doi.org/10.3390/md18050232>.
- [35] Vincent-Fabert C, Roland L, Zimmer-Strobl U, Feuillard J, Faumont N. Pre-clinical blocking of PD-L1 molecule, which expression is down regulated by NF- $\kappa$ B, JAK1/JAK2 and BTK inhibitors, induces regression of activated B-cell lymphoma. *Cell Commun Signal* 2019;17:89. <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0391-x>.
- [36] Yang J, Yang X, Pan W, Wang M, Lu Y, Zhang J, et al. Fucoidan-Supplemented Diet Potentiates Immune Checkpoint Blockage by Enhancing Antitumor Immunity. *Front Cell Dev Biol* 2021;9:733246. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.733246>.
- [37] Ye J, Chen D, Ye Z, Huang Y, Zhang N, Lui EMK, et al. Fucoidan Isolated from *Saccharina japonica* Inhibits LPS-Induced Inflammation in Macrophages via Blocking NF- $\kappa$ B, MAPK and JAK-STAT Pathways. *Mar Drugs* 2020;18:E328. <https://doi.org/10.3390/md18060328>.
- [38] Durand-Panteix S, Farhat M, Youlyouz-Marfak I, Rouaud P, Ouk-Martin C, David A, et al. B7-H1, which represses EBV-immortalized B cell killing by autologous T and NK cells, is oppositely regulated by c-Myc and EBV latency III program at both mRNA and secretory lysosome levels. *J Immunol* 2012;189:181–90. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102277>.
- [39] Tsai H-L, Tai C-J, Huang C-W, Chang F-R, Wang J-Y. Efficacy of Low-Molecular-Weight Fucoidan as a Supplemental Therapy in Metastatic Colorectal Cancer Patients: A Double-Blind Randomized Controlled Trial. *Mar Drugs* 2017;15:E122. <https://doi.org/10.3390/md15040122>.
- [40] Park HS, Hwang HJ, Kim G-Y, Cha H-J, Kim W-J, Kim ND, et al. Induction of apoptosis by fucoidan in human leukemia U937 cells through activation of p38 MAPK and modulation of Bcl-2 family. *Mar Drugs* 2013;11:2347–64. <https://doi.org/10.3390/md11072347>.
- [41] Yang G, Zhang Q, Kong Y, Xie B, Gao M, Tao Y, et al. Antitumor activity of fucoidan against diffuse large B cell lymphoma in vitro and in vivo. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2015;47:925–31. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmv094>.
- [42] Wang Y, Xing M, Cao Q, Ji A, Liang H, Song S. Biological Activities of Fucoidan and the Factors Mediating Its Therapeutic Effects: A Review of Recent Studies. *Mar Drugs* 2019;17:E183. <https://doi.org/10.3390/md17030183>.
- [43] Yang C, Chung D, Shin I-S, Lee H, Kim J, Lee Y, et al. Effects of molecular weight and hydrolysis conditions on anticancer activity of fucoidans from sporophyll of *Undaria pinnatifida*. *International Journal of Biological Macromolecules* 2008;43:433–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2008.08.006>

- [44] Hwang P-A, Yan M-D, Lin H-TV, Li K-L, Lin Y-C. Toxicological Evaluation of Low Molecular Weight Fucoidan in Vitro and in Vivo. *Mar Drugs* 2016;14. <https://doi.org/10.3390/md14070121>.
- [45] Apostolova E, Lukova P, Baldzchieva A, Katsarov P, Nikolova M, Iliev I, et al. Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Effects of Fucoidan: A Review. *Polymers (Basel)* 2020;12:E2338. <https://doi.org/10.3390/polym12102338>.
- [46] Hwang J, Yadav D, Lee PC, Jin J-O. Immunomodulatory effects of polysaccharides from marine algae for treating cancer, infectious disease, and inflammation. *Phytother Res* 2022;36:761–77. <https://doi.org/10.1002/ptr.7348>.
- [47] Ferreira SS, Passos CP, Madureira P, Vilanova M, Coimbra MA. Structure-function relationships of immunostimulatory polysaccharides: A review. *Carbohydr Polym* 2015;132:378–96. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.05.079>.
- [48] Jin J-O, Zhang W, Du J-Y, Wong K-W, Oda T, Yu Q. Fucoidan can function as an adjuvant in vivo to enhance dendritic cell maturation and function and promote antigen-specific T cell immune responses. *PLoS One* 2014;9:e99396. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099396>.
- [49] Zhang W, Oda T, Yu Q, Jin J-O. Fucoidan from *Macrocystis pyrifera* has powerful immune-modulatory effects compared to three other fucoidans. *Mar Drugs* 2015;13:1084–104. <https://doi.org/10.3390/md13031084>.
- [50] Jin J-O, Zhang W, Du J-Y, Wong K-W, Oda T, Yu Q. Fucoidan Can Function as an Adjuvant In Vivo to Enhance Dendritic Cell Maturation and Function and Promote Antigen-Specific T Cell Immune Responses. *PLoS One* 2014;9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099396>.
- [51] Jiang Z, Okimura T, Yamaguchi K, Oda T. The potent activity of sulfated polysaccharide, ascophyllan, isolated from *Ascophyllum nodosum* to induce nitric oxide and cytokine production from mouse macrophage RAW264.7 cells: Comparison between ascophyllan and fucoidan. *Nitric Oxide* 2011;25:407–15. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2011.10.001>.
- [52] Ale MT, Maruyama H, Tamauchi H, Mikkelsen JD, Meyer AS. Fucoidan from *Sargassum* sp. and *Fucus vesiculosus* reduces cell viability of lung carcinoma and melanoma cells in vitro and activates natural killer cells in mice in vivo. *Int J Biol Macromol* 2011;49:331–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.05.009>.
- [53] Xue M, Liang H, Tang Q, Xue C, He X, Zhang L, et al. The Protective and Immunomodulatory Effects of Fucoidan Against 7,12-Dimethyl benz[a]anthracene-Induced Experimental Mammary Carcinogenesis Through the PD1/PDL1 Signaling Pathway in Rats. *Nutr Cancer* 2017;69:1234–44. <https://doi.org/10.1080/01635581.2017.1362446>.
- [54] Teruya K, Kusumoto Y, Eto H, Nakamichi N, Shirahata S. Selective Suppression of Cell Growth and Programmed Cell Death-Ligand 1 Expression in HT1080 Fibrosarcoma Cells by Low Molecular Weight Fucoidan Extract. *Mar Drugs* 2019;17:E421. <https://doi.org/10.3390/md17070421>.
- [55] Fan Z, Wu C, Chen M, Jiang Y, Wu Y, Mao R, et al. The generation of PD-L1 and PD-L2 in cancer cells: From nuclear chromatin reorganization to extracellular presentation. *Acta Pharm Sin B* 2022;12:1041–53. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.09.010>.
- [56] Yu X, Li W, Young KH, Li Y. Posttranslational Modifications in PD-L1 Turnover and Function: From Cradle to Grave. *Biomedicines* 2021;9:1702. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111702>.

- [57] Cha J-H, Chan L-C, Li C-W, Hsu JL, Hung M-C. Mechanisms Controlling PD-L1 Expression in Cancer. *Mol Cell* 2019;76:359–70. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.030>.
- [58] Xie Q-H, Zheng J-Q, Ding J-Y, Wu Y-F, Liu L, Yu Z-L, et al. Exosome-Mediated Immunosuppression in Tumor Microenvironments. *Cells* 2022;11:1946. <https://doi.org/10.3390/cells11121946>.
- [59] Durand-Panteix S, Farhat M, Youlyouz-Marfak I, Rouaud P, Ouk-Martin C, David A, et al. B7-H1, which represses EBV-immortalized B cell killing by autologous T and NK cells, is oppositely regulated by c-Myc and EBV latency III program at both mRNA and secretory lysosome levels. *J Immunol* 2012;189:181–90. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102277>.
- [60] Li P, Bademosi AT, Luo J, Meunier FA. Actin Remodeling in Regulated Exocytosis: Toward a Mesoscopic View. *Trends Cell Biol* 2018;28:685–97. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.04.004>.
- [61] Porat-Shliom N, Milberg O, Masedunskas A, Weigert R. Multiple roles for the actin cytoskeleton during regulated exocytosis. *Cell Mol Life Sci* 2013;70:2099–121. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1156-5>.
- [62] Aseervatham J. Cytoskeletal Remodeling in Cancer. *Biology (Basel)* 2020;9:E385. <https://doi.org/10.3390/biology9110385>.
- [63] Suresh R, Diaz RJ. The remodelling of actin composition as a hallmark of cancer. *Transl Oncol* 2021;14:101051. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101051>.
- [64] Datta A, Deng S, Gopal V, Yap KC-H, Halim CE, Lye ML, et al. Cytoskeletal Dynamics in Epithelial-Mesenchymal Transition: Insights into Therapeutic Targets for Cancer Metastasis. *Cancers (Basel)* 2021;13:1882. <https://doi.org/10.3390/cancers13081882>.
- [65] Ong MS, Deng S, Halim CE, Cai W, Tan TZ, Huang RY-J, et al. Cytoskeletal Proteins in Cancer and Intracellular Stress: A Therapeutic Perspective. *Cancers (Basel)* 2020;12:E238. <https://doi.org/10.3390/cancers12010238>.
- [66] Kwack KH, Ji JY, Park B, Heo JS. Fucoidan (Undaria pinnatifida)/Polydopamine Composite-Modified Surface Promotes Osteogenic Potential of Periodontal Ligament Stem Cells. *Mar Drugs* 2022;20:181. <https://doi.org/10.3390/md20030181>.
- [67] Wu S-Y, Chen Y-T, Tsai G-Y, Hsu F-Y, Hwang P-A. Protective Effect of Low-Molecular-Weight Fucoidan on Radiation-Induced Fibrosis Through TGF- $\beta$ 1/Smad Pathway-Mediated Inhibition of Collagen I Accumulation. *Mar Drugs* 2020;18:E136. <https://doi.org/10.3390/md18030136>.
- [68] Mustafa S, Pawar JS, Ghosh I. Fucoidan induces ROS-dependent epigenetic modulation in cervical cancer HeLa cell. *Int J Biol Macromol* 2021;181:180–92. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.110>.
- [69] He X, Xu C. Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy. *Cell Res* 2020;30:660–9. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0343-4>.
- [70] Wang H, Han X, Xu J. Lysosome as the Black Hole for Checkpoint Molecules. *Adv Exp Med Biol* 2020;1248:325–46. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-3266-5\\_14](https://doi.org/10.1007/978-981-15-3266-5_14).
- [71] Hu Y, Zhang R, Chen G. Exosome and Secretion: Action On? *Adv Exp Med Biol* 2020;1248:455–83. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-3266-5\\_19](https://doi.org/10.1007/978-981-15-3266-5_19).
- [72] Xing C, Li H, Li R-J, Yin L, Zhang H-F, Huang Z-N, et al. The roles of exosomal immune checkpoint proteins in tumors. *Mil Med Res* 2021;8:56. <https://doi.org/10.1186/s40779-021-00350-3>.

- [73] Oliveira RM, Câmara RBG, Monte JFS, Viana RLS, Melo KRT, Queiroz MF, et al. Commercial Fucoïdanes from *Fucus vesiculosus* Can Be Grouped into Antiadipogenic and Adipogenic Agents. *Mar Drugs* 2018;16:193. <https://doi.org/10.3390/md16060193>.
- [74] Courtois J. Oligosaccharides from land plants and algae: production and applications in therapeutics and biotechnology. *Current Opinion in Microbiology* 2009;12:261–73. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.04.007>.
- [75] Gupta D, Silva M, Radziun K, Martinez DC, Hill CJ, Marshall J, et al. Fucoïdan Inhibition of Osteosarcoma Cells is Species and Molecular Weight Dependent. *Mar Drugs* 2020;18:104. <https://doi.org/10.3390/md18020104>.
- [76] Hsu H-Y, Hwang P-A. Clinical applications of fucoïdan in translational medicine for adjuvant cancer therapy. *Clin Transl Med* 2019;8:15. <https://doi.org/10.1186/s40169-019-0234-9>.
- [77] Kwak J-Y. Fucoïdan as a marine anticancer agent in preclinical development. *Mar Drugs* 2014;12:851–70. <https://doi.org/10.3390/md12020851>.
- [78] Park AY, Nafia I, Stringer DN, Karpiniec SS, Fitton JH. Fucoïdan Independently Enhances Activity in Human Immune Cells and Has a Cytostatic Effect on Prostate Cancer Cells in the Presence of Nivolumab. *Mar Drugs* 2021;20:12. <https://doi.org/10.3390/md20010012>.
- [79] Zhang W, Hwang J, Yadav D, An E-K, Kwak M, Lee PC-W, et al. Enhancement of Immune Checkpoint Inhibitor-Mediated Anti-Cancer Immunity by Intranasal Treatment of *Ecklonia cava* Fucoïdan against Metastatic Lung Cancer. *Int J Mol Sci* 2021;22:9125. <https://doi.org/10.3390/ijms22179125>.
- [80] An E-K, Hwang J, Kim S-J, Park H-B, Zhang W, Ryu J-H, et al. Comparison of the immune activation capacities of fucoïdan and laminarin extracted from *Laminaria japonica*. *Int J Biol Macromol* 2022;208:230–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.122>.

## Supplemental data

### Materials and methods

#### Fucoidan samples

Native fucoidan of *Fucus vesiculosus* was obtained from Sigma-Aldrich. Two original formulas were depolymerized (LIENSs laboratory UMR CNRS 7266, Université de La Rochelle, France) from the native fucoidan using a radical H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-based hydrolysis method. Briefly, native fucoidan was dissolved in Milli-Q water (25 mg/mL), and then the solution was purged with argon and heated until 60°C. The addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (Sigma-Aldrich) at a weight/weight ratio of 0.5 and 1.5 resulted in the production of two different vLMW-F fractions, named F1 and F2, respectively after 96h and 72h of depolymerization. The chromatographic profile shows that F1 and F2 fractions are practically eluted at the same time and after the native fucoidan, which attest that the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-based hydrolysis reaction worked well.

#### Cell culture conditions

Three lymphoblastoid cell lines (LCLs - J1209, C0401, C1504) were established and characterized by the Genethon (Evry, France). They were cultured in RPMI 1640 medium (Eurobio Scientific) supplemented with 10% decompartmented FBS (PAN<sup>TM</sup> Biotech) and 1X concentrations from 100X stock solutions of amino acids, vitamins, sodium pyruvate, penicillin/streptomycin and 2mM L-glutamine (all from Gibco, Thermofisher). Four cell lines of DLBCLs: two ABC subtypes (U2932 and OCILy10) and two GCB subtypes (SUDHL4 and SUDHL6) were cultured in the RPMI 1640 medium supplemented with 10% decompartmented FBS, pyruvate (1X), Penicillin/Streptomycin (1X), L-glutamine (1X) and 10 mM of HEPES

buffer solution (Gibco Thermofisher). Cell lines were maintained at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and were mycoplasma free (MycoAlert Mycoplasma Detection Kit).

### **Apoptosis analysis**

LCLs and DLBCLs cells were seeded in plates ( $5 \times 10^5$  cells/well) for 24h, then treated or not with 100µg/mL of L-fucose. After 48h, cells were collected and washed in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS – Eurobio Scientific). We evaluated the toxicity (viability and apoptosis) of all cell lines by Annexin-V/IP staining.

### **PD-L1 expression analysis: immunofluorescent staining and flow cytometry**

For surface labeling, the same protocol of seeding and treatment (native form and vLMW-F, or L-fucose) as described above for the apoptosis analysis was followed. LCLs and DLBCLs cells were collected and washed with DPBS. Then, they were labeled for 15 min in the dark at RT with anti-PD-L1-PE (Biolegend). For total PD-L1 total expression, surface labeling was followed with intracellular PD-L1 staining performed on LCLs and DLBCLs cells, using the IntraPrep Permeabilization Reagent kit (Beckman Coulter), according to the protocol recommended by the supplier. Acquisitions were performed on FACSCalibur. Results were analyzed with Kaluza Analysis 2.1 Software. Fold change was calculated based on the mean fluorescence intensity ratio of PD-L1 on its isotypic control, normalized to the control (untreated cells).

### **Statistical analysis**

One-way or Two-way analysis of variance (ANOVA) was performed to identify significant differences between the control and experimental groups. All experimental data were acquired from at least three independent experiments. All statistical analysis was performed with

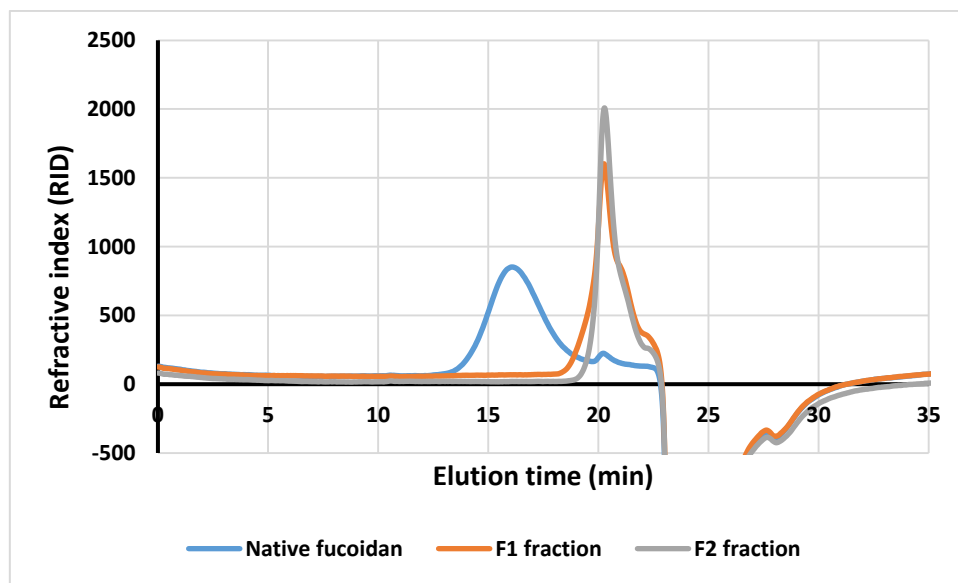
GraphPad Prism 6.05 for Windows. A probability (p) value of <0.05 was considered statistically

Specificity	Clone	Isotypic control	Clone	Fluorochrome	Supplier	Dilution
CD19	HIB19	IgG1	MOPC-21	APC	Biologend	1/10
PD-L1 (CD274)	29E.2A3	IgG2b	MPC-11	PE	Biologend	1/10

significant.

**Table S1 Antibodies used for flow cytometry**

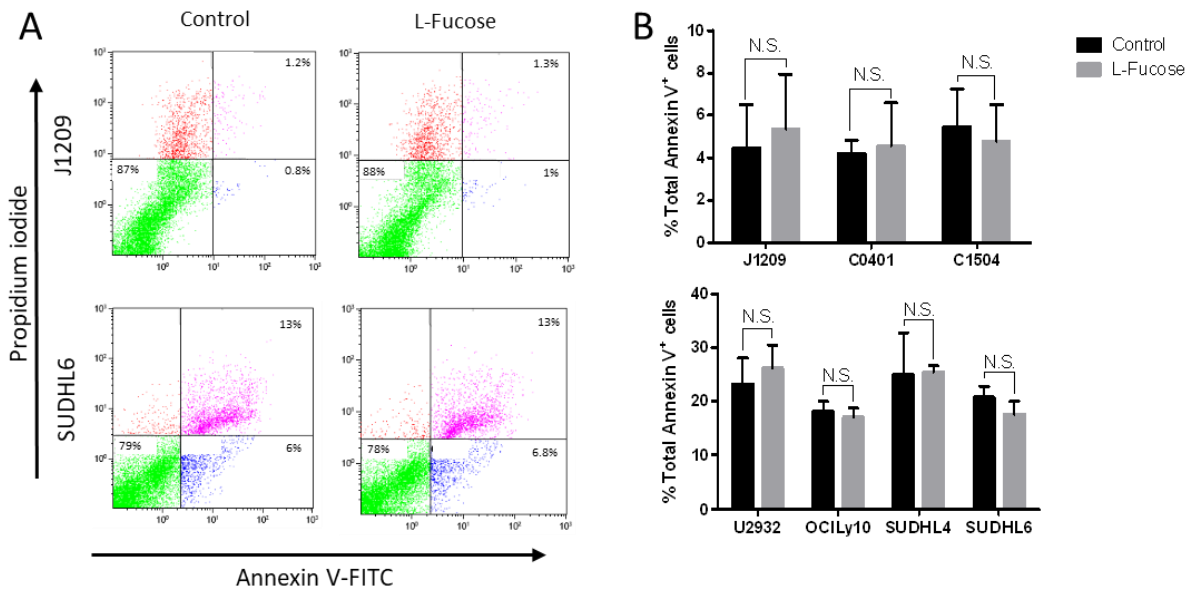
PE: Phycoerythrin – APC: Allophycocyanin



**Fig. S1 SEC-HPLC analysis with refractive detector of native fucoidan with F1 and F2 produced fractions**

The SEC (size exclusion chromatography) separation was performed on a TSK-GEL G4000PW column in series with a TSK-GEL G3000PWXL at a flow rate of 0.8 mL/min using 0.1 M sodium nitrate (NaNO<sub>3</sub>) as the eluent.



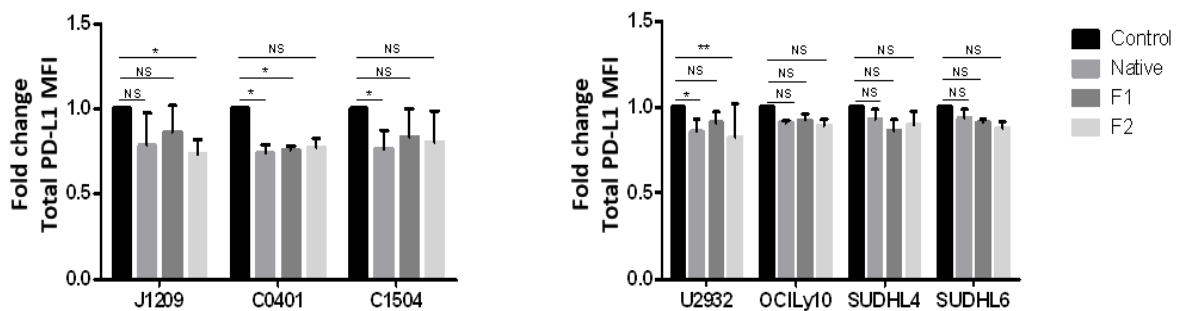


**Fig. S2 L-fucose does not induce apoptosis in LCLs and DLBCLs**

LCLs (J1209, C0401, C1504) and DLBCLs (U2932, OCILy10, SUDHL4, SUDHL6) cells were treated or not (control) with 100µg/mL of L-fucose for 48h, followed by apoptosis analysis (Annexin V/PI staining) by flow cytometry. Results were obtained from three independent experiments.

(A) Examples of cell apoptosis for J1209 (LCL) and SUDHL6 (DLBCL) are shown (intact cells: green events – early apoptotic cells: blue events – late apoptotic cells: purple events). (B) Percentage of LCLs or DLBCLs total Annexin V<sup>+</sup> cells. L-fucose does not induce apoptosis in all cell lines.

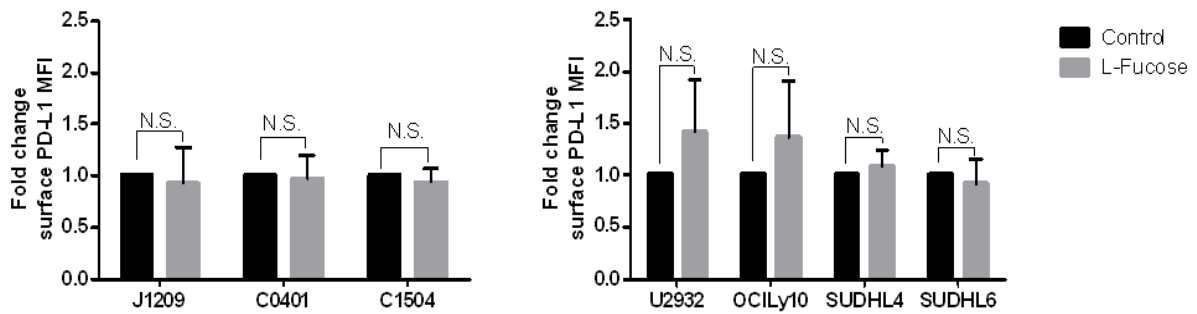
NS: Not significant; \* p < 0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001.



**Fig. S3 Native fucoidan or vLMW-F do not (or slightly) change PD-L1 total expression**

LCLs (J1209, C0401, C1504) and DLBCLs (U2932, OCILy10, SUDHL4, SUDHL6) cells were treated or not (control) with 100µg/mL of native form or vLMW-F. Total (membrane and intracellular) expression of PD-L1 was assessed by flow cytometry and represented by the fold change (Ratio of MFI test/MFI control, both normalized to the isotypic control – MFI: Mean Fluorescence Intensity). No remarkable change was observed for PD-L1 total expression.

NS: Not significant; \* p < 0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001.



**Fig. S4 L-fucose does not decrease PD-L1 surface expression in LCLs and DLBCLs cells**

LCLs (J1209, C0401, C1504) and DLBCLs (U2932, OCILy10, SUDHL4, SUDHL6) cells were treated with 100µg/mL of L-fucose for 48h, followed by immunofluorescent staining for PD-L1 analyzed by flow cytometry. Results were obtained from three independent experiments.

Fold change (Ratio of MFI test/MFI control, both normalized to the isotopic control – MFI: Mean Fluorescence Intensity) of PD-L1 surface expression for LCLs and DLBCLs was not decreased in the presence of L-fucose.

NS: Not significant; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .



## Conclusion

Cette étude a permis de montrer pour la première fois que les nouvelles formules vLMW fucoïdanes sont capables de diminuer la prolifération et d'induire l'apoptose de cellules immortalisées par l'EBV en programme de latence III (LCLs) et de cellules de DLBCLs (deux lymphomes de type B). Nous avons également pu montrer que ces formules conduisent à la baisse d'expression de l'immuno-inhibiteur PD-L1, surexprimé à la surface cellulaire, ce qui peut être responsable de leur échappement à l'immunosurveillance.

De plus, nous avons confirmé que les effets pro-apoptotiques des formules vLMW fucoïdanes sont spécifiques des cellules tumorales. Nous n'observons pas d'effet cytotoxique pour les cellules normales : cellules mononuclées du sang périphérique, les lymphocytes T activés ou non et les cellules B.

PD-L1 est un point de contrôle inhibiteur de la réponse immune surexprimé par les cellules B en latence III de l'EBV ainsi que les DLBCLs. Nous avons identifié que la baisse de l'expression de cette molécule en présence de ces formules de très bas poids moléculaire est au niveau transcriptionnel et membranaire, et non au niveau protéique total. La baisse au niveau transcriptionnel et non au niveau protéique total peut s'expliquer par l'accumulation de PD-L1 niveau vésiculaire (exosomes ou lysosomes sécrétoires). Nous démontrons que la baisse en surface, malgré une forte expression intracellulaire, peut s'expliquer par la baisse de densité du réseau d'actine en présence des formules. Le réseau d'actine est impliqué dans l'externalisation de PD-L1 à la membrane cellulaire, car il permet le rapprochement de vésicules le contenant de la membrane plasmique pour leur fusion (en particulier des lysosomes sécrétoires). Nous montrons que les formules vLMW-F conduisent à la baisse d'expression membranaire des marqueurs vésiculaires CD63 et LAMP-2 (associé aux vésicules lysosomales), traduisant la baisse de fusion. L'absence de baisse de densité de l'actine chez les cellules normales conforte la non toxicité envers ces dernières (cela peut s'expliquer par le fait que le réseau d'actine est généralement modifié chez les cellules tumorales ce qui peut influencer leur sensibilité à certains traitements).

À notre connaissance, il s'agit de la première fois où une étude sur des formules de fucoïdanes de très bas poids moléculaires montrent, à l'instar des fucoïdanes natif ou de formes dépolymérisées de plus grande taille, une inhibition de la prolifération et un effet apoptotique, sans toxicité sur des cellules normales. Nous observons aussi une baisse accrue de l'expression membranaire de PD-L1 chez des cellules tumorales de lymphomes B (cellules en latence III de l'EBV et DLBCL).

En se basant sur cette étude, plusieurs interrogations émergent : les fucoïdanes étant déjà utilisés dans des études cliniques translationnelles, ces formules pourraient-elles potentialiser la réponse T anti-tumorale autologue des cellules de lymphomes B (latence III de l'EBV ou DLBCL) en présence d'anticorps bloquants anti-PD-1 ou anti-PD-L1 ? Quelles sont les voies de signalisations affectées par les formules vLMW-F et dans quelles mesures s'entrecroisent-elles avec celles de surexpression de PD-L1 ? L'administration par voie orale ou par injection des formules vLMW-F chez des modèles murins immunocompétents disponibles au laboratoire retarde-t-elle ou affecte-elle le développement de lymphomes B (par exemple chez les souris *LMP1-CD40*, *Myd88<sup>L265P</sup>* dont la voie de signalisation CD40 est continuellement activée) ; l'agressivité des tumeurs peut-elle être mise en lien avec le niveau d'expression de PD-L1, le temps et la dose de traitement par les vLMW-F ? Sur ce même modèle murin, les formules vLMW-F pourraient-elles restaurer la réponse T anti-tumorale en combinaison avec un traitement anti-PD-1 ou anti-PD-L1 ?

Il existe des points de contrôle inhibiteurs des réponses immunes anti-tumorales T et NK, établis ou émergents et autres que PD-L1 : PD-L2 également (ligand pour PD-1), CD80 et CD86 (ligands pour CTLA-4), Galectine-3 (ligand pour LAG-3), Galectine-9 (ligand pour TIM-3), CD112 et CD155 (ligands pour TIGIT), CEACAM1 (ligand pour TIM-3), HVEM (ligand pour BTLA), B7-H3 et B7-H4 (dont les récepteurs ne sont pas formellement identifiés). De nos jours, les récepteurs de certains de ces points de contrôle (PD-1, CTLA-4, LAG-3 et TIM-3) sont utilisés comme cibles dans les immunothérapies. Deux interrogations essentielles se posent et font l'objet de la seconde partie de mes résultats : quel est le profil d'expression de ces points de contrôle inhibiteurs de la réponse anti-tumorale, en particulier chez les cellules B en latence III de l'EBV ? Quel peut être l'effet des vLMW-F sur ceux qui sont surexprimés ? De nos jours, les récepteurs de certains de ces points de contrôle (PD-1, CTLA-4, LAG-3 et TIM-3) sont ciblés par des traitement en mono ou poly immunothérapie. Cela permettrait de préciser quelle combinaison pourrait être potentiellement la plus spécifique et si les vLMW-F peuvent constituer un adjuvant d'intérêt.

## **Résultats II**

**Molécules inhibitrices de la réponse immune (CMH et points de contrôle) exprimés par les cellules B en latence III de l'EBV et effet des vLMW-F**



## 1- Avant-propos

Les cellules B en latence III de l'EBV surexpriment le point de contrôle immunomodulateur PD-L1, qui par sa liaison à son récepteur PD-1 à la surface des lymphocytes T, va causer l'expansion des Tregs et l'inhibition des T effecteurs, échappant ainsi à l'immunosurveillance. PD-L1 joue un rôle majeur dans l'immunothérapie comme étant une des cibles visées dans ce type de traitement (Auclair et al., 2019).

Comme décrit dans l'article, les formules de fucoïdanes de très bas poids moléculaire (formules vLMW-F) sont capables de baisser l'expression de surface de PD-L1 sur les cellules B en latence III de l'EBV *in vitro* (LCLs) en altérant le cytosquelette et la voie de sécrétion lysosomale.

Le présent travail a été réalisé dans la poursuite de ces travaux, afin de compléter le profil inhibiteur de la réponse immune des lymphocytes B en latence III de l'EBV *via* les CMH de classe I (HLA-E et HLA-A, B, C) et de classe II (HLA-DR), ainsi que les points de contrôle inhibiteurs : PD-L1 et PD-L2 (ligands pour PD-1), CD80 et CD86 (ligands pour CTLA-4), B7-H3 et B7-H4, CD112 et CD155 (ligands pour TIGIT), CEACAM1 (ligand pour TIM-3), HVEM (ligand pour BTLA, LIGHT, CD160), Galectine-3 (ligand pour LAG-3) et Galectine-9 (ligand pour TIM-3).

Notre intérêt a porté sur ceux s'adressant aux cellules T, tout en étant les plus récemment décrits comme émergents pour les cellules NK, et notamment ceux pour lesquels il existe des immunothérapies utilisées en routine ou en cours de développement : anti-PD-1/PD-L1, anti-CTLA-4, anti-LAG-3, anti-TIM-3, seules ou combinées (Chae et al., 2018; Ciraolo et al., 2022; Huang et al., 2016; Mimura et al., 2021; Takamatsu et al., 2021; Wei et al., 2019; Wei and Li, 2022, p. 3; Willsmore et al., 2021). Suite aux résultats obtenus avec les deux nouvelles formules de vLMW-F montrant la baisse d'expression membranaire de l'immuno-inhibiteur PD-L1 *via* la baisse de sécrétion vésiculaire, nous avons également étudié leur rôle pour les points de contrôle inhibiteurs montrés comme étant surexprimés.



## 2- Matériels et Méthodes

### 2-1. Culture cellulaire

Trois lignées de cellules lymphoblastoïdes (LCLs, latence III) CD19-positives (J1209, C0401, C1504) ont été établies et caractérisées par le Généthon (Evry, France). Elles ont été cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Eurobio Scientific, ExonHit Therapeutics SA, France) supplémenté de 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF) décomplémenté (PANTM Biotech, Allemagne), d'acides aminés (1%), de vitamines (1%), de pyruvate de sodium (1%), de pénicilline/streptomycine (1%) et de L-glutamine (1%) (tous provenant de Gibco Thermofisher, États-Unis). Les trois lignées cellulaires ont été maintenues à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub> et étaient exemptes de mycoplasmes (MycoAlert Mycoplasma Detection Kit ; Lonza, Levallois, France).

Pour les repiquages, une numération cellulaire a été effectuée trois fois par semaine à l'aide du compteur de cellules (Cell-Dyn Emerald Abbot, Rungis, France) et les cellules ont été remises en culture à une concentration de  $5 \times 10^6$  cellules/mL.

### 2-2. Extraction d'ARN au trizol

Après 48h de traitement par le fucoïdane natif ou les fractions, l'ARN de  $10^6$  cellules de chaque lignée a été extrait par 1 mL de trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) durant 5 minutes à l'abri de la lumière dans la glace. Ensuite, 200 µL de chloroforme ont été ajoutés, suivi d'une centrifugation de 12000 rpm, à 4°C durant 20 minutes. Puis, les ARNs ont été précipités dans de l'isopropanol 100% et les culots ont été lavés avec de l'éthanol 75%, et resuspendus dans de l'eau ultrapure, après séchage du tube. La quantification des ARNs extraits a été effectuée par mesure de l'absorbance à 260 nm par le NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) et leur pureté a été pré-évaluée par les ratios d'absorbance 260/230 et 260/280.

Le même protocole a été suivi pour les cellules de référence étant des cellules B obtenues par immunosélection négative (Miltenyi Biotec, Paris, France) à partir des PBMC d'individus sains après consentement écrit.

### 2-3. Rétrotranscription des ARNs

Pour obtenir l'ADNc, un volume total d'un mélange réactionnel (2µL de tampon 10X, 0,8µL de mix dNTP, 2µL de primers 10X et 1µL d'enzyme) d'un mix de rétrotranscription (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA) a été préparé pour la totalité des échantillons. Après addition du mix à 1µg d'ARN, le volume réactionnel a été ajusté à 20 µL par addition d'eau ultrapure, la quantité d'eau apportée dépendant de la concentration de la solution d'ARN. La rétrotranscription a été effectuée selon le protocole suivant : 10 minutes à 25°C suivies de 2h à 37°C et de 5 minutes à 85°C, afin de conserver le rapport de quantité entre ARN et ADNc.

### 2-4. Analyse du niveau de transcription par PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR)

Pour chacun des gènes analysés correspond une sonde Taqman spécifique : PD-L1 (Hs01125296\_m1), PD-L2 (Hs01057774\_m1), CD80 (Hs01045162\_m1), CD86 (Hs00199349\_m1), B7-H3 (Hs00987207\_m1), B7-H4 (Hs00368689\_m1), CD112 (Hs01071562\_m1), CD155 (Hs00197846\_m1), CEACAM1 (Hs05041713\_s1), HVEM (Hs00187058\_m1), Galectine-3 (Hs00173587\_m1) et Galectine-9 (Hs04190742\_mH) (ThermoFisher Scientific, US) permettant d'évaluer leurs expressions. Toutes ces sondes sont couplées au 6-carboxyfluorescéine (FAM), un fluorochrome rapporteur permettant la quantification en temps réel, grâce à un détecteur placé à l'intérieur du thermocycleur (Quant Studio 3, ThermoFisher Scientific, US). L'expression du gène de référence GAPDH humain (Hs02758991\_g1) est également mesurée pour quantifier de manière relative l'expression des gènes d'intérêt. Une dilution au 20<sup>ème</sup> des ADNc permet d'obtenir des échantillons à une concentration de 50ng/µL. Le mélange réactionnel comprend 10µL du Sensifast probe HiRox mix (Bioline Meridian Biosciences, UK), 1µL de la sonde Taqman correspondante, 1µL d'ADNc et 8µL d'eau ultrapure. Les conditions de q-PCR suivantes ont été appliquées : les premières 2 minutes à 95°C, suivie de deux cycles (10 sec à 95°C (Dénaturation) et 30 sec à 60°C (Hybridation-Elongation)), tous répétés 40 fois. La méthode de quantification est relative au gène de référence, donc les résultats sont un ratio entre deux valeurs. La valeur « Ct » (Cycle threshold), du gène de référence ou du gène cible, représente le nombre de cycles PCR nécessaires pour obtenir une quantité d'ADN significative correspondant à un signal lisible par le détecteur. Quel que soit le test, le gène de référence doit avoir toujours la même « Ct » vu la stabilité de leur niveau de transcription. Pour s'affranchir des variations possibles, pour

chaque gène cible, est calculée la valeur «  $\Delta Ct$  » = « Ct cible - Ct gène de référence » au cours du même test.

Ensuite, pour comparer les tests entre eux, il faut comparer les valeurs de «  $\Delta Ct$  » des gènes cibles et leurs contrôles par la valeur «  $\Delta\Delta Ct$  » = «  $\Delta Ct$  test -  $\Delta Ct$  contrôle ». La valeur «  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  » permet de calculer les variations du niveau de transcription correspondant au nombre de fois où un gène est surexprimé ou sous-exprimé pour un test précis en comparant à un test référence (dans ce cas, le pool de B normaux). Une valeur de «  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  » supérieure à 1 signifie une surexpression du gène cible, une valeur inférieure à 1 signifie une sous-expression du gène cible, et une valeur égale à 1 signifie que l'expression n'a pas changé.

## 2-5. Analyse des expressions de surface et totale par cytométrie en flux

Pour les marquages de surface des LCLs,  $5 \times 10^5$  cellules par test ont été collectées et lavées avec du PBS. Elles ont ensuite été marquées par les anticorps conjugués à la PE, pendant 20 minutes à l'obscurité et à température ambiante (les anticorps dirigés vers le CMH : anti-HLA-ABC, -HLAE et HLA-DR, ainsi que ceux dirigés vers les points de contrôle : anti-PDL1, -PDL2, -CD80, -CD86, -B7-H3, -B7-H4, -CD112, -CD115, -HVEM, -CEACAM1, -galectine-3 et -galectine-9 ; et les dilutions utilisées sont répertoriés dans le Tableau 1 supplémentaire, de même que leurs contrôles isotypiques), tous ont été utilisés couplés à la PE afin de pouvoir comparer les niveaux d'expression). Pour le marquage total, suite au marquage membranaire, les cellules ont été fixées et perméabilisées à l'aide du réactif de perméabilisation IntraPrep (Beckman Coulter, Pasadena, CA), selon le protocole recommandé par le fournisseur, et incubées avec les anticorps aux mêmes concentrations.

Pour le pool de cellules B normales (cellules de référence), des tubes de sang périphérique total ont été fournis par le service Hématologie du CHU de Limoges, après consentement écrit de tous les individus. Les globules rouges ont été lysés (*Versalyse* - Beckman Coulter, Pasadena, CA) et les mêmes protocoles de marquage par les anticorps ont été appliqués en ajoutant un marquage par un anticorps d'identification des lymphocytes B (anti-CD19 répertorié dans le tableau 1, un marquage par l'APC a été employé de manière à ne pas nécessiter de compensation avec le marquage PE des CMH et des points de contrôle).

Les analyses ont été réalisées sur le cytomètre en flux FACSCalibur (Becton Dickison, USA). Les résultats ont été analysés avec le logiciel Kaluza Analysis 2.1. Le taux d'expression a été calculé par le rapport de l'intensité moyenne de fluorescence de chaque point de contrôle normalisé à son contrôle isotypique.

## 2-6. Traitement des cellules par les formules vLMW-F

Les cellules ont été ensemencées dans des plaques de 12 puits ( $5 \times 10^5$  cellules/puit) pendant 24h puis traitées ou non (témoin) par 100 $\mu$ g/mL du fucoïdane natif de *Fucus vesiculosus* (Sigma) ou les formules vLMW-F (F1 ou F2) obtenues par dépolymérisation. Après 48h de culture, elles ont été collectées et lavées avec du PBS, puis le marquage de surface des points de contrôle inhibiteurs PD-L2, CD80 et CD86, ou le marquage total des galectines -3 et -9 ont été réalisés comme décrit dans le paragraphe 2.5.

## 3- Résultats

Les résultats sont présentés selon trois parties. La première porte sur l'expression transcriptionnelle par RT-qPCR des points de contrôle inhibiteurs (celles des CMH restant à réaliser). La seconde concerne l'expression protéique membranaire et totale des CMH et des points de contrôles inhibiteurs. La troisième est consacrée à l'étude de l'effet des formules vLMW-F (F1 ou F2) sur les points de contrôles inhibiteurs montré comme étant surexprimés chez les lymphocytes B en latence III de l'EBV.

### 3-1. Expression transcriptionnelle des points de contrôle inhibiteurs

#### 3-1. a) Etude de l'expression transcriptionnelle des points de contrôle inhibiteurs

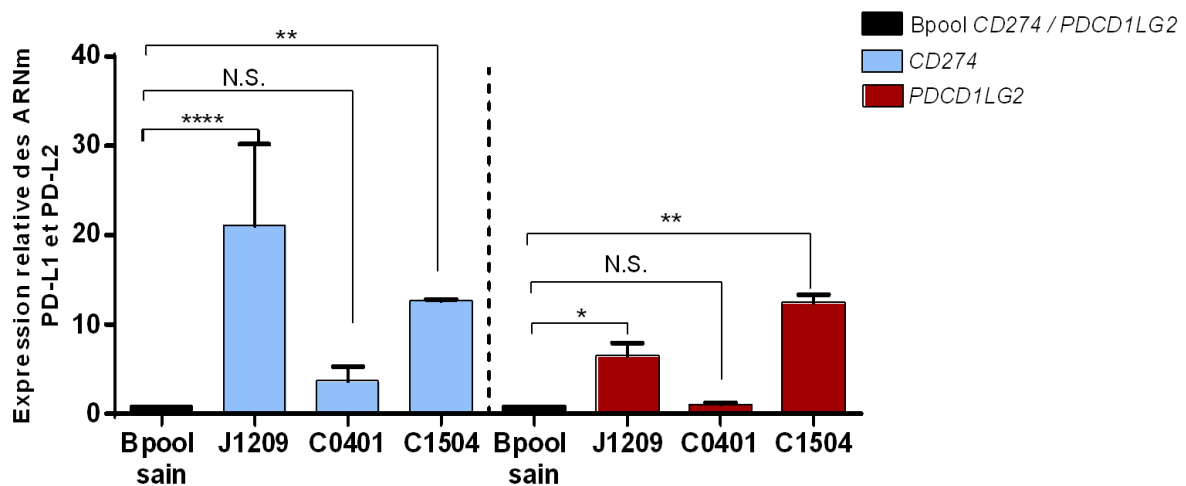
L'étude de l'expression transcriptionnelle (ARNm) des points de contrôle inhibiteurs a été réalisée par RT-qPCR, pour les trois LCLs (lymphocytes B en latence III de l'EBV) : J1209, C0401, C1504. La référence choisie est un pool de lymphocytes B sains provenant de trois échantillons de sang d'individus sains isolés par immunosélection négative, ce qui permet de quantifier en valeur relative l'expression des ARNm. Le gène de référence utilisé est le gène de la GAPDH, exprimé de manière constitutive par les cellules B.

PD-L1 a été intégré comme contrôle positif (surexprimé dans les B en latence III de l'EBV). Dans un premier temps sont présentés les résultats pour les points de contrôle de la famille B7, en les regroupant par rapport à leurs récepteurs inhibiteurs majeurs communs, lorsqu'ils sont identifiés (PD-L1 et PD-L2, ligands pour PD-1 ; CD80 et CD86, ligands pour CTLA-4 ; B7-H3 et B7-H4, ligands non formellement établis). Puis sont présentés les résultats pour CD112 et CD115 (ligands communs pour TIGIT et CD112R pour CD112), CEACAM1 (ligand pour TIM-3) HVEM (ligand pour BTLA), et les molécules de la famille des galectines : galectine-3

(ligand pour LAG-3) et galectine-9 (ligand pour TIM-3). Enfin, l'analyse de l'ensemble des résultats obtenus est réalisée.

### 3-1. a) i- Famille des protéines B7

#### 3-1. a) i- 1. PD-L1 et PD-L2 : ligands pour PD-1

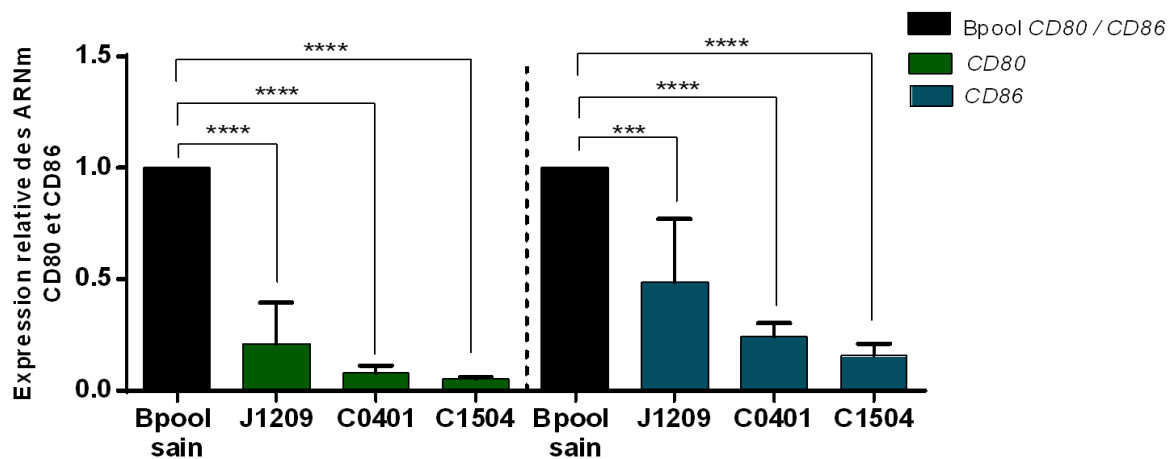


**Figure 38. Expression relative des ARNm de PD-L1 et de PD-L2 pour les LCLs**

L'expression relative des ARNm de PD-L1 et de PD-L2 a été étudiée chez les trois lignées de LCLs J1209, C0401 et C1504, en utilisant *GAPDH* comme gène de référence et en prenant comme référence cellulaire un pool de lymphocytes B d'individus sains. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types des moyennes de trois expériences indépendantes.

Test statistique : Two-way ANOVA (\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; \*\*\*\* :  $p < 0,0001$  ; N.S. : Non Significatif).

3-1. a) i- 2. CD80 et CD86 : ligands pour CTLA-4

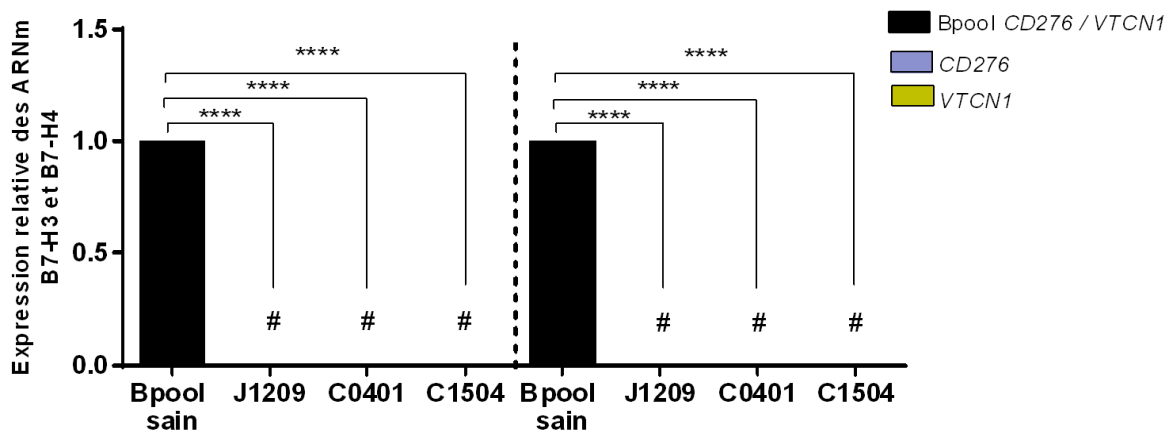


**Figure 39. Expression relative des ARNm de CD80 et de CD86 pour les LCLs**

L'expression relative des ARNm de CD80 et de CD86 a été étudiée chez les trois lignées de LCLs J1209, C0401 et C1504, en utilisant *GAPDH* comme gène de référence et en prenant comme référence cellulaire un pool de lymphocytes B d'individus sains. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types des moyennes de trois expériences indépendantes.

Test statistique : Two-way ANOVA (\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; \*\*\*\* :  $p < 0,0001$  ; N.S. : Non Significatif).

3-1. a) i- 3. B7-H3 et B7-H4

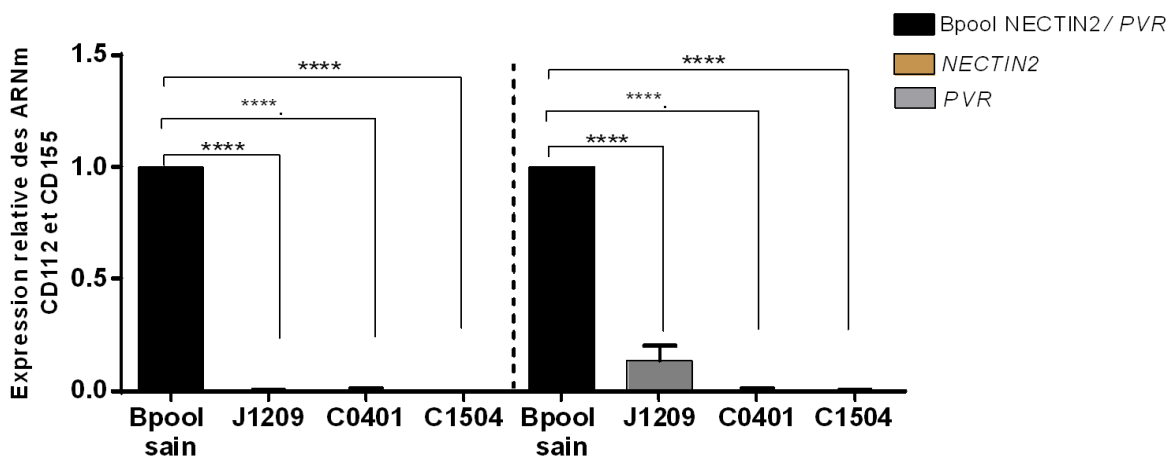


**Figure 40. Expression relative des ARNm de B7-H3 et de B7-H4 pour les LCLs**

L'expression relative des ARNm de B7-H3 et de B7-H4 a été étudiée chez les trois lignées de LCLs J1209, C0401 et C1504, en utilisant *GAPDH* comme gène de référence et en prenant comme référence cellulaire un pool de lymphocytes B d'individus sains. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types des moyennes de trois expériences indépendantes.

Test statistique : Two-way ANOVA (\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; \*\*\*\* :  $p < 0,0001$  ; N.S. : Non Significatif) ; # : non détecté.

3-1. a) ii- Famille des Nectines : CD112 et CD155 ligands communs pour TIGIT

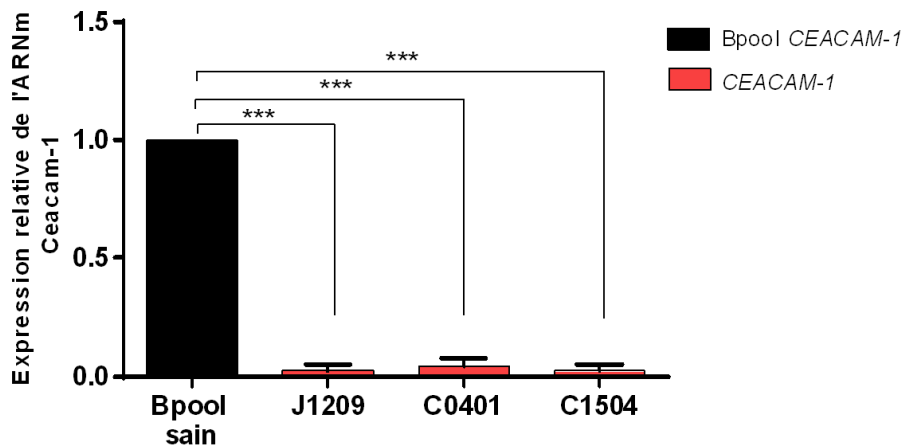


**Figure 41. Expression relative des ARNm de CD112 et de CD155 pour les LCLs**

L'expression relative des ARNm de CD112 et de CD155 a été étudiée chez les trois lignées de LCLs J1209, C0401 et C1504, en utilisant *GAPDH* comme gène de référence et en prenant comme référence cellulaire un pool de lymphocytes B d'individus sains. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types des moyennes de trois expériences indépendantes.

Test statistique : Two-way ANOVA (\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; \*\*\*\* :  $p < 0,0001$  ; N.S. : Non Significatif).

3-1. a) iii- Famille des CEA : CEACAM-1 ligand pour TIM-3

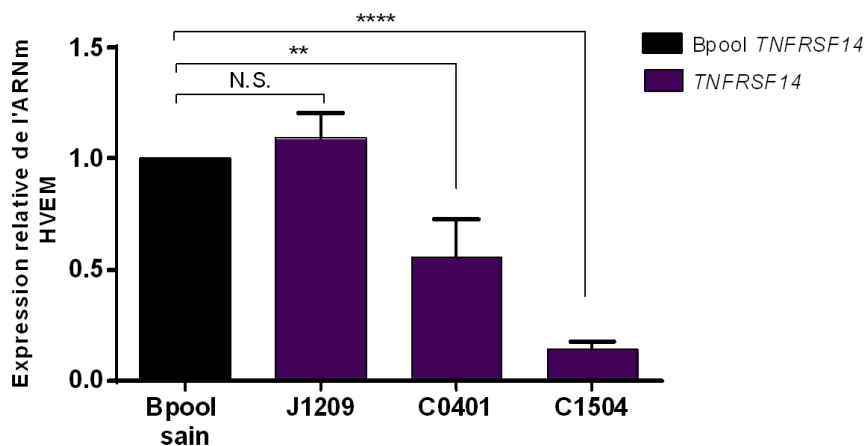


**Figure 42. Expression relative des ARNm de CEACAM-1 pour les LCLs**

L'expression relative des ARNm de CEACAM-1 a été étudiée chez les trois lignées de LCLs J1209, C0401 et C1504, en utilisant *GAPDH* comme gène de référence et en prenant comme référence cellulaire un pool de lymphocytes B d'individus sains. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types des moyennes de trois expériences indépendantes.

Test statistique : Two-way ANOVA (\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; \*\*\*\* :  $p < 0,0001$  ; N.S. : Non Significatif).

3-1. a) iv- Famille des TNFR : HVEM ligand pour BTLA



**Figure 43. Expression relative des ARNm de HVEM pour les LCLs**

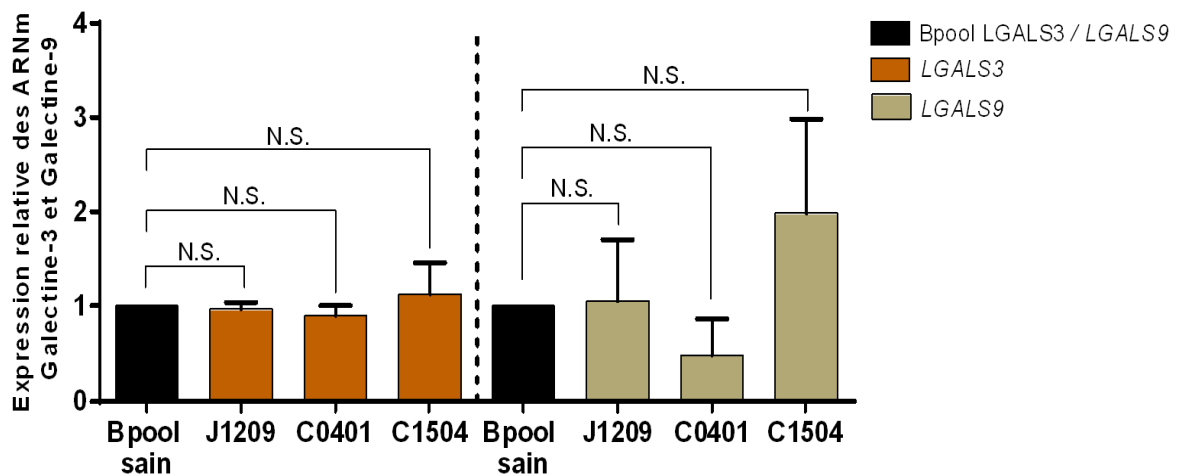
L'expression relative des ARNm de HVEM a été étudiée chez les trois lignées de LCLs J1209, C0401 et C1504, en utilisant *GAPDH* comme gène de référence et en prenant comme référence cellulaire un pool de lymphocytes B d'individus sains. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types des moyennes de trois expériences indépendantes.

Test statistique : Two-way ANOVA (\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; \*\*\*\* :  $p < 0,0001$  ; N.S. : Non Significatif).



3-1. a) v- Famille des Lectines :

Galectine-3 ligand pour LAG-3 et Galectine-9 ligand pour TIM-3



**Figure 44. Expression relative des ARNm de Galectine-3 et de Galectine-9 pour les LCLs**

L'expression relative des ARNm de Galectine-3 et de Galectine-9 a été étudiée chez les trois lignées de LCLs J1209, C0401 et C1504, en utilisant *GAPDH* comme gène de référence et en prenant comme référence cellulaire un pool de lymphocytes B d'individus sains. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types des moyennes de trois expériences indépendantes.

Test statistique : Two-way ANOVA (\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; \*\*\*\* :  $p < 0,0001$  ; N.S. : Non Significatif).

3-1. b) Analyse des expressions transcriptionnelles

Concernant les points de contrôles inhibiteurs de la famille B7, nous observons une augmentation de l'expression transcriptionnelle de PD-L1 et PD-L2, cependant elle n'est significativement augmentée que pour deux LCLs sur trois par rapport aux B normaux (Figure 38), ce qui souligne l'hétérogénéité dans la régulation de l'expression. Les expressions de CD80 et CD86 montrent pour les trois lignées une expression existante mais diminuée par rapport aux B normaux, et ce de manière significative (Figure 39). Enfin, les ARNm de B7-H3 et B7-H4 ne sont pas détectés chez les lymphocytes B en latence III de l'EBV (Figure 40).

Pour les autres points de contrôle, il existe également globalement une régulation négative par rapport aux lymphocytes B normaux : CD112 et CD155 présentent une très faible expression transcriptionnelle (sauf pour le CD155 chez la LCL J1209) (Figure 41).

Tout comme pour CD112 et CD155, nous observons une baisse significative de CEACAM-1, ligand pour TIM-3, dans toutes les lignées de latence III de l'EBV (Figure 42).

Concernant HVEM, ligand de BTLA, nous observons une baisse significative de ce point de contrôle dans toutes les lignées de latence III de l'EBV, sauf la lignée J1209. Nous constatons que les lignées de latence III de l'EBV présentent une très faible expression transcriptionnelle de HVEM en comparant avec le pool de lymphocytes B normaux (Figure 43).

Nous montrons qu'il n'y a pas de différence significative de l'expression relative de Galectine-3 (ligand pour LAG-3) et Galectine-9 (ligand pour TIM-3) entre toutes les lignées de latence III de l'EBV et la référence cellulaire (pool de lymphocytes B normaux) (Figure 44).

### 3-2. Expressions protéiques totale et membranaire des CMH et points de contrôle inhibiteurs

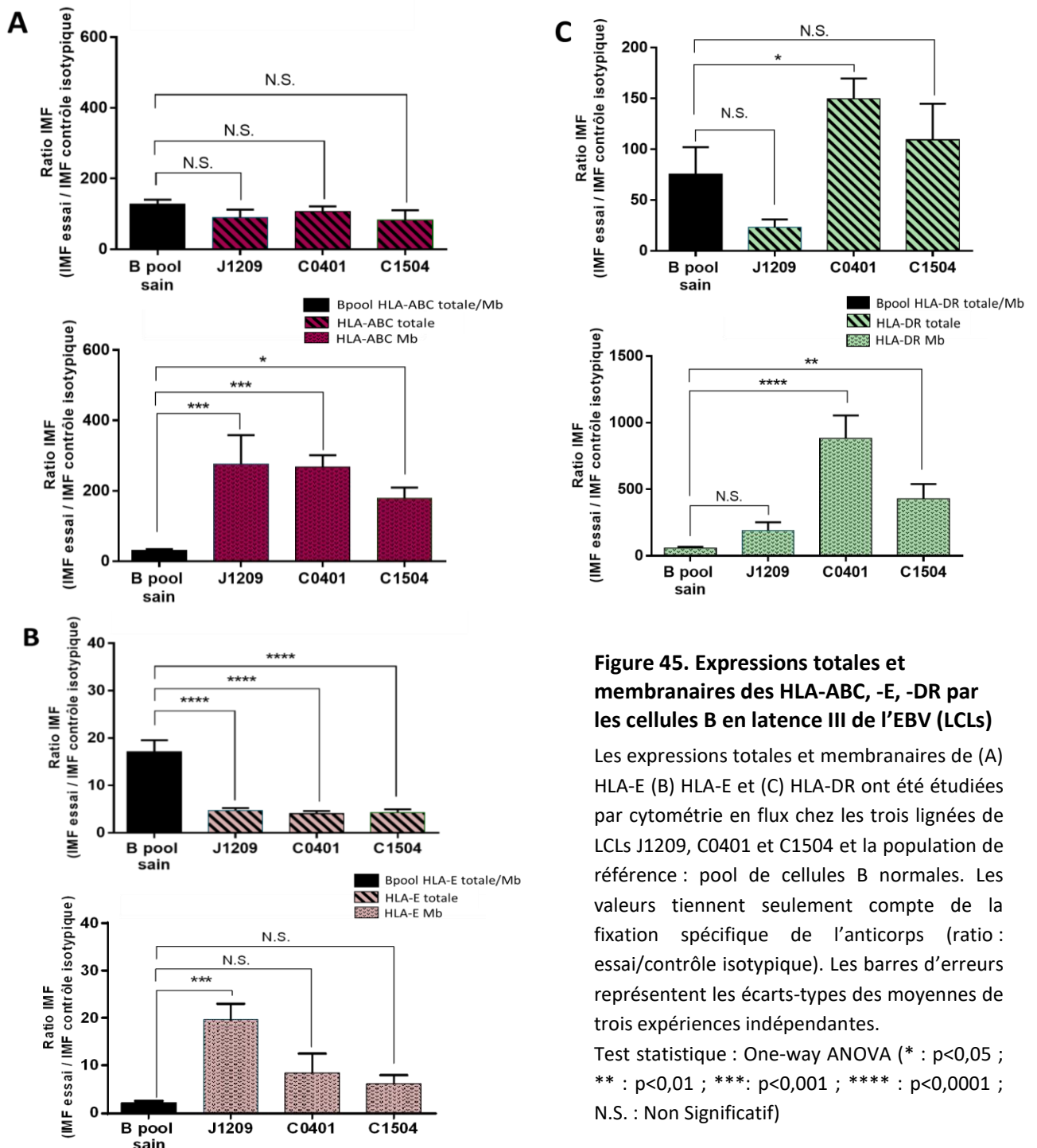
Compte-tenu de la régulation traductionnelle, l'expression transcriptionnelle ne peut être directement mise en relation avec l'expression protéique. Les molécules actives dans la régulation immune sont de plus parfois stockées au niveau intracellulaire de manière à être rapidement mobilisables ou sécrétées. Par ailleurs, il existe une régulation du trafic membranaire qui peut moduler le niveau d'expression des molécules à la surface des cellules sans lien direct avec la concentration intracellulaire, ce qui leur permet de jouer leur rôle de ligand vis-à-vis de leurs récepteurs cibles. Nous avons ainsi étudié le niveau d'expression protéique total ou membranaire par cytométrie en flux de différentes protéines du CMH de classe I et de classe II, ainsi que les points de contrôle inhibiteurs.

Concernant les protéines du CMH de classe I nous avons étudié l'expression des HLA (Human Leucocyte Antigen) classiques : HLA-ABC, permettant d'une part la présentation des peptides antigénique aux cellules T CD8<sup>+</sup> via le TCR et pouvant d'autre part interagir avec les récepteurs inhibiteurs des NK (KIR, ILT (Immunoglobulin-Like Transcript) et CRL (Calcitonine Receptor-Like)). Nous avons également analysé l'expression du HLA non classique le plus étudié : HLA-E, qui peut présenter des peptides non canoniques *via* les molécules NKG2 aux cellules T ou NK (NKG2A et D inhibiteurs et NKG2B et C, activateurs). Pour les protéines du CMH de classe II nous avons étudié l'expression du HLA classique le plus déterminant : HLA DR, permettant la présentation des peptides antigénique aux cellules T CD4<sup>+</sup> *via* le TCR et décrit comme pouvant inhiber les NK par interaction avec FCRL6. Enfin, nous avons étudié l'expression des points de contrôle inhibiteurs PD-L1, PD-L2, CD80, CD86, B7-H3, B7-H4, CD112, CD115, CEACAM-1, HVEM, galectine-3 et galectine -9.

L'étude a porté sur les trois LCLs J1209, C0401 et C1504. Le niveau d'expression de référence pris en compte est celui des lymphocytes B normaux. Il est possible de comparer les intensités de fluorescence entre les différents marqueurs, le même fluorochrome étant employé. Par contre, les valeurs ne sont pas comparables entre les analyses d'expression totales et

membranaires, dans la mesure où les protocoles de marquages sont différents (avec ou sans perméabilisation). Les données ont été normalisées en réalisant le ratio entre l'intensité de fluorescence moyenne de l'essai et celle du contrôle isotypique (expression spécifique à partir de la valeur 1).

3-2. A- a) Etude des expressions protéiques totale et membranaire des CMH



**Figure 45. Expressions totales et membranaires des HLA-ABC, -E, -DR par les cellules B en latence III de l'EBV (LCLs)**

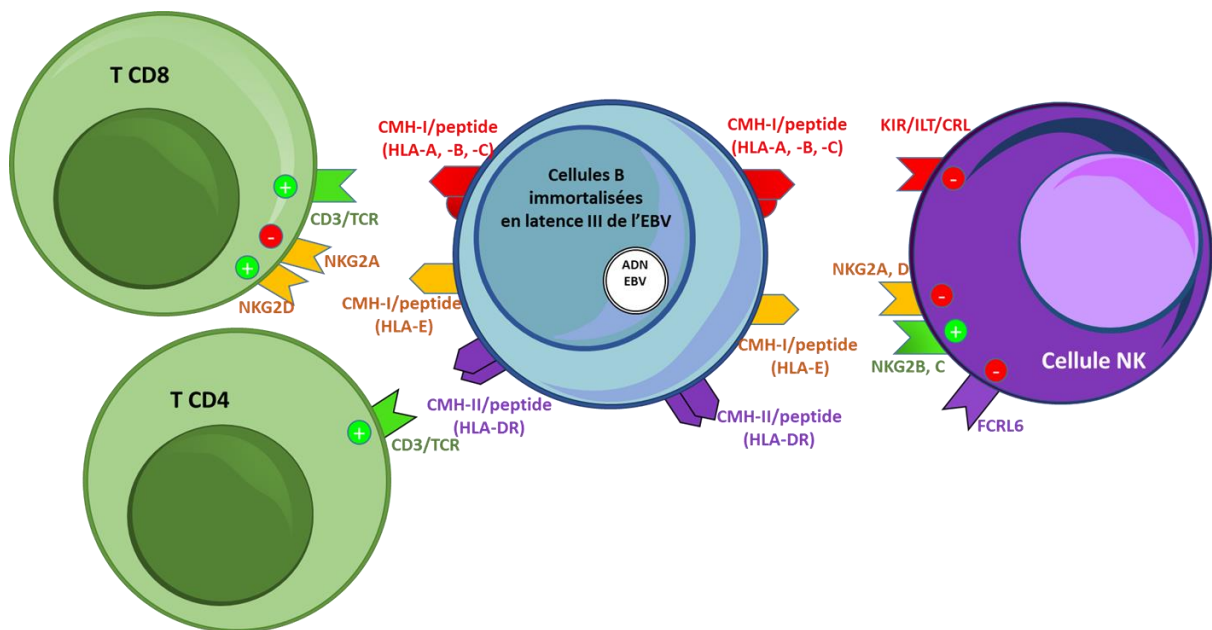
Les expressions totales et membranaires de (A) HLA-E (B) HLA-E et (C) HLA-DR ont été étudiées par cytométrie en flux chez les trois lignées de LCLs J1209, C0401 et C1504 et la population de référence : pool de cellules B normales. Les valeurs tiennent seulement compte de la fixation spécifique de l'anticorps (ratio : essai/contrôle isotypique). Les barres d'erreurs représentent les écarts-types des moyennes de trois expériences indépendantes.

Test statistique : One-way ANOVA (\* : p<0,05 ; \*\* : p<0,01 ; \*\*\* : p<0,001 ; \*\*\*\* : p<0,0001 ; N.S. : Non Significatif)

### 3-2. A- b) Analyse des expressions protéiques totale et membranaire des CMH

Concernant les HLA de classe I, il est observé comme attendu une expression des HLA-ABC (toutes les cellules de l'immunité l'exprimant). Il n'y a pas de différence entre les lymphocytes B en latence III de l'EBV et les cellules B normales en ce qui concerne l'expression totale. Par contre, il y a une surexpression significative de l'expression membranaire pour les trois LCLs (Figure 45 - A). Par ailleurs, HLA-E présente une plus faible expression totale chez les LCLs mais une expression membranaire plus élevée chez les trois LCLs et ce de manière significative pour la lignée J1209 (Figure 45 - B). Pour HLA-DR, de même que pour les HLA-ABC, il est observé comme attendu une expression (expression par les cellules de type CPA auxquels appartiennent les lymphocytes B). Il n'y a pas de différence entre les lymphocytes B en latence III de l'EBV et les cellules B normales en ce qui concerne l'expression totale. Par contre, il y a une surexpression membranaire et elle est significative pour deux des trois LCLs (Figure 45 - C).

Bien qu'il puisse y avoir des variabilités dans les niveaux d'expression, l'ensemble de ces résultats met en évidence une augmentation de l'externalisation et de l'expression à la surface des cellules des molécules de HLA étudiées, par rapport aux cellules B normales. Elle ne dépend pas du niveau d'expression intracellulaire. L'augmentation de l'expression membranaire des molécules de HLA classiques HLA-ABC et HLA-DR, vont dans le sens d'une stimulation de la réponse T *via* les TCR (cellules CD8+ et CD4+, respectivement) et à l'opposé dans le sens d'une inhibition de la réponse NK (*via* les molécules KIR/ILT/CRLs et FCRL6, respectivement). En ce qui concerne l'augmentation de l'expression membranaire de HLA-E la réponse est plus ambiguë comme les récepteurs NKG2 activateurs ou inhibiteurs peuvent être présents à la surface des cellules T et NK, ce qui peut moduler dans un sens comme dans l'autre la réponse innée ou adaptative.

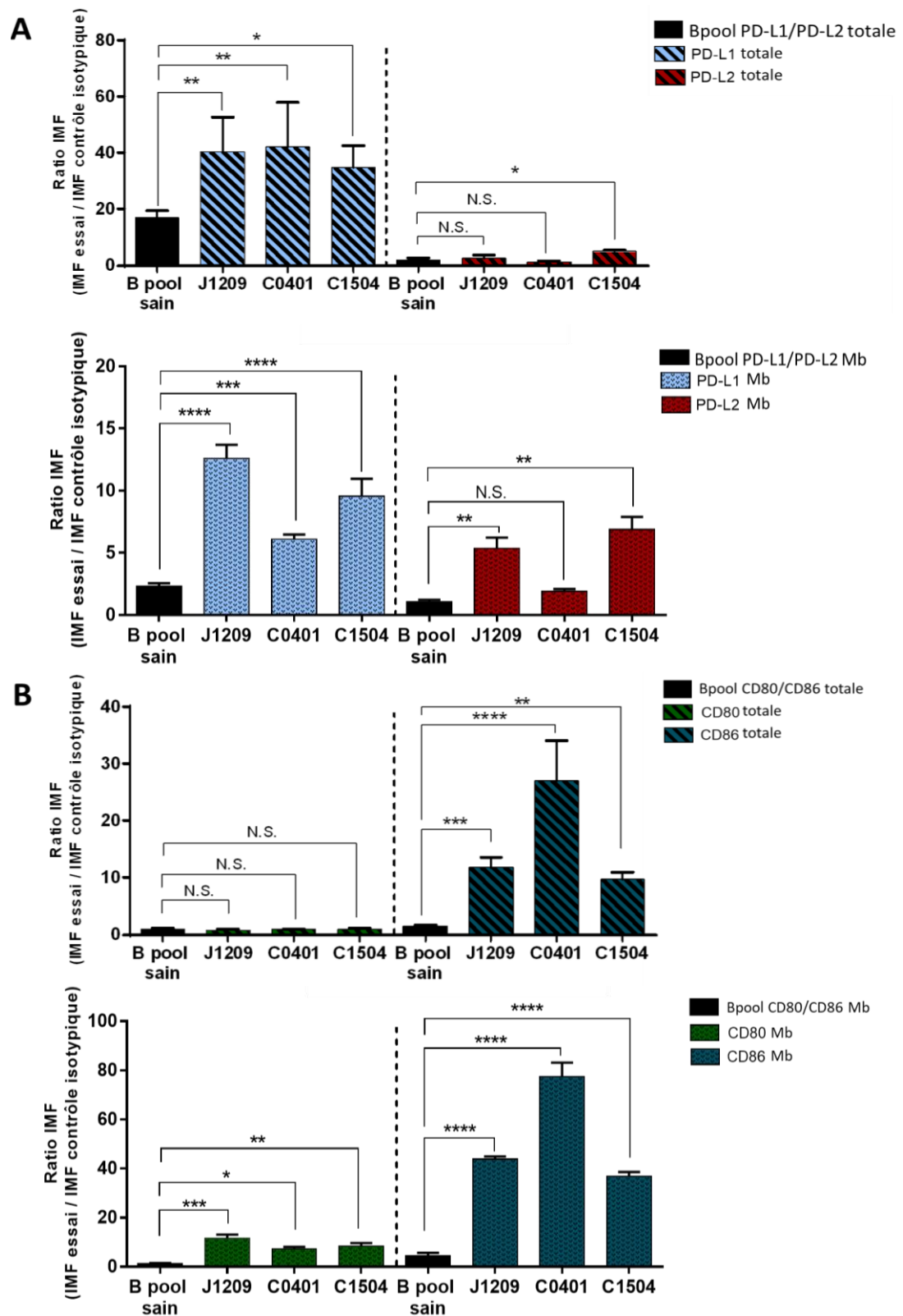


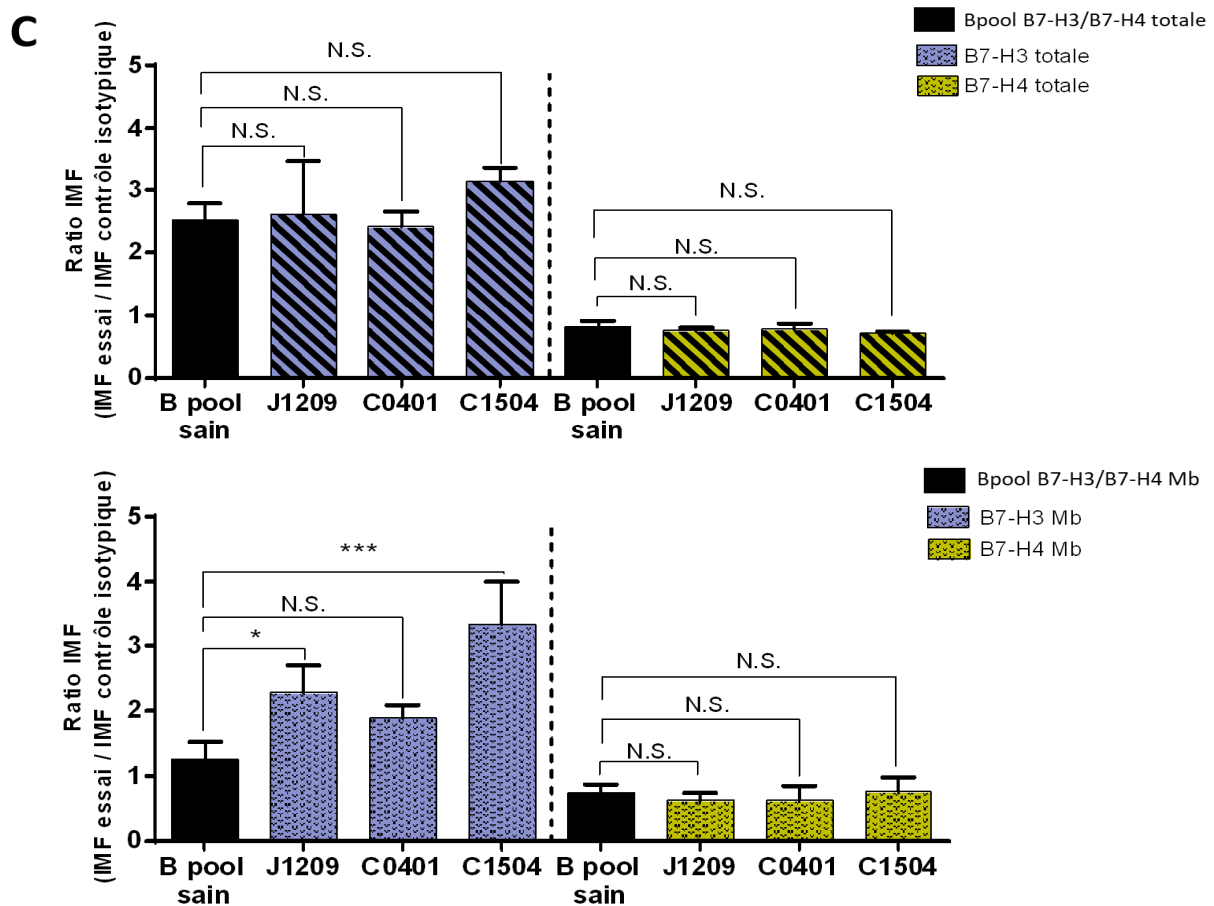
**Figure 46. Schéma présentant la régulation possible des cellules NK et T par les cellules B en latence III de l'EBV via les CMH de classes I et II.**

Les expressions membranaires de HLA-ABC (ligand pour KIR, ILT et CRL) et de HLA-E (ligand pour NKG2A ou D inhibiteurs) ainsi que HLA-DR (ligand pour FCRL6 inhibiteur) peut jouer un rôle dans l'inhibition de la réponse immune NK. A l'opposé, d'une part les expressions membranaires de HLA-ABC et HLA-DR peut activer les lymphocytes T CD4 et CD8 par leurs liaisons au TCR et contribuer à l'équilibre hôte/virus. D'autre part, l'expression membranaire de HLA-E est bidirectionnelle : elle peut soit activer les T CD8 par sa liaison à NKG2D ou les inhiber par sa liaison à NKG2A.

3-2. B- a) Etude des expressions protéiques totale et membranaire des points de contrôle inhibiteurs

3-2. B- a) i- Famille des protéines B7



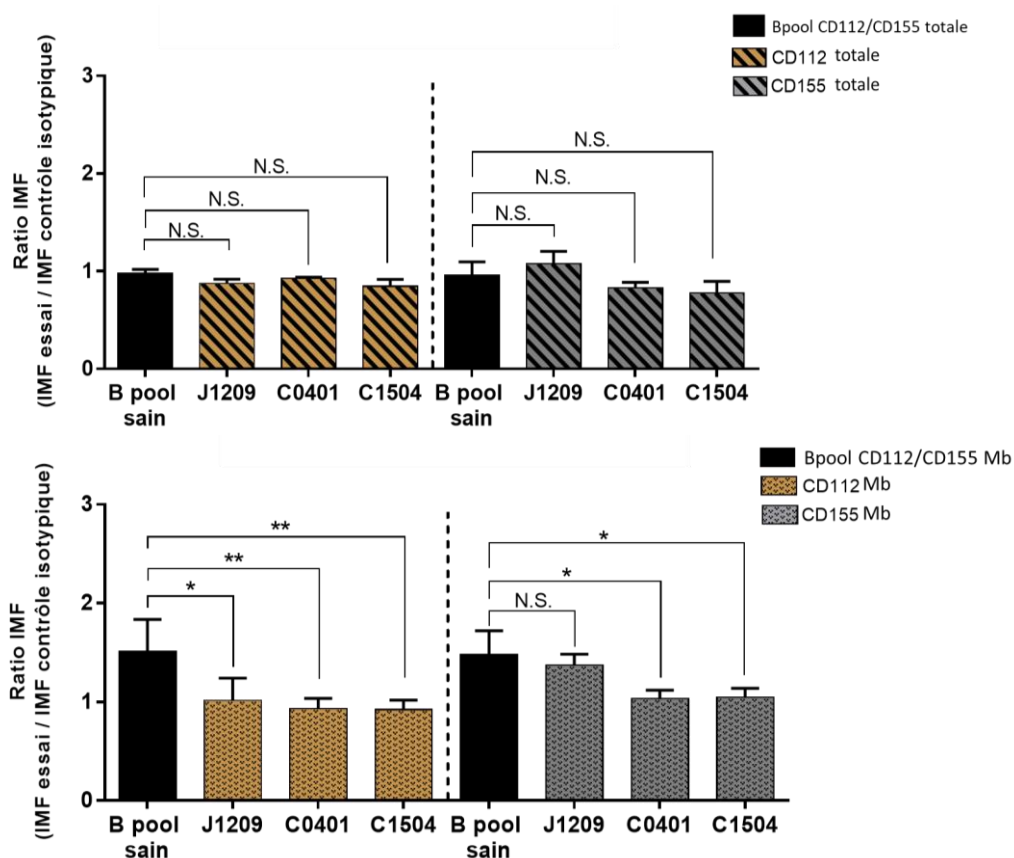


**Figure 47. Expressions totales et membranaires des points de contrôle de la famille des protéines B7 par les cellules B en latence III de l'EBV (LCLs)**

Les expressions totales et membranaires de (A) PD-L1 et PD-L2, (B) CD80 et CD86, (C) B7-H3 et B7-H4 ont été étudiées par cytométrie en flux chez les trois lignées de LCLs J1209, C0401 et C1504 et la population de référence : pool de cellules B normales. Les valeurs tiennent seulement compte de la fixation spécifique de l'anticorps (ratio : essai/contrôle isotypique). Les barres d'erreurs représentent les écarts-types des moyennes de trois expériences indépendantes.

Two-way ANOVA (\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; \*\*\*\* :  $p < 0,0001$  ; N.S. : Non Significatif).

3-2. B- a) ii- Famille des Nectines : CD112 et CD155 ligands communs pour TIGIT

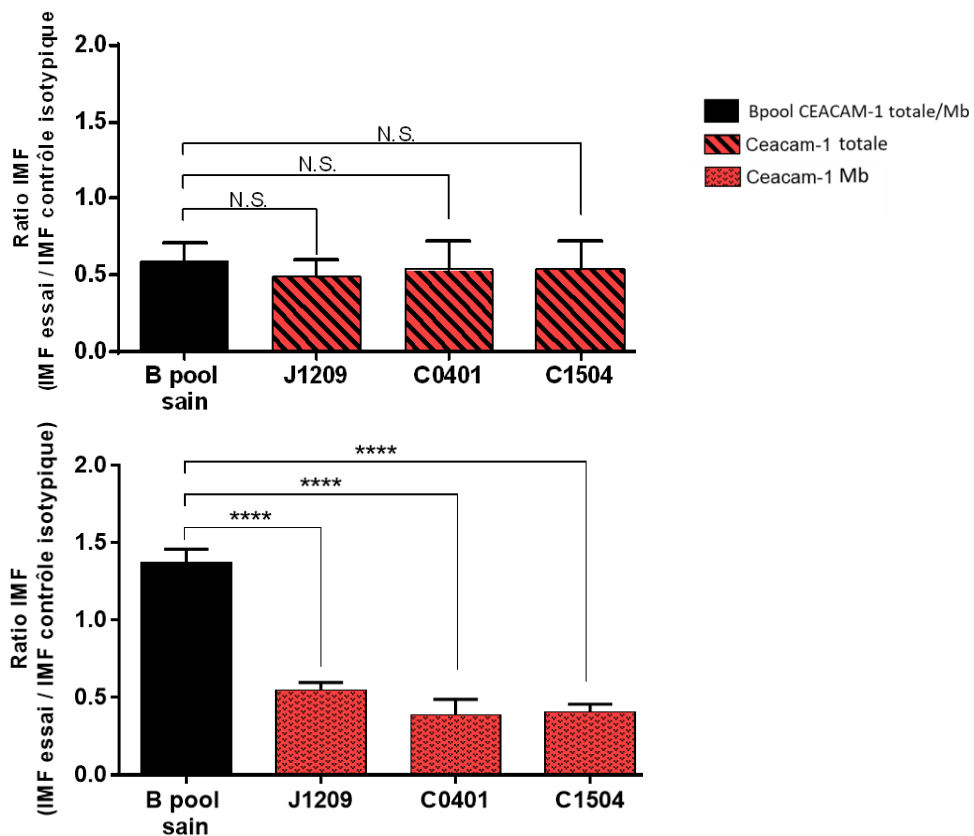


**Figure 48. Expressions totales et membranaires des points de contrôle de la famille des Nectines par les cellules B en latence III de l'EBV (LCLs)**

Les expressions totales et membranaires de CD112 et CD155 ont été étudiées par cytométrie en flux chez les trois lignées de LCLs J1209, C0401 et C1504 et la population de référence : pool de cellules B normales. Les valeurs tiennent seulement compte de la fixation spécifique de l'anticorps (ratio : essai/contrôle isotypique). Les barres d'erreurs représentent les écarts-types des moyennes de trois expériences indépendantes. Two-way ANOVA (\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; \*\*\*\* :  $p < 0,0001$  ; N.S. : Non Significatif).



3-2. B- a) iii- Famille des CEA : CEACAM-1 ligand pour TIM-3

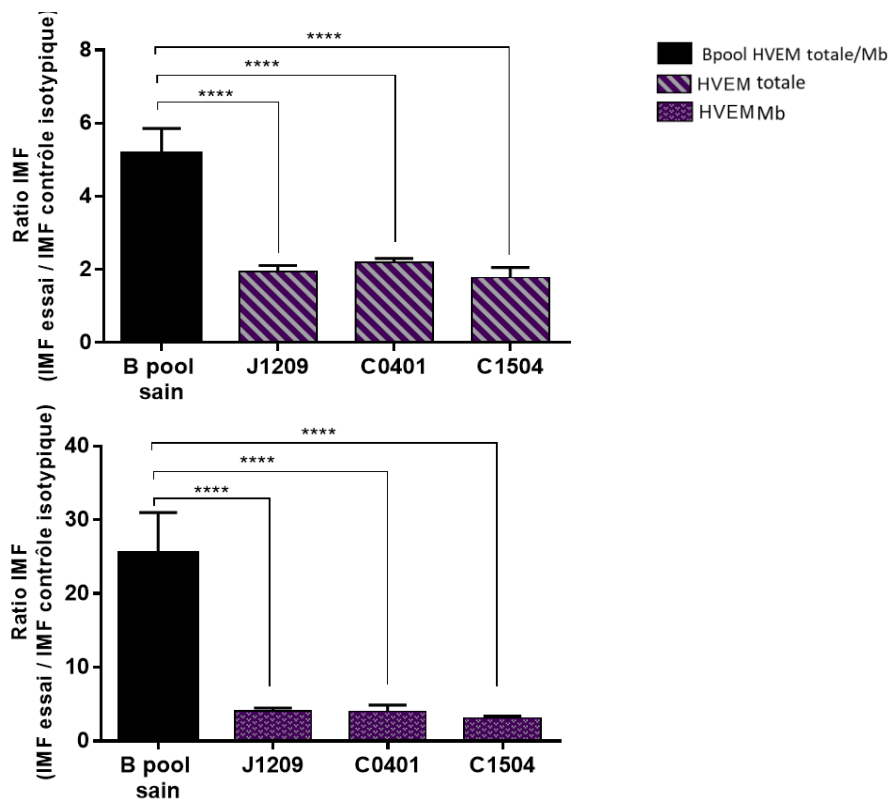


**Figure 49. Expressions totales et membranaires de CEACAM-1 de la famille des CEA par les cellules B en latence III de l'EBV (LCLs)**

Les expressions totale et membranaire de CEACAM-1 ont été étudiées par cytométrie en flux chez les trois lignées de LCLs J1209, C0401 et C1504 et la population de référence : pool de cellules B normales. Les valeurs tiennent seulement compte de la fixation spécifique de l'anticorps (ratio : essai/contrôle isotypique). Les barres d'erreurs représentent les écarts-types des moyennes de trois expériences indépendantes.

One-way ANOVA (\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; \*\*\*\* :  $p < 0,0001$  ; N.S. : Non Significatif).

3-2. B- a) iv- Famille des TNFR : HVEM ligand pour BTLA



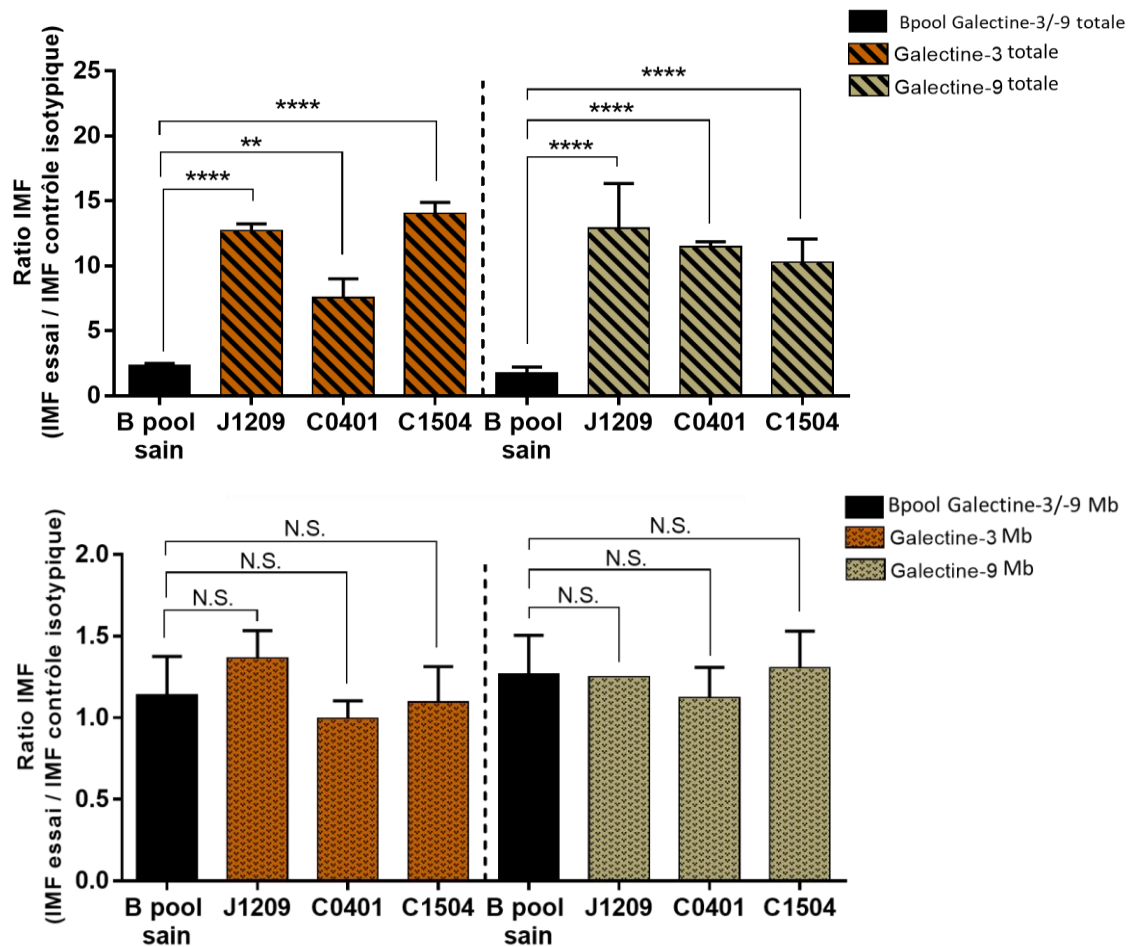
**Figure 50. Expressions totales et membranaires de HVEM de la famille des TNFR par les cellules B en latence III de l'EBV (LCLs)**

Les expressions totale et membranaire de HVEM ont été étudiées par cytométrie en flux chez les trois lignées de LCLs J1209, C0401 et C1504 et la population de référence : pool de cellules B normales. Les valeurs tiennent seulement compte de la fixation spécifique de l'anticorps (ratio : essai/contrôle isotypique). Les barres d'erreurs représentent les écarts-types des moyennes de trois expériences indépendantes.

One-way ANOVA (\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; \*\*\*\* :  $p < 0,0001$  ; N.S. : Non Significatif).

3-2. B- a) v- Famille des Lectines :

Galectine-3 ligand pour LAG-3 et Galectine-9 ligand pour TIM-3



**Figure 51. Expressions totales et membranaires des points de contrôle de la famille des Lectines par les cellules B en latence III de l'EBV (LCLs)**

Les expressions totales et membranaires de Galectine-3 et Galectine-9 ont été étudiées par cytométrie en flux chez les trois lignées de LCLs J1209, C0401 et C1504 et la population de référence : pool de cellules B normales. Les valeurs tiennent seulement compte de la fixation spécifique de l'anticorps (ratio : essai/contrôle isotypique). Les barres d'erreurs représentent les écarts-types des moyennes de trois expériences indépendantes. Two-way ANOVA (\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; \*\*\*\* :  $p < 0,0001$  ; N.S. : Non Significatif).

### 3-2. B- b) Analyse des expressions protéiques totale et membranaire des points de contrôle inhibiteurs

En ce qui concerne les molécules de la famille B7, comme attendu et selon les résultats déjà publiés par le laboratoire, les expressions totale et membranaire de PD-L1 sont significativement augmentées chez les lymphocytes B en latence III de l'EBV, par rapport aux lymphocytes B normaux. PD-L2 présente une faible expression totale par comparaison à PD-L1, mais son expression membranaire est également augmentée, et ce de manière significative pour 2 lignées sur 3 (Figure 47 - A). Les points de contrôle CD80 et CD86 sont surexprimés au niveau membranaire, avec une expression nettement plus élevée pour CD86, qui s'accompagne de plus pour ce dernier d'une augmentation significative de l'expression totale (Figure 47 - B). De manière surprenante, pour B7-H3 dont nous n'avons pas pu mettre en évidence l'expression transcriptionnelle (sans doute compte-tenu de son très faible niveau), nous montrons une expression, elle est significativement augmentée au niveau membranaire pour les lignées par rapport aux B normaux, même si elle est faible. En ce qui concerne B7H4 il y a absence d'expression (ratio = 1) (Figure, 47 - C). CD112, CD155 (Figure 48), CEACAM1 (Figure 49) et HVEM (Figure 50) ne sont pas exprimés non plus ou ont des niveaux d'expression totaux ou membranaires qui ne montrent pas d'augmentation par rapport aux cellules B normales. Enfin, de manière intéressante, les galectines-3 et -9 qui sont des molécules inhibitrices fréquemment sécrétées, même si elles ne sont pas exprimées à la surface cellulaire, présentent des niveaux d'expression intracellulaires très significativement augmentés chez les B en latence III de l'EBV (Figure 51).

Globalement, les points de contrôles inhibiteurs retrouvés les plus exprimés à la surface des lymphocytes B en latence III de l'EBV et susceptibles d'interagir directement avec les récepteurs inhibiteurs des lymphocytes T et les cellules NK, s'ils sont exprimés, sont : PD-L1, PD-L2, CD80, CD86 et dans une moindre mesure B7-H3. Par contre, B7-H4, CD112, CD115, CEACAM1 et HVEM ne semblent pas intervenir dans l'inhibition de la réponse des cellules de l'immunité. La Figure 52 est une représentation schématique des résultats obtenus.

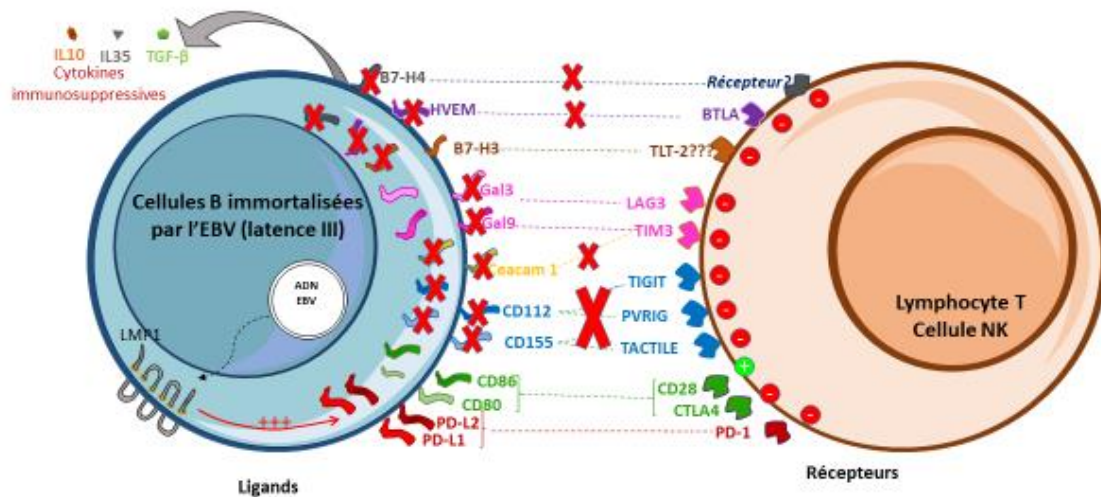


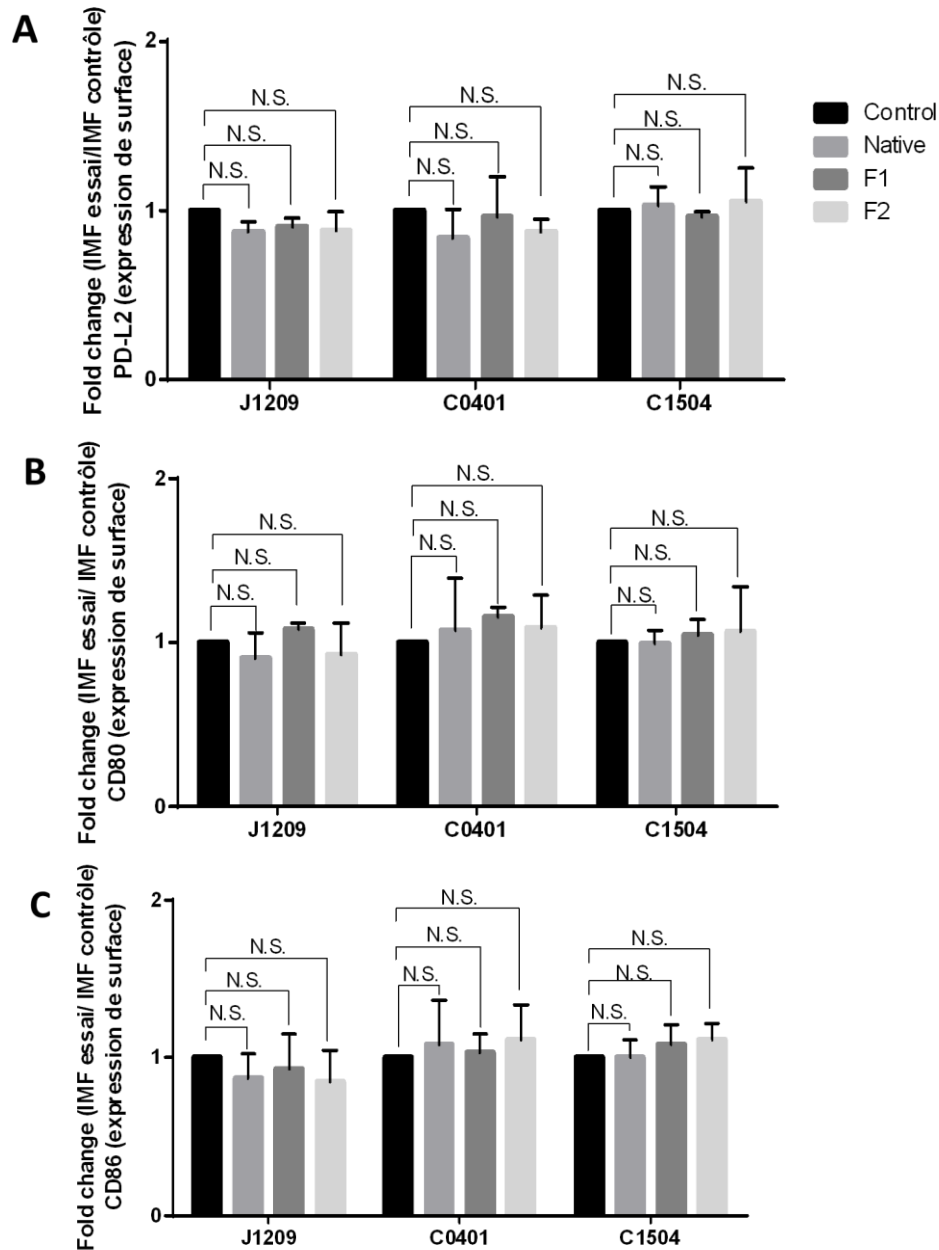
Figure 52. Schéma représentant les points de contrôle inhibiteurs surexprimés par les cellules B en latence III de l'EBV vis-à-vis des réponses immunes T et NK

### 3-3. Effet des formules vLMW-F (F1 ou F2) sur les points de contrôle inhibiteurs : résultats préliminaires

Suite aux résultats déjà obtenus montrant une baisse de l'expression membranaire de PD-L1 lors du traitement par les formules de vLMW-F, nous avons recherché si ces fractions pouvaient également baisser l'expression des autres points de contrôle inhibiteurs surexprimés chez les lymphocytes B en latence III de l'EBV (PD-L2, CD80, CD86, galectine-3 et galectine-9). L'étude a porté sur les trois lignées de LCLs : J1209, C0401, C1504 et le traitement appliqué a été le même que pour l'étude sur PD-L1 : 100 µg/mL de la forme native de fucoïdane ou de chacune des deux formules. L'expression a été étudiée au niveau membranaire pour PD-L1, CD80 et CD86, et total pour les galectines. Les résultats sont exprimés comme le rapport de l'intensité de fluorescence de chaque échantillon par rapport à celle des cellules non traitées (chacune étant normalisée par le contrôle isotypique).

3-3. a) Etude de l'effet des formules vLMW-F (F1 ou F2) sur les points de contrôle inhibiteurs

3-3. a) i- Famille des protéines B7

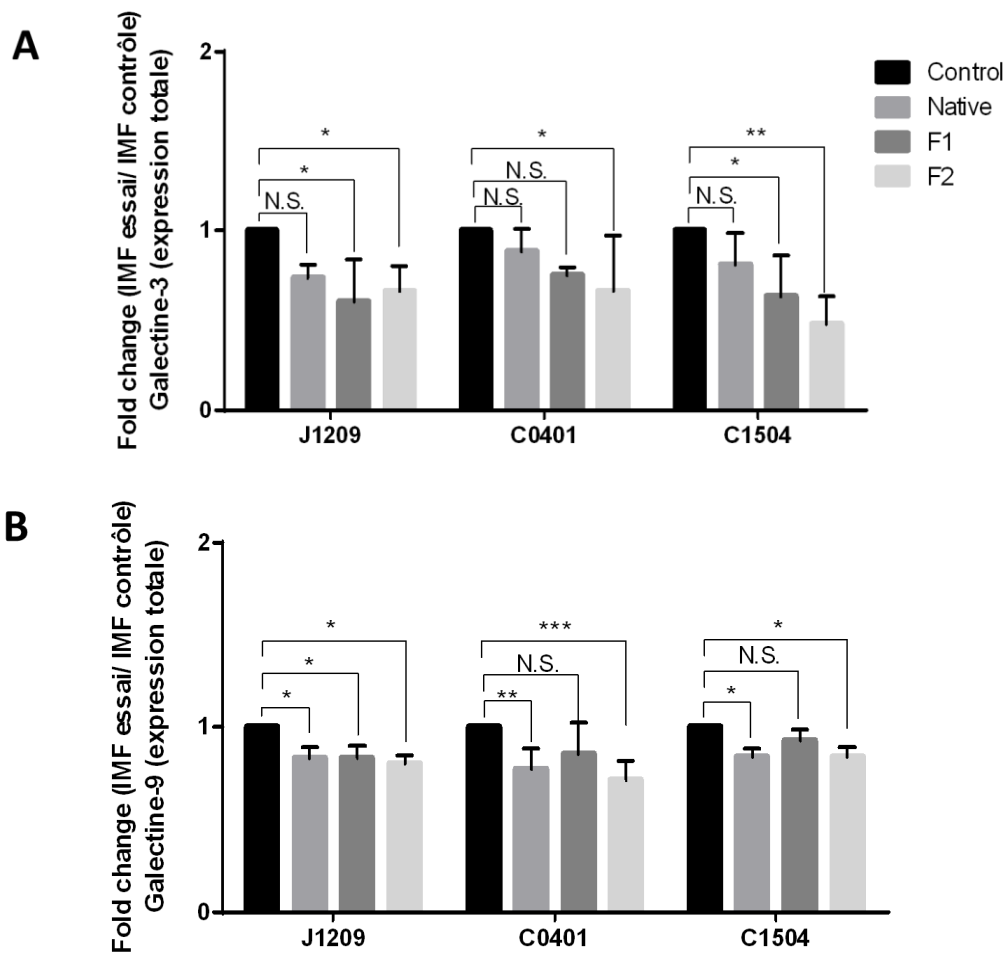


**Figure 53. Effet des formules vLMW-F sur l'expression de surface des points de contrôle de la famille des protéines B7 chez les cellules B en latence III de l'EBV (LCLs)**

Les cellules des trois lignées de LCLs : J1209, C0401 et C1504 ont été traitées par 100µg/mL du fucoïdane natif ou de chacune des deux fractions F1 et F2 pendant 48h, puis l'expression membranaire de (A) PD-L2, (B) CD80 ou (C) CD86 a été analysée par cytométrie en flux après immunomarquage. Les résultats sont exprimés comme l'intensité moyenne de fluorescence (normalisée par le contrôle isotypique) par rapport à celle des cellules non traitées (normalisée par le contrôle isotypique). Les barres d'erreurs représentent les écarts-types des moyennes de trois expériences indépendantes.

Two-way ANOVA (\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; \*\*\*\* :  $p < 0,0001$  ; N.S. : Non Significatif).

3-3. a) ii- Famille des Lectines



**Figure 54. Effet des formules vLMW-F sur l'expression de surface des points de contrôle de la famille des Lectines chez les cellules B en latence III de l'EBV (LCLs)**

Les cellules des trois lignées de LCLs : J1209, C0401 et C1504 ont été traitées par 100µg/mL du fucoïdane natif ou de chacune des deux fractions F1 et F2 pendant 48h, puis l'expression totale (membranaire et intracellulaire) de (A) Galectine-3 ou (B) Galectine-9 a été analysée par cytométrie en flux après immunomarquage avant (membranaire) et après perméabilisation des cellules. Les résultats sont exprimés comme l'intensité moyenne de fluorescence (normalisée par le contrôle isotypique) par rapport à celle des cellules non traitées (normalisée par le contrôle isotypique). Les barres d'erreurs représentent les écarts-types des moyennes de trois expériences indépendantes.

Two-way ANOVA (\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; \*\*\*\* :  $p < 0,0001$  ; N.S. : Non Significatif).

### 3-3. b) Analyse de l'effet des formules vLMW-F (F1 ou F2) sur les points de contrôle inhibiteurs

Les résultats montrent que le traitement des lymphocytes B en latence III de l'EBV par le fucoïdane natif ou les formules F1 ou F2 ne modifie par l'expression de surface des points de contrôle inhibiteurs PD-L2, CD80 ou CD86 (Figure 53). Par contre, certaines baisses significatives sont observées pour l'expression totale de la galectine 3, en particulier avec les formules F1 et F2 et pour la galectine-9, en particulier avec la fraction F2 (Figure 54).

## 4- Discussion

Concernant les molécules inhibitrices de la réponse immune exprimées par les lymphocytes B en latence III de l'EBV, nous avons mis en évidence la surexpression des molécules de HLA classique de classe I (HLA-A, B, C) et de classe II (HLA-DR), qui peut être responsable de l'inhibition de la réponse innée NK. Par ailleurs, la surexpression membranaire des points de contrôle inhibiteurs PD-L1, PD-L2, CD80, CD86 (et dans une moindre mesure B7-H3) peut être à l'origine de l'inhibition des réponses innée NK et adaptative T. Enfin, la surexpression intracellulaire des galectines-3 et -9 est également susceptible d'être associée à leur sécrétion et à l'inhibition des réponses anti-tumorales T et NK.

Les lymphocytes T cytotoxiques CD8<sup>+</sup> sont considérés comme ayant un rôle majeur dans le contrôle de l'infection par l'EBV, notamment envers les lymphocytes B en latence III de l'EBV, que ce soit lors de l'infection primaire ou lors de la réactivation. Ils reconnaissent différents antigènes de latence, en particulier EBNA 3A, 3B et 3C et de façon moins importante EBNA1, EBNA2, LMP2, EBNA-LP et LMP1 (Long et al., 2019b) ce qui peut conduire à la lyse des cellules infectées par production de perforine et de granzyme. Par ailleurs, la surexpression du récepteur pro-apoptotique Fas à leur surface, suite à l'activation constitutive de la voie NF- $\kappa$ B *via* LMP1 les sensibilise à la réponse T anti-EBV (axe Fas/FasL) (Le Clorenec et al., 2006). Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont mis en jeu de manière auxiliaire par rapport aux CD8<sup>+</sup> mais ils reconnaissent fortement la protéine EBNA1, faiblement reconnue par les CD8<sup>+</sup> (Nikiforow et al., 2001). EBNA2 et EBNA3 constituent également des cibles de la réponse T CD4<sup>+</sup> spécifique de l'EBV (Long et al., 2013; Nagy et al., 2012; Precopio et al., 2003). Leur activité cytotoxique s'exerce par la production de perforine et de granzyme mais également vis l'axe Fas/FasL (MacArthur et al., 2007; Nikiforow et al., 2001; Wilson and Morgan, 2002). Les cellules NK



peuvent jouer un rôle dans l'élimination des lymphocytes B en latence III de l'EBV. Ces derniers peuvent interagir avec leurs récepteurs activateurs NKp30, NKp44, NKp46 et NKG2D, ce qui induit leur effet cytotoxique par la libération de perforine et de granzyme (Chijioko et al., 2016; Tangye et al., 2017). Les cellules NK peuvent de plus agir de manière complémentaire à la réponse T (Biron et al., 1999; Williams et al., 2005) : elles peuvent activer les cellules T par libération d'IFN $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , ce qui peut les conduire à tuer les cellules de LCLs autologues (Wilson and Morgan, 2002).

Le contrôle des lymphocytes B en latence III de l'EBV par la réponse immune conduit normalement à un équilibre hôte/virus sans émergence de lymphome. Cependant, l'émergence de tumeurs associées à l'EBV chez des patients immunocompétents met en évidence la possibilité d'un échappement à la surveillance des réponses anti-tumorales T et NK. Ceci peut particulièrement être le cas des DLBCL avec un profil de latence III (Motoharu Shibusawa et al., 2021).

Chez les cellules tumorales il est fréquemment observé une baisse de l'expression du CMH-I interagissant avec les récepteurs inhibiteurs KIR, ILT ou CRL des NK, ce qui peut conduire à leur lyse, en particulier dans le cas de certains lymphomes (Le Cloennec et al., 2006; Möller et al., 1987). Une baisse de l'expression du HLA-DR (CMH-II) conduit également à la perte d'interaction avec le récepteur inhibiteur FCRL6 présent en particulier chez les cellules NK (Davis, 2020) et favoriser leur rôle cytotoxique. Or, chez les LCLs étudiées nous avons mis en évidence une surexpression des protéines HLA-A, B, C (molécules du CMH-I) et HLA-DR, ce qui suggère la mise en place d'une inhibition de la réponse NK. Toutefois, la forte expression des molécules des CMH I et II peut aussi être interprétée comme favorable au maintien de la réponse immune T en favorisant la présentation des peptides antigéniques au TCR/CD3 des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (*via* le CMH-I) et des T CD4<sup>+</sup> (*via* le CMH-II). Il est intéressant de noter que pour les cellules en cycle lytique il y a à l'inverse une baisse d'expression des CMH-I et -II (Keating et al., 2002).

L'émergence et le développement des tumeurs est très fréquemment décrite comme étant associée à l'expression de points de contrôles inhibiteurs conduisant à l'inefficacité des réponses anti-tumorales. Ces derniers ont tout d'abord été décrits vis-à-vis de la réponse T, puis vis-à-vis de la réponse NK (Khan et al., 2020). Il est à présent acquis que de nombreux ligands inhibiteurs exprimés par les cellules tumorales ont des récepteurs communs chez ces deux types cellulaires.

Chez les LCLs étudiées nous avons pu mettre en évidence la surexpression membranaire de plusieurs points de contrôles inhibiteurs dont les récepteurs sont exprimés sur les cellules T et NK (la majorité des études portent cependant actuellement sur les cellules T) : PD-L1/B7-H1 et PD-L2/B7-DC (récepteur : PD-1), CD80/B7-1 et CD86/B7-2 (récepteur : CTLA4) et dans une moindre mesure B7-H3 (récepteur non encore défini). Tous appartiennent à la famille B7 (B7-H4 n'est pas exprimé). Nous n'avons par contre pas trouvé d'expression significativement augmentée par rapport aux lymphocytes B normaux pour les points de contrôle n'appartenant pas à cette famille moléculaire (CD112, CD115, HVEM et Ceacam-1).

PD-L1 est fréquemment surexprimée chez les cellules tumorales, en particulier dans le cas des lymphomes (Kim and Chen, 2016). L'oncoprotéine LMP1 peut induire son expression (*via* les voies JAK/STAT et AP-1) (Satou and Nakamura, 2021), de même qu'EBNA2 (Murata et al., 2021). Par ailleurs, la voie NF- $\kappa$ B, que l'oncoprotéine virale LMP1 active constitutivement, contribue également à induire son expression (Antonangeli et al., 2020). Il a été mis en évidence au laboratoire que la protéine PD-L1 est stockée dans les lysosomes sécrétoires chez les lymphocytes B en latence III de l'EBV et que sa surexpression membranaire est due à une augmentation de la fusion de ces derniers avec la membrane plasmique (Durand-Panteix et al., 2012). Par ailleurs, il a également été démontré à l'aide d'un modèle B/T autologues que l'axe PD-L1/PD-1 contribue à l'expansion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> régulateurs anergiques et par voie de conséquence (production de TGF $\beta$ ) à l'inhibition des lymphocytes T effecteurs CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (Auclair et al., 2019). Son expression, associée, à la sécrétion de cytokines immunosuppressives (IL-10, TGF $\beta$ , IL35) inhibe fortement la réponse T antitumorale. De même que PD-L1, PD-L2 joue un rôle inhibiteur par son interaction avec PD-1 (Ahmad et al., 2017). Son expression peut être amplifiée par LMP1 (Cristino et al., 2019). Il a été observée une surexpression chez un grand nombre de types de tumeurs, dont certains sous-types de lymphomes, tels que les DLBCL EBV<sup>+</sup> (Panjwani et al., 2018). Malgré sa fonction inhibitrice, son rôle reste cependant peu étudié. B7-H3 est également connue pour ses propriétés inhibitrices envers les cellules T et NK. Sa surexpression conduit à l'inhibition de la prolifération des T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (Yang et al., 2020; Zhou and Jin, 2021). Par ailleurs elle peut inhiber l'activité des cellules NK par baisse de la libération d'IFN $\gamma$  et de granzyme B (Feng et al., 2021; Zhou and Jin, 2021). Concernant B7-1 et B7-2, ils peuvent jouer le rôle de points de contrôle inhibiteurs lorsqu'ils sont fortement exprimés car ils présentent une plus forte affinité pour leur récepteur inhibiteur CTLA4 que pour leur récepteur activateur CD28, ce qui peut orienter la réponse immune vers l'anergie (Chambers et al., 2001; Collins et al., 2002).

Les variabilités d'expression observées pour les différentes LCLs peuvent représenter celles des cellules en latence III de l'EBV *in vivo*. L'échappement à l'immunosurveillance pour certaines d'entre elles peut s'expliquer par la co-expression de plusieurs points de contrôles inhibiteurs.

Il faut par ailleurs souligner le fait que les points de contrôle trouvés comme exprimés (B7-H3) ou surexprimés (PD-L1, PD-L2, CD80, CD86) à la surface des lymphocytes B en latence III de l'EBV peuvent également être retrouvés sous forme soluble dans le sérum humain et agir à distance pour inhiber la réponse immune anti-tumorale (Gu et al., 2018; Khan et al., 2021). sPD-L1 semble produit par clivage protéolytique de la protéine membranaire (Chen et al., 2011), tandis que sPD-L2 et sCD80 semblent résulter d'une régulation post transcriptionnelle par épissage alternatif, conduisant à des protéines sans domaines transmembranaires (He et al., 2004; Kakoulidou et al., 2007). sCD86 est également une protéine à laquelle il manque le domaine transmembranaire suite à une délétion (Jeannin et al., 2000). Enfin, sB7-H3 semble résulter à la fois du clivage protéolytique de la forme membranaire ou d'un épissage alternatif de l'ARNm (Chen et al., 2013). Par ailleurs PD-L1 est connue pour être fréquemment retrouvé au niveau des exosomes (Xing et al., 2021).

Deux autres points de contrôle surexprimés au niveau intracellulaire ont également été identifiés : les galectines -3 et -9. Elles appartiennent à la famille des lectines, qui sont des molécules ayant la particularité de reconnaître les bêta-galactosides tout en jouant un rôle inhibiteur sur la réponse immune (Thijssen et al., 2015). Les galectines sont connues pour être sécrétées par des voies non conventionnelles lorsqu'elles sont fortement exprimées au niveau intracellulaire. Elles sont externalisées par translocation à travers la membrane plasmique ou par des transports vésiculaires ne dérivant pas des membranes de l'appareil de Golgi : vésicules extracellulaires ou exosomes (Rabouille, 2017). La galectine-3 peut être sécrétée *via* les lysosomes sécrétoires (de même que PD-L1) (Popa et al., 2018). Cette dernière interagit avec les récepteurs inhibiteurs LAG-3 et CTLA-4 des lymphocytes T cytotoxiques, provoquant leur anergie (Kouo et al., 2015; Rabinovich and Toscano, 2009). La galectine-9 présente quant à elle de nombreuses fonctions inhibitrices. Elle interagit avec les récepteurs inhibiteurs TIM-3 et PD-1 des lymphocytes Th1 induisant leur mort, favorise l'expansion des lymphocytes T régulateurs anergiques CD4+CD25+ et bloque l'activité des lymphocytes T et des cellules NK (en partie par inhibition de la sécrétion d'IL-2) (Rabinovich and Toscano, 2009; R. Yang et al., 2021; Yasinska et al., 2019). La galectine-9 interagit avec la protéine LMP1 au sein des exosomes sécrétés par les cellules infectées par l'EBV (Pioche-Durieu et al., 2005).

La forte surexpression intracellulaire des galectines-3 et -9 observée chez les lymphocytes B en latence III de l'EBV laisse supposer qu'elles puissent être sécrétées.

L'ensemble de nos résultats mettent en évidence que les lymphocytes B en latence III de l'EBV expriment plusieurs points de contrôles pouvant inhiber les réponses anti-tumorales T et NK, conduire à leur échappement à la surveillance par le système immunitaire et à l'émergence de lymphomes. La surexpression au niveau membranaire de PD-L1, PD-L2, CD80 et CD86 laisse penser qu'une co-immunothérapie anti-PD-1/anti-CTLA4 pourrait contribuer à lever ces inhibitions. Il reste à confirmer la sécrétion des galectines-3 et -9 pour savoir si les récepteurs inhibiteurs LAG-3 et TIM-3 sont également impliqués.

Toutefois, il ne faut pas perdre de vue que les points de contrôle mis en évidence ne peuvent avoir un rôle inhibiteur que si leurs récepteurs sont exprimés à la surface des cellules T et NK. De plus, certaines molécules trouvées comme surexprimées peuvent avoir des rôles ambivalents. Le HLA-E du CMH-I peut interagir avec les NKG2A et D inhibiteurs ou les NKG2B et C activateurs des cellules T et NK, les points de contrôles inhibiteurs CD80 et CD86 peuvent avoir des rôles activateurs s'ils interagissent avec CD28. La co-expression de PD-L1 et CD80 a été décrite en faveur du maintien de l'activité cytotoxique des lymphocytes T (l'interaction de PD-L1 avec CD80 limite son interaction avec PD-1) (Haile et al., 2013). Ou encore, la signalisation de CD80 chez les cellules de lymphome B qui l'expriment peuvent limiter leur prolifération en régulant positivement des molécules pro-apoptotiques et négativement des molécules anti-apoptotiques (Mir and Agrewala, 2008; G. B. Park et al., 2011). L'ambivalence entre les réponses activatrices et inhibitrices peut être mise en lien avec le maintien de l'infection latente par l'EBV qui tantôt va dans le sens de leur élimination, tantôt dans celui de leur tolérance.

En ce qui concerne l'étude du rôle des formules de vLMW-F sur les points de contrôle inhibiteurs nous avons pu montrer dans la première partie de nos résultats une baisse de l'expression membranaire de PD-L1, contrairement au fucoïdane natif. Cette dernière peut s'expliquer par l'altération du réseau d'actine permettant l'acheminement des lysosomes sécrétoires contenant PD-L1 vers la membrane et leur fusion. Nous n'avons pas observé de modification de l'expression membranaire de PD-L2, CD80 ou CD86. Par contre, les formules vLMW-F ont permis de mettre en évidence lors d'expérimentations préliminaires

certaines baisses significatives de l'expression totale de la galectine-3 (fractions F1 et F2) et de la galectine-9 (fraction F2).

Ces résultats restent à confirmer et à mettre en lien avec l'activité sécrétoire éventuelle de ces points de contrôle, d'autant plus que la galectine-3, de même que PD-L1 utilise la voie de sécrétion non conventionnelle des lysosomes sécrétoires (Popa et al., 2018).

Les perspectives de ce travail sont présentées dans la dernière partie du mémoire.

# **Conclusion et Perspectives**

---



Notre travail de thèse a fait l'objet de deux parties de résultats.

La première a porté sur l'étude du rôle de deux fractions originales de très faible poids moléculaire de fucoïdanes (vLMW-F) et a permis de montrer leur rôle antiprolifératif et pro-apoptotique, de même que leur capacité à baisser l'expression de surface de l'immuno-inhibiteur PD-L1 chez les cellules de DLBCL et les lymphocytes B en latence III de l'EBV (LCLs). Nous avons pu mettre en évidence que cela était associé à une baisse de la densité du réseau d'actine, conduisant à une baisse du trafic vésiculaire membranaire. Par ailleurs, il n'a pas été montré d'effet cytotoxique sur les cellules normales.

Dans la seconde partie de notre travail, nous avons étudié le profil inhibiteur des cellules de LCLs envers les réponses immunes T et NK. Nous avons mis en évidence une forte expression des molécules HLA-ABC de classe I et HLA-DR de classe II, ce qui va dans le sens d'une inhibition de la réponse immune NK. De plus, l'étude de l'expression de points de contrôle inhibiteurs autres que PD-L1 (établis ou émergents), a montré l'expression membranaire de molécules de la famille B7 (PD-L2, CD80, CD86 et dans une moindre mesure B7-H3), ainsi que la surexpression intracellulaire des galectines -3 et -9. Contrairement aux autres points de contrôle, les formules de vLMW-F permettent de baisser l'expression des galectine-3 et 9.

L'ensemble de nos résultats sur les vLMW-F ainsi que sur l'expression de molécules inhibitrices des réponses T et NK par les cellules B en latence III de l'EBV permet de préciser le mécanisme d'échappement de ces derniers à la surveillance immunitaire chez les individus immunocompétents et de mieux comprendre l'émergence de tumeurs associées à l'EBV. D'autre part, nous montrons l'intérêt potentiel des vLMW-F comme adjuvant des immunothérapies anti-PD-L1 suite à la baisse de l'expression de ce point de contrôle inhibiteur.

Nous proposons différentes perspectives pouvant faire suite aux résultats obtenus.

Nous avons mis en évidence que les vLMW-F présentent des effets cytotoxiques tout en baissant l'expression membranaire de PD-L1 à la surface des cellules viables de DLBCLs ou de lymphocytes B en latence III de l'EBV (LCLs). L'axe PD-L1/PD-1 est un point de contrôle immuno-inhibiteur classiquement ciblé lors des immunothérapies (anti PD-L1 ou anti PD-1). Il serait intéressant de voir si les vLMW-F seraient capables de potentialiser la restauration de la réponse immune anti-EBV T ou NK en co-traitement avec des anticorps anti-PD-L1 ou anti-PD-1 lors de tests fonctionnels.



Pour ce faire, nous proposons de faire tout d'abord une étude sur le modèle de co-culture autologue : B en latence III de l'EBV/lymphocytes T, que nous avons déjà mis au point. Les cellules de LCLs mises en culture seules ou en présence des lymphocytes T seront traitées ou non par le fucoïdane natif ou les formules de vLMW-F, en présence de l'anticorps bloquant PD-1, ou de son contrôle isotypique. Les lymphocytes T autologues pourront être isolés par immuno-sélection négative à partir des PBMCs et activés par des particules conjuguées à des anticorps monoclonaux (CD2, CD3 et CD28) pendant 72h. Une vérification de la purification et de l'activation des cellules T pourra être réalisée par cytométrie en flux à l'aide d'un marquage CD3/CD25. Par la suite, l'anticorps bloquant anti-PD-1 ou son contrôle isotypique seront ajoutés aux lymphocytes T activés. Ces derniers, seront ensuite mis en culture pendant 48h, avec les cellules B non traitées ou traitées au préalable (pendant 48h) par le fucoïdane natif ou les fractions F1 et F2. Un test d'apoptose (Annexine V-FITC/IP) sera réalisé par cytométrie en flux pour les deux populations, après marquage des lymphocytes B en latence III de l'EBV par un anticorps anti-CD19 couplé à l'APC, afin de les différencier des lymphocytes T.

Le tableau 5 permet une présentation schématique des différentes conditions expérimentales, de même que les résultats attendus s'il y a potentialisation de l'effet de l'anti-PD-1 par la fucoïdane native ou les formules de vLMW-F. Pour les cellules de LCLs seules, il n'est pas attendu d'apoptose, de même qu'en présence du contrôle isotypique, ou de l'anticorps bloquant anti-PD-1. En présence des formules de vLMW-F, l'induction de l'apoptose devrait être similaire à celle présentée dans l'article. Par contre, lors de la mise en co-culture, nous attendons une faible induction de l'apoptose sans traitement et en présence du contrôle isotypique, compte-tenu de la réponse T cytotoxique. Le blocage de PD-1 sur les T devrait augmenter le pourcentage de cellules apoptotiques, de même que le pré-traitement par les formules vLMW-F. Enfin, s'il y a potentialisation du traitement anti-PD-1 par les vLMW-F l'induction de l'apoptose devrait être maximale, ce qui irait dans le sens d'une utilisation potentielle comme adjuvant à cette immunothérapie.

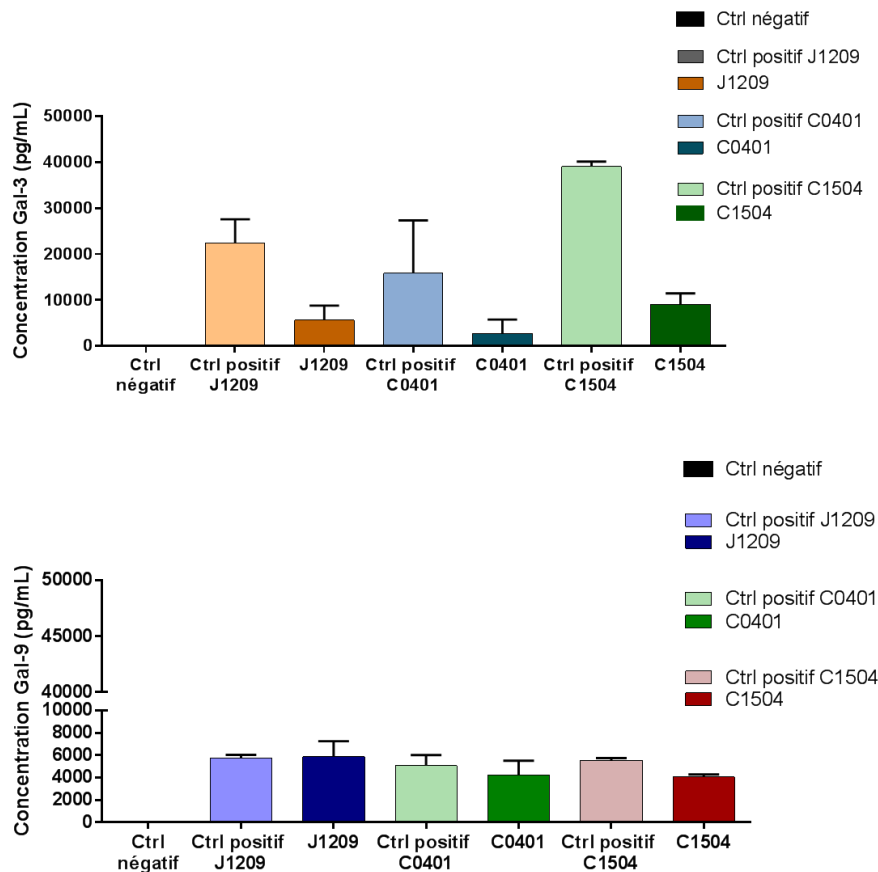
**Tableau 5. Conditions expérimentales et résultats attendus sur la potentialisation du traitement anti-PD-1 par les formules vLMW-F**

	Contrôle	+ Ctrl isotypique	+ Anti-PD-1	+ Fucoïdane Natif/ F1/ F2	+ Fucoïdane + Anti-PD-1
<b>Cellules B (LCLs) Seules</b>					
<b>Résultat attendu (Apoptose)</b>					
<b>Cellules B (LCLs) + T autologues (B/T = ¼)</b>					
<b>Résultat attendu (Apoptose)</b>					

Nous avons mis en évidence que les vLMW-F conduisent à la baisse d'expression membranaire de PD-L1, suite à l'altération du réseau d'actine responsable du rapprochement des vésicules contenant PD-L1 avec la membrane plasmique puis leur fusion. De plus, de nombreuses voies de signalisation impliquées dans la prolifération, la survie ou l'apoptose s'entrecroisent entre celles constitutivement activées dans les cellules B en latence III de l'EBV et celles mises en évidence comme étant inhibées par les fucoïdanes dans le cas de cellules de tumeurs solides (NF-κB, MAPK/ERK, PI3K/AKT et STAT-3) (Duan et al., 2020). Il serait intéressant de préciser l'effet du fucoïdane, et en particulier des vLMW, sur ces voies de signalisation. Des western blot pourront être réalisés sur les formes phosphorylées et non phosphorylées de ces molécules afin de visualiser la baisse d'activation éventuelle de ces voies de signalisation chez des cellules traitées. Dans le cas de NF-κB, la baisse de co-localisation de la sous-unité p65 et du noyau pourrait être suivi par imagerie en flux.

Nous souhaiterions également localiser au niveau cellulaire la fucoïdane (native et vLMW-F), afin de préciser le rôle direct ou indirect (présence au niveau membranaire et/ou intracellulaire). Pour ce faire, les cellules peuvent être incubées en présence du marqueur fluorescent (FITC-UEA-I) (J. Yang et al., 2021) avant des analyses par microscopie confocale ou par imagerie en flux.

Par ailleurs, nous avons montré que les lymphocytes B en latence III de l'EBV peuvent exprimer de nombreux points de contrôle inhibiteurs des réponses anti-tumorales T et NK : PD-L1, PD-L2, CD80, CD86 et dans une moindre mesure B7-H3 au niveau membranaire, galectine-3 et galectine-9 au niveau intracellulaire. Or, tous ces points de contrôle sont connus pour présenter des formes solubles, qu'elles soient libres ou associées aux exosomes (Keryer-Bibens et al., 2006; Khan et al., 2021; Popa et al., 2018). Une vue d'ensemble, des formes cellulaires et/ou solubles permettrait de préciser leur mode d'action dans l'inhibition de la réponse anti-tumorale. Ceci concerne en particulier les galectines 3 et 9, qui ne sont pas exprimées à la surface cellulaire. Des résultats préliminaires obtenus par ELISA ont montré que ces galectines sont également détectées dans les surnageants des LCLs et pourraient donc également jouer un rôle inhibiteur à distance (Figure 55).



**Figure 55. Concentrations (ELISA) des galectine-3 et galectine-9 dans les surnageants de culture des LCLs**

Après 48h de culture, les surnageants des trois lignées LCLs (J1209, C0401, C1504) ont été récupérés par centrifugation, tandis que les culots cellulaires ont été lysés (contrôles positifs). Les résultats montrent la présence des galectines -3 et -9 dans les surnageants.

Ces résultats devront être complétés à l'aide de cellules de références : pool de lymphocytes B normaux. Des témoins positifs peuvent également être réalisés sur des surnageants de lignées cellulaires sécrétant les galectines, telles que les DLBCL (Shi et al., 2022).

Des ELISA complémentaires pourraient également être réalisés pour les différents points de contrôle de la famille B7 trouvés comme étant surexprimés. De plus, il serait intéressant de préciser si les formes sécrétées sont exosomales ou non. Pour ce faire, les exosomes sécrétés par les LCLs pourraient être isolés par ultracentrifugation différentielle à partir des surnageants de culture avant des analyses par western blot. Il serait également possible de les capturer à l'aide de billes portant des anticorps dirigés vers des tétraspanines (CD63, CD81 ou CD9), puis de les marquer à l'aide d'anticorps fluorescents spécifiques des différents points de contrôle étudiés, avant l'analyse des billes par cytométrie en flux.

Même si l'étude de l'expression des différents points de contrôle considérés individuellement est importante, il serait également intéressant de réaliser des multiples marquages prenant en compte les différents points de contrôle trouvés comme étant exprimés. Cela permettrait de tenir compte de la variabilité individuelle des cellules et de mettre en évidence si certaines d'entre elles présentent des co-expressions élevées, ce qui les rendrait plus susceptibles d'échapper à la surveillance immunitaire.

En vue de réaliser des tests fonctionnels de ces points de contrôle sur l'inhibition des réponses anti-tumorales T et NK dans des modèles de co-cultures, il serait aussi important de prendre en considération les profils phénotypiques des T autologues et des NK pour les principaux récepteurs inhibiteurs associés. Nous pourrions étudier par cytométrie en flux, l'expression de PD-1 (récepteur de PD-L1 et PD-L2), CTLA-4 (récepteur de CD80 et CD86), LAG-3 (récepteur de galectine-3) et TIM-3 (récepteur de galectine- 9).

Les expérimentations de co-cultures B tumoral/T pourraient être réalisées de manière similaire à celle décrite pour les expérimentations de potentialisation du traitement anti-PD-1 par les formules de vLMW-F : cellules de LCLs seules ou en présence de lymphocytes T cytotoxiques activés, sans traitement, après traitement par le contrôle isotypique ou par un anticorps bloquant le point de contrôle d'intérêt et analyse de la mort par apoptose des cellules de LCLs CD19<sup>+</sup> par un test apoptotique annexine-V/IP. Plus le point de contrôle est inhibiteur, plus la mort par apoptose est augmentée en présence de l'anticorps bloquant.

Concernant les cellules NK, les co-cultures pourraient être réalisées avec la lignée NK-92 humaine (il n'est pas nécessaire de réaliser les expérimentations en système autologue). L'activation et la fonctionnalité des cellules NK (production de granzymes et perforine,

expression de CD107a, marqueur de dégranulation) pourrait être suivie simultanément aux études de cytotoxicité sur les cellules B tumorales (test apoptotique en annexine-V/IP).

Comme indiqué dans notre mémoire, les points de contrôle étudiés sont la cible d'immunothérapies établies ou émergente (soit directement, soit par blocage du récepteur sur la cellule de défense). Des expérimentations sur des co-cultures B/T ou B/NK et mettant en jeu simultanément plusieurs anticorps bloquants pourraient être réalisées. Des combinaisons déjà existantes pourraient être testées : anti-PD-1 (blocage simultané de PD-L1 et PD-L2) plus anti-CTLA-4 (blocage simultané de CD80 et CD86) plus anti LAG-3 (blocage de la galectine-3) ou anti TIM-3 (blocage de la galectine-9). Le récepteur de B7-H3 n'étant pas formellement identifié, un anticorps anti-B7-H3 pourrait également être testé.

Une caractérisation plus complète des cellules B en latence III, ainsi que des lymphocytes T et des cellules NK et des expérimentations de co-cultures permettraient de mieux comprendre les interactions cellulaires mises en jeu et leur échappement à l'immunosurveillance.

Des expérimentations complémentaires pourraient être réalisées en conjuguant les effets des vLMW-F et la régulation d'expression des galectines-3 et -9. Nous avons pu montrer qu'elles permettent de baisser leur expression totale. Une analyse de l'expression transcriptionnelle permettrait de voir si cette dernière est affectée. De plus il serait intéressant de voir par des tests ELISA s'il y a également une baisse de la sécrétion et si elle met en jeu les mêmes mécanismes moléculaires que pour PD-L1 (rôle du réseau d'actine et du trafic membranaire). Des co-marquages du noyau (DAPI ou Topro-3), de l'actine-F (phalloïdine), des galectines -3 et -9, ainsi que des lysosomes sécrétoires (immunofluorescence anti-galectines -3 et -9 et anti-Rab27a) pourraient être faits dans le cas des LCLs de manière à analyser la localisation des lectines et les modifications d'expression par microscopie confocale. Si une baisse de sécrétion est observée des expérimentations pourraient également être réalisées pour évaluer le rôle de galectines dans l'inhibition des réponses anti-tumorales T et NK lors d'incubation en présence des milieux de culture des LCLs.

Comme les formules vLMW-F ont montré du potentiel à baisser l'expression de surface de PD-L1 et les expressions totales des galectines, la même méthodologie décrite précédemment servirait pour étudier leurs rôles dans la potentialisation des fonctions anti-tumorales des T et NK. Par contre, dans ce cas, l'utilisation d'anticorps bloquants ciblera à la fois plusieurs

récepteurs inhibiteurs surexprimés (anti-PD-1, anti-CTLA4, anti-LAG-3 et anti-TIM-3). Une potentialisation très probable des réponses immunes pourrait être une grande opportunité pour les immunothérapies.

Enfin, nous voudrions également tester tous les effets du fucoïdane et des formules vLMW-F sur des modèles murins immunocompétents développant des lymphomes B (*LMP1-CD40, Myd88<sup>L265P</sup>*) qui existent au sein du laboratoire. Nous pourrions administrer oralement ou injecter les traitements et étudier par la suite l'émergence et le développement tumoral. Des tests pourraient également être réalisés en présence d'anticorps bloquants des points de contrôle (seuls ou en combinaison), afin d'étudier leur rôle d'adjuvant.

Le but de mon projet thèse était d'étudier les effets des formules vLMW-F sur les points de contrôle inhibiteurs – en particulier PD-L1 – surexprimés par les cellules B en latence III de l'EBV. Nous avons montré que les formules vLMW-F ont des effets antiprolifératifs et pro-apoptotiques sur les cellules B en latence III de l'EBV et celles de DLBCLs, sans toxicité sur les cellules normales. De plus, ces fractions sont capables de baisser l'expression de surface de PD-L1 en altérant le réseau d'actine impliqué dans l'activité sécrétoire au niveau membranaire. Nous avons également identifié différents points de contrôle inhibiteurs (PD-L1, PD-L2, CD80, CD86, B7-H3) surexprimés à la surface des cellules immortalisées par l'EBV en programme de latence III et pu préciser d'autres n'étant pas exprimés (CD112, CD155, B7-H4, CEACAM1, HVEM).

Ce travail nous a permis d'identifier, pour la première fois dans le cas de lymphomes B, de nouvelles propriétés de formules de fucoïdane de très bas poids moléculaire sur des cellules tumorales qui se caractérisent par un profil potentiellement inhibiteur de la réponse immune. Nous avons présenté de nouvelles stratégies qui pourraient être prometteuses aux défis et limitations de l'immunothérapie et contre les aspects d'échappement au système immunitaire par l'EBV.



# **Références bibliographiques**

---





- Ahmad, S.M., Martinenaite, E., Holmström, M., Jørgensen, M.A., Met, Ö., Nastasi, C., Klausen, U., Donia, M., Pedersen, L.M., Munksgaard, L., Ødum, N., Woetmann, A., Svane, I.M., Andersen, M.H., 2017. The inhibitory checkpoint, PD-L2, is a target for effector T cells: Novel possibilities for immune therapy. *Oncoimmunology* 7, e1390641. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1390641>
- Ahmed, W., Tariq, S., Khan, G., 2018. Tracking EBV-encoded RNAs (EBERs) from the nucleus to the excreted exosomes of B-lymphocytes. *Sci. Rep.* 8, 15438. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33758-4>
- Aisa, Y., Miyakawa, Y., Nakazato, T., Shibata, H., Saito, K., Ikeda, Y., Kizaki, M., 2005. Fucoidan induces apoptosis of human HS-Sultan cells accompanied by activation of caspase-3 and down-regulation of ERK Pathways. *Am. J. Hematol.* 78, 7–14. <https://doi.org/10.1002/ajh.20182>
- Alari-Pahissa, E., Ataya, M., Moraitis, I., Campos-Ruiz, M., Altadill, M., Muntasell, A., Moles, A., López-Botet, M., 2021. NK cells eliminate Epstein-Barr virus bound to B cells through a specific antibody-mediated uptake. *PLOS Pathog.* 17, e1009868. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009868>
- Albanese, M., Tagawa, T., Bouvet, M., Maliqi, L., Lutter, D., Hoser, J., Hastreiter, M., Hayes, M., Sugden, B., Martin, L., Moosmann, A., Hammerschmidt, W., 2016. Epstein-Barr virus microRNAs reduce immune surveillance by virus-specific CD8+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E6467–E6475. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605884113>
- Ale, M.T., Mikkelsen, J.D., Meyer, A.S., 2011. Important Determinants for Fucoidan Bioactivity: A Critical Review of Structure-Function Relations and Extraction Methods for Fucose-Containing Sulfated Polysaccharides from Brown Seaweeds. *Mar. Drugs* 9, 2106–2130. <https://doi.org/10.3390/md9102106>
- Allday, M.J., Bazot, Q., White, R.E., 2015. The EBNA3 Family: Two Oncoproteins and a Tumour Suppressor that Are Central to the Biology of EBV in B Cells, in: Münz, C. (Ed.), *Epstein Barr Virus Volume 2: One Herpes Virus: Many Diseases*, Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer International Publishing, Cham, pp. 61–117. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-22834-1\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-22834-1_3)
- Altan, M., Kidwell, K.M., Pelekanou, V., Carvajal-Hausdorf, D.E., Schalper, K.A., Toki, M.I., Thomas, D.G., Sabel, M.S., Hayes, D.F., Rimm, D.L., 2018. Association of B7-H4, PD-L1, and tumor infiltrating lymphocytes with outcomes in breast cancer. *Npj Breast Cancer* 4, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41523-018-0095-1>
- Amiel, C., 2013. Le virus Epstein-Barr (EBV) : physiopathogénèse et diagnostic. *Rev. Francoph. Lab.* 2013, 47–55. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(13\)72223-8](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(13)72223-8)
- Amri, G.E., Zalagh, M., Benariba, F., 2018. Un lymphome T/NK extra-ganglionnaire de type nasal se présentant comme une cellulite orbitaire. *Pan Afr. Med. J.* 31, 8. <https://doi.org/10.11604/pamj.2018.31.8.16221>
- Amyes, E., Hatton, C., Montamat-Sicotte, D., Gudgeon, N., Rickinson, A.B., McMichael, A.J., Callan, M.F.C., 2003. Characterization of the CD4+ T Cell Response to Epstein-Barr Virus during Primary and Persistent Infection. *J. Exp. Med.* 198, 903–911. <https://doi.org/10.1084/jem.20022058>
- Anastasiadou, E., Stroopinsky, D., Alimperti, S., Jiao, A.L., Pyzer, A.R., Cippitelli, C., Pepe, G., Severa, M., Rosenblatt, J., Etna, M.P., Rieger, S., Kempkes, B., Coccia, E.M., Sui, S.J.H., Chen, C.S., Uccini, S., Avigan, D., Faggioni, A., Trivedi, P., Slack, F.J., 2019a. Epstein-Barr virus-encoded EBNA2 alters immune checkpoint PD-L1 expression by downregulating miR-34a in B-cell lymphomas. *Leukemia* 33, 132–147. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0178-x>
- Anastasiadou, E., Stroopinsky, D., Alimperti, S., Jiao, A.L., Pyzer, A.R., Cippitelli, C., Pepe, G., Severa, M., Rosenblatt, J., Etna, M.P., Rieger, S., Kempkes, B., Coccia, E.M., Sui, S.J.H., Chen, C.S., Uccini, S., Avigan, D., Faggioni, A., Trivedi, P., Slack, F.J., 2019b. Epstein-Barr virus-encoded

- EBNA2 alters immune checkpoint PD-L1 expression by downregulating miR-34a in B-cell lymphomas. *Leukemia* 33, 132–147. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0178-x>
- Anderton, E., Yee, J., Smith, P., Crook, T., White, R.E., Allday, M.J., 2008. Two Epstein-Barr virus (EBV) oncoproteins cooperate to repress expression of the proapoptotic tumour-suppressor Bim: clues to the pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Oncogene* 27, 421–433. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210668>
- Ansell, S.M., Lesokhin, A.M., Borrello, I., Halwani, A., Scott, E.C., Gutierrez, M., Schuster, S.J., Millenson, M.M., Cattry, D., Freeman, G.J., Rodig, S.J., Chapuy, B., Ligon, A.H., Zhu, L., Grosso, J.F., Kim, S.Y., Timmerman, J.M., Shipp, M.A., Armand, P., 2015. PD-1 Blockade with Nivolumab in Relapsed or Refractory Hodgkin's Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 372, 311–319. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1411087>
- Antonangeli, F., Natalini, A., Garassino, M.C., Sica, A., Santoni, A., Di Rosa, F., 2020. Regulation of PD-L1 Expression by NF- $\kappa$ B in Cancer. *Front. Immunol.* 11, 584626. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.584626>
- Aozasa, K., 2006. Pyothorax-associated lymphoma. *J. Clin. Exp. Hematop. JCEH* 46, 5–10. <https://doi.org/10.3960/jslrt.46.5>
- Arcipowski, K.M., Bishop, G.A., 2012. TRAF binding is required for a distinct subset of in vivo B cell functions of the oncoprotein LMP1. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 189, 5165–5170. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201821>
- Arias-Calvachi, C., Blanco, R., Calaf, G.M., Aguayo, F., 2022. Epstein–Barr Virus Association with Breast Cancer: Evidence and Perspectives. *Biology* 11, 799. <https://doi.org/10.3390/biology11060799>
- Atashrazm, F., Lowenthal, R.M., Woods, G.M., Holloway, A.F., Dickinson, J.L., 2015. Fucoidan and Cancer: A Multifunctional Molecule with Anti-Tumor Potential. *Mar. Drugs* 13, 2327–2346. <https://doi.org/10.3390/md13042327>
- Auclair, H., Ouk-Martin, C., Roland, L., Santa, P., Mohamad, H.A., Faumont, N., Feuillard, J., Jayat-Vignoles, C., 2019. EBV Latency III–Transformed B Cells Are Inducers of Conventional and Unconventional Regulatory T Cells in a PD-L1–Dependent Manner. *J. Immunol.* 203, 1665–1674. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801420>
- Barber, D.L., Wherry, E.J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J.P., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., Ahmed, R., 2006. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439, 682–687. <https://doi.org/10.1038/nature04444>
- Barzyk, G.A., Sheriff, V., 2020. EBV Positivity and Programmed Death-ligand 1 Expression in Diffuse Large B-cell Lymphoma: A Systematic Review. *Anticancer Res.* 40, 5951–5968. <https://doi.org/10.21873/anticancer.14616>
- Bejarano, M.T., Masucci, M.G., 1998. Interleukin-10 Abrogates the Inhibition of Epstein-Barr Virus–Induced B-Cell Transformation by Memory T-Cell Responses. *Blood* 92, 4256–4262. <https://doi.org/10.1182/blood.V92.11.4256>
- Bendelac, A., Savage, P.B., Teyton, L., 2007. The biology of NKT cells. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 297–336. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141711>
- Bernardi, G., Springer, G.F., 1962. Properties of highly purified fucan. *J. Biol. Chem.* 237, 75–80.
- Bi, X., Wang, H., Zhang, W., Wang, J., Liu, W., Xia, Z., Huang, H., Jiang, W., Zhang, Y., Wang, L., 2016a. PD-L1 is upregulated by EBV-driven LMP1 through NF- $\kappa$ B pathway and correlates with poor prognosis in natural killer/T-cell lymphoma. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* 9, 109. <https://doi.org/10.1186/s13045-016-0341-7>
- Bi, X., Wang, H., Zhang, W., Wang, J., Liu, W., Xia, Z., Huang, H., Jiang, W., Zhang, Y., Wang, L., 2016b. PD-L1 is upregulated by EBV-driven LMP1 through NF- $\kappa$ B pathway and correlates with poor prognosis in natural killer/T-cell lymphoma. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* 9, 109. <https://doi.org/10.1186/s13045-016-0341-7>

- Biggi, A.F.B., Elgui de Oliveira, D., 2022. The Epstein-Barr Virus Hacks Immune Checkpoints: Evidence and Consequences for Lymphoproliferative Disorders and Cancers. *Biomolecules* 12, 397. <https://doi.org/10.3390/biom12030397>
- Biron, C.A., Nguyen, K.B., Pien, G.C., Cousens, L.P., Salazar-Mather, T.P., 1999. NATURAL KILLER CELLS IN ANTIVIRAL DEFENSE: Function and Regulation by Innate Cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 189–220. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.189>
- Black, W. a. P., Dewar, E.T., Woodward, F.N., 1952. Manufacture of algal chemicals. IV—Laboratory-scale isolation of fucoidin from brown marine algae. *J. Sci. Food Agric.* 3, 122–129. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740030305>
- Blackburn, S.D., Shin, H., Haining, W.N., Zou, T., Workman, C.J., Polley, A., Betts, M.R., Freeman, G.J., Vignali, D.A.A., Wherry, E.J., 2009. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat. Immunol.* 10, 29–37. <https://doi.org/10.1038/ni.1679>
- Bofill-De Ros, X., Rovira-Rigau, M., Fillat, C., 2017. Implications of MicroRNAs in Oncolytic Virotherapy. *Front. Oncol.* 7, 142. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00142>
- Boo, H.-J., Hong, J.-Y., Kim, S.-C., Kang, J.-I., Kim, M.-K., Kim, E.-J., Hyun, J.-W., Koh, Y.-S., Yoo, E.-S., Kwon, J.-M., Kang, H.-K., 2013. The Anticancer Effect of Fucoidan in PC-3 Prostate Cancer Cells. *Mar. Drugs* 11, 2982–2999. <https://doi.org/10.3390/md11082982>
- Brady, G., MacArthur, G.J., Farrell, P.J., 2007. Epstein–Barr virus and Burkitt lymphoma. *J. Clin. Pathol.* 60, 1397–1402. <https://doi.org/10.1136/jcp.2007.047977>
- Budiani, D.R., Hutahaean, S., Haryana, S.M., Soesatyo, M.H.N.E., Sosroseno, W., 2002. Interleukin-10 levels in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma. *J. Microbiol. Immunol. Infect. Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi* 35, 265–268.
- Burke, A.P., Yen, T.S., Shekitka, K.M., Sobin, L.H., 1990. Lymphoepithelial carcinoma of the stomach with Epstein-Barr virus demonstrated by polymerase chain reaction. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 3, 377–380.
- Burkitt, D., 1958. A sarcoma involving the jaws in African children. *Br. J. Surg.* 46, 218–223. <https://doi.org/10.1002/bjs.18004619704>
- Burrows, S.R., Gardner, J., Khanna, R., Steward, T., Moss, D.J., Rodda, S., Suhrbier, A., 1994. Five new cytotoxic T cell epitopes identified within Epstein-Barr virus nuclear antigen 3. *J. Gen. Virol.* 75 ( Pt 9), 2489–2493. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-9-2489>
- Cahir-McFarland, E.D., Carter, K., Rosenwald, A., Giltneane, J.M., Henrickson, S.E., Staudt, L.M., Kieff, E., 2004. Role of NF- $\kappa$ B in Cell Survival and Transcription of Latent Membrane Protein 1-Expressing or Epstein-Barr Virus Latency III-Infected Cells. *J. Virol.* 78, 4108–4119. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.8.4108-4119.2004>
- Cao, Y., Xie, L., Shi, F., Tang, M., Li, Y., Hu, J., Zhao, Lin, Zhao, Luqing, Yu, X., Luo, X., Liao, W., Bode, A.M., 2021. Targeting the signaling in Epstein–Barr virus-associated diseases: mechanism, regulation, and clinical study. *Signal Transduct. Target. Ther.* 6, 1–33. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00376-4>
- Castillo, J.J., Beltran, B.E., Miranda, R.N., Young, K.H., Chavez, J.C., Sotomayor, E.M., 2016. EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am. J. Hematol.* 91, 529–537. <https://doi.org/10.1002/ajh.24370>
- Casulo, C., Friedberg, J., 2015. Treating Burkitt Lymphoma in Adults. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 10, 266–271. <https://doi.org/10.1007/s11899-015-0263-4>
- Cen, O., Longnecker, R., 2015. Latent Membrane Protein 2 (LMP2). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 391, 151–180. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-22834-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-22834-1_5)
- Chae, Y.K., Arya, A., Iams, W., Cruz, M.R., Chandra, S., Choi, J., Giles, F., 2018. Current landscape and future of dual anti-CTLA4 and PD-1/PD-L1 blockade immunotherapy in cancer; lessons

- learned from clinical trials with melanoma and non-small cell lung cancer (NSCLC). *J. Immunother. Cancer* 6, 39. <https://doi.org/10.1186/s40425-018-0349-3>
- Chaigne-Delalande, B., Li, F.-Y., O'Connor, G.M., Lukacs, M.J., Jiang, P., Zheng, L., Shatzer, A., Biancalana, M., Pittaluga, S., Matthews, H.F., Jancel, T.J., Bleesing, J.J., Marsh, R.A., Kuijpers, T.W., Nichols, K.E., Lucas, C.L., Nagpal, S., Mehmet, H., Su, H.C., Cohen, J.I., Uzel, G., Lenardo, M.J., 2013. Mg2+ regulates cytotoxic functions of NK and CD8 T cells in chronic EBV infection through NKG2D. *Science* 341, 186–191. <https://doi.org/10.1126/science.1240094>
- Chambers, C.A., Kuhns, M.S., Egen, J.G., Allison, J.P., 2001. CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 565–594. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.565>
- Charette, M. de, Houot, R., 2018. Hide or defend, the two strategies of lymphoma immune evasion: potential implications for immunotherapy. *Haematologica* 103, 1256–1268. <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.184192>
- Chatterjee, B., Deng, Y., Holler, A., Nunez, N., Azzi, T., Vanoaica, L.D., Müller, A., Zdimerova, H., Antsiferova, O., Zbinden, A., Capaul, R., Dreyer, J.H., Nadal, D., Becher, B., Robinson, M.D., Stauss, H., Münz, C., 2019. CD8+ T cells retain protective functions despite sustained inhibitory receptor expression during Epstein-Barr virus infection in vivo. *PLOS Pathog.* 15, e1007748. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007748>
- Chen, J., 2012. Roles of the PI3K/Akt pathway in Epstein-Barr virus-induced cancers and therapeutic implications. *World J. Virol.* 1, 154–161. <https://doi.org/10.5501/wjv.v1.i6.154>
- Chen, J., Longnecker, R., 2019. Epithelial cell infection by Epstein-Barr virus. *FEMS Microbiol. Rev.* 43, 674–683. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz023>
- Chen, W., Liu, P., Wang, Y., Nie, W., Li, Z., Xu, W., Li, F., Zhou, Z., Zhao, M., Liu, H., 2013. Characterization of a soluble B7-H3 (sB7-H3) spliced from the intron and analysis of sB7-H3 in the sera of patients with hepatocellular carcinoma. *PloS One* 8, e76965. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076965>
- Chen, Y., Wang, Q., Shi, B., Xu, P., Hu, Z., Bai, L., Zhang, X., 2011. Development of a sandwich ELISA for evaluating soluble PD-L1 (CD274) in human sera of different ages as well as supernatants of PD-L1+ cell lines. *Cytokine* 56, 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.06.004>
- Chesnokova, L.S., Hutt-Fletcher, L.M., 2014. Epstein-Barr virus infection mechanisms. *Chin. J. Cancer* 33, 545–548. <https://doi.org/10.5732/cjc.014.10168>
- Cheung, A., Kieff, E., 1982. Long internal direct repeat in Epstein-Barr virus DNA. *J. Virol.* 44, 286–294. <https://doi.org/10.1128/jvi.44.1.286-294.1982>
- Chijioke, O., Azzi, T., Nadal, D., Münz, C., 2013. Innate immune responses against Epstein Barr virus infection. *J. Leukoc. Biol.* 94, 1185–1190. <https://doi.org/10.1189/jlb.0313173>
- Chijioke, O., Landtwing, V., Münz, C., 2016. NK Cell Influence on the Outcome of Primary Epstein-Barr Virus Infection. *Front. Immunol.* 0. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00323>
- Cho, M.L., Lee, B.-Y., You, S., 2010. Relationship between Oversulfation and Conformation of Low and High Molecular Weight Fucoidans and Evaluation of Their in Vitro Anticancer Activity. *Molecules* 16, 291–297. <https://doi.org/10.3390/molecules16010291>
- Cho, T.-M., Kim, W.-J., Moon, S.-K., 2014. AKT signaling is involved in fucoidan-induced inhibition of growth and migration of human bladder cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* 64, 344–352. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.12.009>
- Chung, B.K., Tsai, K., Allan, L.L., Zheng, D.J., Nie, J.C., Biggs, C.M., Hasan, M.R., Kozak, F.K., van den Elzen, P., Priatel, J.J., Tan, R., 2013. Innate immune control of EBV-infected B cells by invariant natural killer T cells. *Blood* 122, 2600–2608. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-01-480665>
- Ciraolo, E., Althoff, S., Ruß, J., Rosnev, S., Butze, M., Pühl, M., Frentsch, M., Bullinger, L., Na, I.-K., 2022. Simultaneous Genetic Ablation of PD-1, LAG-3, and TIM-3 in CD8 T Cells Delays Tumor

- Growth and Improves Survival Outcome. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 3207.  
<https://doi.org/10.3390/ijms23063207>
- Citkowska, A., Szekalska, M., Winnicka, K., 2019a. Possibilities of Fucoïdan Utilization in the Development of Pharmaceutical Dosage Forms. *Mar. Drugs* 17, 458.  
<https://doi.org/10.3390/md17080458>
- Citkowska, A., Szekalska, M., Winnicka, K., 2019b. Possibilities of Fucoïdan Utilization in the Development of Pharmaceutical Dosage Forms. *Mar. Drugs* 17.  
<https://doi.org/10.3390/md17080458>
- Coleman, C.B., Wohlford, E.M., Smith, N.A., King, C.A., Ritchie, J.A., Baresel, P.C., Kimura, H., Rochford, R., 2015. Epstein-Barr Virus Type 2 Latently Infects T Cells, Inducing an Atypical Activation Characterized by Expression of Lymphotactic Cytokines. *J. Virol.* 89, 2301–2312.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.03001-14>
- Collins, A.V., Brodie, D.W., Gilbert, R.J.C., Iaboni, A., Manso-Sancho, R., Walse, B., Stuart, D.I., van der Merwe, P.A., Davis, S.J., 2002. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity* 17, 201–210. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(02\)00362-x](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(02)00362-x)
- Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), 2014. Assessment report on *Fucus vesiculosus* L., thallus 55.
- Couronné, L., Bastard, C., Gaulard, P., Hermine, O., Bernard, O., 2015. Aspects moléculaires des lymphomes T périphériques (2) - Lymphome NK/T extra-ganglionnaire de type nasal, leucémie/lymphome T de l'adulte HTLV-1+, lymphome T associé à une entéropathie. *médecine/sciences* 31, 1023–1033. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153111017>
- Cristino, A.S., Nourse, J., West, R.A., Sabdia, M.B., Law, S.C., Gunawardana, J., Vari, F., Mujaj, S., Thillaiyampalam, G., Snell, C., Gough, M., Keane, C., Gandhi, M.K., 2019. EBV microRNA-BHRF1-2-5p targets the 3'UTR of immune checkpoint ligands PD-L1 and PD-L2. *Blood* 134, 2261–2270. <https://doi.org/10.1182/blood.2019000889>
- Crombie, J.L., LaCasce, A.S., 2019. Epstein Barr Virus Associated B-Cell Lymphomas and Iatrogenic Lymphoproliferative Disorders. *Front. Oncol.* 9, 109.  
<https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00109>
- Daassi, D., Mahoney, K.M., Freeman, G.J., 2020. The importance of exosomal PDL1 in tumour immune evasion. *Nat. Rev. Immunol.* 20, 209–215. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0264-y>
- Dambaugh, T., Beisel, C., Hummel, M., King, W., Fennewald, S., Cheung, A., Heller, M., Raab-Traub, N., Kieff, E., 1980. Epstein-Barr virus (B95-8) DNA VII: molecular cloning and detailed mapping. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 2999–3003.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.77.5.2999>
- David, A., Arnaud, N., Fradet, M., Lascaux, H., Ouk-Martin, C., Gachard, N., Zimber-Strobl, U., Feuillard, J., Faumont, N., 2017. c-Myc dysregulation is a co-transforming event for nuclear factor- $\kappa$ B activated B cells. *Haematologica* 102, 883–894.  
<https://doi.org/10.3324/haematol.2016.156281>
- Davis, R.S., 2020. Roles for the FCRL6 Immunoreceptor in Tumor Immunology. *Front. Immunol.* 11, 575175. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.575175>
- Dawson, C.W., Port, R.J., Young, L.S., 2012. The role of the EBV-encoded latent membrane proteins LMP1 and LMP2 in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma (NPC). *Semin. Cancer Biol.* 22, 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.01.004>
- Dawson, C.W., Tramontanis, G., Eliopoulos, A.G., Young, L.S., 2003. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway to promote cell survival and induce actin filament remodeling. *J. Biol. Chem.* 278, 3694–3704.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M209840200>
- de Fátima Aquino Moreira-Nunes, C., de Souza Almeida Titan Martins, C.N., Feio, D., Lima, I.K., Lamarão, L.M., de Souza, C.R.T., Costa, I.B., da Silva Maués, J.H., Soares, P.C., de Assumpção,

- P.P., Burbano, R.M.R., 2021. PD-L1 Expression Associated with Epstein—Barr Virus Status and Patients' Survival in a Large Cohort of Gastric Cancer Patients in Northern Brazil. *Cancers* 13, 3107. <https://doi.org/10.3390/cancers13133107>
- de Thé, G., 1993. The etiology of Burkitt's lymphoma and the history of the shaken dogmas. *Blood Cells* 19, 667–673; discussion 674-675.
- Delbende, C., Verwaerde, C., Mougel, A., Tranchand Bunel, D., 2009. Induction of therapeutic antibodies by vaccination against external loops of tumor-associated viral latent membrane protein. *J. Virol.* 83, 11734–11745. <https://doi.org/10.1128/JVI.00578-09>
- Dembic, Z., 2015. Chapter 3 - Activation of Cells of the Immune System, in: Dembic, Z. (Ed.), *The Cytokines of the Immune System*. Academic Press, Amsterdam, pp. 57–98. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-419998-9.00003-1>
- Demerlé, C., Gorvel, L., Olive, D., 2021. BTLA-HVEM Couple in Health and Diseases: Insights for Immunotherapy in Lung Cancer. *Front. Oncol. O.* <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.682007>
- Desai, P., Abboud, G., Stanfield, J., Thomas, P.G., Song, J., Ware, C.F., Croft, M., Salek-Ardakani, S., 2017. HVEM Imprints Memory Potential on Effector CD8 T Cells Required for Protective Mucosal Immunity. *J. Immunol.* 199, 2968–2975. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700959>
- Deux, J.-F., Meddahi-Pellé, A., Le Blanche, A.F., Feldman, L.J., Collic-Jouault, S., Brée, F., Boudghène, F., Michel, J.-B., Letourneur, D., 2002. Low Molecular Weight Fucoidan Prevents Neointimal Hyperplasia in Rabbit Iliac Artery In-Stent Restenosis Model. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 1604–1609. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000032034.91020.0A>
- Devergne, O., Hatzivassiliou, E., Izumi, K.M., Kaye, K.M., Kleijnen, M.F., Kieff, E., Mosialos, G., 1996. Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kappaB activation. *Mol. Cell. Biol.* 16, 7098–7108. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.12.7098>
- Dharnidharka, V.R., 2017. Peripheral Blood Epstein-Barr Viral Nucleic Acid Surveillance as a Marker for Posttransplant Cancer Risk. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 17, 611–616. <https://doi.org/10.1111/ajt.13982>
- Dillner, J., Kallin, B., Alexander, H., Ernberg, I., Uno, M., Ono, Y., Klein, G., Lerner, R.A., 1986. An Epstein-Barr virus (EBV)-determined nuclear antigen (EBNA5) partly encoded by the transformation-associated Bam WYH region of EBV DNA: preferential expression in lymphoblastoid cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 6641–6645. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.17.6641>
- Djaoud, Z., La, G., A, H., T, A., N, N.-G., D, O., D, N., Pj, N., C, M., P, P., 2017. Two alternate strategies for innate immunity to Epstein-Barr virus: One using NK cells and the other NK cells and  $\gamma\delta$  T cells [WWW Document]. *J. Exp. Med.* <https://doi.org/10.1084/jem.20161017>
- Dowell, A.C., Haigh, T.A., Ryan, G.B., Turner, J.E., Long, H.M., Taylor, G.S., 2021. Cytotoxic CD4+ T-cells specific for EBV capsid antigen BORF1 are maintained in long-term latently infected healthy donors. *PLOS Pathog.* 17, e1010137. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010137>
- Draoua, H.Y., Tsao, L., Mancini, D.M., Addonizio, L.J., Bhagat, G., Alobeid, B., 2004. T-cell post-transplantation lymphoproliferative disorders after cardiac transplantation: a single institutional experience. *Br. J. Haematol.* 127, 429–432. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.05212.x>
- Drouet, E., 2019. 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. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88607>
- Duan, Y., Li, J., Jing, X., Ding, X., Yu, Y., Zhao, Q., 2020. Fucoidan Induces Apoptosis and Inhibits Proliferation of Hepatocellular Carcinoma via the p38 MAPK/ERK and PI3K/Akt Signal Pathways. *Cancer Manag. Res.* 12, 1713–1723. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S243495>

- Dueñas, S., Aguila, S.A., Pimienta, G., 2017. A workflow for in silico design of hIL-10 and ebvIL-10 inhibitors using well-known miniprotein scaffolds. *J. Mol. Model.* 23, 118. <https://doi.org/10.1007/s00894-017-3276-1>
- Dukers, D.F., Meij, P., Vervoort, M.B., Vos, W., Scheper, R.J., Meijer, C.J., Bloemena, E., Middeldorp, J.M., 2000. Direct immunosuppressive effects of EBV-encoded latent membrane protein 1. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 165, 663–670. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.2.663>
- Dunmire, S.K., Hogquist, K.A., Balfour, H.H., 2015. Infectious Mononucleosis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 390, 211–240. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8_9)
- Durand-Panteix, S., Farhat, M., Youlyouz-Marfak, I., Rouaud, P., Ouk-Martin, C., David, A., Faumont, N., Feuillard, J., Jayat-Vignoles, C., 2012. B7-H1, which represses EBV-immortalized B cell killing by autologous T and NK cells, is oppositely regulated by c-Myc and EBV latency III program at both mRNA and secretory lysosome levels. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 189, 181–190. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102277>
- Eisenberg, R.J., Atanasiu, D., Cairns, T.M., Gallagher, J.R., Krummenacher, C., Cohen, G.H., 2012. Herpes virus fusion and entry: a story with many characters. *Viruses* 4, 800–832. <https://doi.org/10.3390/v4050800>
- Eliopoulos, A.G., Gallagher, N.J., Blake, S.M., Dawson, C.W., Young, L.S., 1999. Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. *J. Biol. Chem.* 274, 16085–16096. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.23.16085>
- Epstein, M.A., Henle, G., Achong, B.G., Barr, Y.M., 1965. MORPHOLOGICAL AND BIOLOGICAL STUDIES ON A VIRUS IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. *J. Exp. Med.* 121, 761–770.
- Ermakova, S., Sokolova, R., Kim, S.-M., Um, B.-H., Isakov, V., Zvyagintseva, T., 2011a. Fucoidans from Brown Seaweeds *Sargassum hornery*, *Eclonia cava*, *Costaria costata*: Structural Characteristics and Anticancer Activity. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 164, 841–850. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9178-2>
- Ermakova, S., Sokolova, R., Kim, S.-M., Um, B.-H., Isakov, V., Zvyagintseva, T., 2011b. Fucoidans from Brown Seaweeds *Sargassum hornery*, *Eclonia cava*, *Costaria costata*: Structural Characteristics and Anticancer Activity. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 164, 841–850. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9178-2>
- Fangazio, M., Ladewig, E., Gomez, K., Garcia-Ibanez, L., Kumar, R., Teruya-Feldstein, J., Rossi, D., Filip, I., Pan-Hammarström, Q., Inghirami, G., Boldorini, R., Ott, G., Staiger, A.M., Chapuy, B., Gaidano, G., Bhagat, G., Basso, K., Rabadan, R., Pasqualucci, L., Dalla-Favera, R., 2021. Genetic mechanisms of HLA-I loss and immune escape in diffuse large B cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 118, e2104504118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2104504118>
- Farhad, M., Rolig, A.S., Redmond, W.L., 2018. The role of Galectin-3 in modulating tumor growth and immunosuppression within the tumor microenvironment. *Oncoimmunology* 7, e1434467. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1434467>
- Faumont, N., Durand-Panteix, S., Schlee, M., Grömminger, S., Schuhmacher, M., Hölzel, M., Laux, G., Mailhammer, R., Rosenwald, A., Staudt, L.M., Bornkamm, G.W., Feuillard, J., 2009. c-Myc and Rel/NF-kappaB are the two master transcriptional systems activated in the latency III program of Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *J. Virol.* 83, 5014–5027. <https://doi.org/10.1128/JVI.02264-08>
- Feng, R., Chen, Y., Liu, Y., Zhou, Q., Zhang, W., 2021. The role of B7-H3 in tumors and its potential in clinical application. *Int. Immunopharmacol.* 101, 108153. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108153>
- Ferla, V., Rossi, F.G., Goldaniga, M.C., Baldini, L., 2020. Biological Difference Between Epstein-Barr Virus Positive and Negative Post-transplant Lymphoproliferative Disorders and Their Clinical Impact. *Front. Oncol.* 10.



- Fingerroth, J.D., Clabby, M.L., Strominger, J.D., 1988. Characterization of a T-lymphocyte Epstein-Barr virus/C3d receptor (CD21). *J. Virol.* 62, 1442–1447. <https://doi.org/10.1128/JVI.62.4.1442-1447.1988>
- Fischer, E., Delibrias, C., Kazatchkine, M.D., 1991. Expression of CR2 (the C3dg/EBV receptor, CD21) on normal human peripheral blood T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 146, 865–869.
- Fitton, J.H., Stringer, D.N., Karpinić, S.S., 2015. Therapies from Fucoïdan: An Update. *Mar. Drugs* 13, 5920–5946. <https://doi.org/10.3390/md13095920>
- Flem-Karlsen, K., Fodstad, Ø., Nunes-Xavier, C.E., 2020. B7-H3 Immune Checkpoint Protein in Human Cancer. *Curr. Med. Chem.* 27, 4062–4086. <https://doi.org/10.2174/0929867326666190517115515>
- Forcioli, J., Meyer, B., Fabiani, B., 2005. Granulome malin centrofacial ou lymphome nasal T/NK. *EMC - Oto-Rhino-Laryngol.* 2, 390–400. <https://doi.org/10.1016/j.emcorl.2005.09.002>
- Frappier, L., 2012. The Epstein-Barr Virus EBNA1 Protein. *Scientifica* 2012, 438204. <https://doi.org/10.6064/2012/438204>
- Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., Bartel, D.P., 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19, 92–105. <https://doi.org/10.1101/gr.082701.108>
- Fruehling, S., Lee, S., Carmichael, R., Frech, B., Laux, G., Kremmer, E., Grässer, F., Longnecker, R., 1996. Identification of latent membrane protein 2A (LMP2A) domains essential for the LMP2A dominant-negative effect on B-lymphocyte surface immunoglobulin signal transduction. *J. Virol.* 70, 6216–26. <https://doi.org/10.1128/JVI.70.9.6216-6226.1996>
- Fruehling, S., Longnecker, R., 1997. The immunoreceptor tyrosine-based activation motif of Epstein-Barr virus LMP2A is essential for blocking BCR-mediated signal transduction. *Virology* 235, 241–251. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8690>
- Frydenlund, N., Mahalingam, M., 2017. PD-L1 and immune escape: insights from melanoma and other lineage-unrelated malignancies. *Hum. Pathol.* 66, 13–33. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2017.06.012>
- Fujiwara, S., Nakamura, H., 2020. Chronic Active Epstein–Barr Virus Infection: Is It Immunodeficiency, Malignancy, or Both? *Cancers* 12, 3202. <https://doi.org/10.3390/cancers12113202>
- Fukayama, M., Ibuka, T., Hayashi, Y., Ooba, T., Koike, M., Mizutani, S., 1993. Epstein-Barr virus in pyothorax-associated pleural lymphoma. *Am. J. Pathol.* 143, 1044–1049.
- Fukuda, M., Kawaguchi, Y., 2014. Role of the Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif of Latent Membrane Protein 2A (LMP2A) in Epstein-Barr Virus LMP2A-Induced Cell Transformation. *J. Virol.* 88, 5189–5194. <https://doi.org/10.1128/JVI.03714-13>
- Fukuda, M., Longnecker, R., 2004. Latent membrane protein 2A inhibits transforming growth factor-beta 1-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J. Virol.* 78, 1697–1705. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.4.1697-1705.2004>
- Garibal, J., Hollville, E., Bell, A.I., Kelly, G.L., Renouf, B., Kawaguchi, Y., Rickinson, A.B., Wiels, J., 2007. Truncated form of the Epstein-Barr virus protein EBNA-LP protects against caspase-dependent apoptosis by inhibiting protein phosphatase 2A. *J. Virol.* 81, 7598–7607. <https://doi.org/10.1128/JVI.02435-06>
- Gequelin, L.C.F., Riediger, I.N., Nakatani, S.M., Biondo, A.W., Bonfim, C.M., 2011. Epstein-Barr virus: general factors, virus-related diseases and measurement of viral load after transplant. *Rev. Bras. Hematol. E Hemoter.* 33, 383–388. <https://doi.org/10.5581/1516-8484.20110103>
- Ghasemi, F., Tessier, T.M., Gameiro, S.F., Maciver, A.H., Cecchini, M.J., Mymryk, J.S., 2020. High MHC-II expression in Epstein–Barr virus-associated gastric cancers suggests that tumor cells serve an important role in antigen presentation. *Sci. Rep.* 10, 14786. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71775-4>

- Gordadze, A.V., Onunwor, C.W., Peng, R., Poston, D., Kremmer, E., Ling, P.D., 2004. EBNA2 Amino Acids 3 to 30 Are Required for Induction of LMP-1 and Immortalization Maintenance. *J. Virol.* 78, 3919–3929. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.8.3919-3929.2004>
- Gosselin, J., Tomolu, A., Gallo, R.C., Flaman, L., 1999. Interleukin-15 as an activator of natural killer cell-mediated antiviral response. *Blood* 94, 4210–4219.
- Green, M.R., Rodig, S., Juszczynski, P., Ouyang, J., Sinha, P., O'Donnell, E., Neubergh, D., Shipp, M.A., 2012. Constitutive AP-1 Activity and EBV Infection Induce PD-L1 in Hodgkin Lymphomas and Post-transplant Lymphoproliferative Disorders: Implications for Targeted Therapy. *Clin. Cancer Res.* 18, 1611–1618. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1942>
- Grossman, S.R., Johannsen, E., Tong, X., Yalamanchili, R., Kieff, E., 1994. The Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivator is directed to response elements by the J kappa recombination signal binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 7568–7572. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.16.7568>
- Gu, D., Ao, X., Yang, Y., Chen, Z., Xu, X., 2018. Soluble immune checkpoints in cancer: production, function and biological significance. *J. Immunother. Cancer* 6, 132. <https://doi.org/10.1186/s40425-018-0449-0>
- Guerreiro-Cacais, A., Li, L., Donati, D., Bejarano, M.T., Morgan, A., Masucci, M., Hutt-Fletcher, L., Levitsky, V., 2004. Capacity of Epstein-Barr virus to infect monocytes and inhibit their development into dendritic cells is affected by the cell type supporting virus replication. *J. Gen. Virol.* 85, 2767–78. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80140-0>
- Guo, Y., Shen, R., Yu, L., Zheng, X., Cui, R., Song, Y., Wang, D., 2020. Roles of galectin-3 in the tumor microenvironment and tumor metabolism (Review). *Oncol. Rep.* 44, 1799–1809. <https://doi.org/10.3892/or.2020.7777>
- Gupta, D., Silva, M., Radziun, K., Martinez, D.C., Hill, C.J., Marshall, J., Hearnden, V., Puertas-Mejia, M.A., Reilly, G.C., 2020. Fucoidan Inhibition of Osteosarcoma Cells is Species and Molecular Weight Dependent. *Mar. Drugs* 18, 104. <https://doi.org/10.3390/md18020104>
- Haile, S.T., Dalal, S.P., Clements, V., Tamada, K., Ostrand-Rosenberg, S., 2013. Soluble CD80 Restores T Cell Activation and Overcomes Tumor Cell Programmed Death Ligand 1–Mediated Immune Suppression. *J. Immunol.* 191, 2829–2836. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202777>
- Han, Y., Lee, J.H., Lee, S.H., 2015. Antitumor Effects of Fucoidan on Human Colon Cancer Cells via Activation of Akt Signaling. *Biomol Ther (Seoul)* 23, 225–232. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2014.136>
- Harada, S., Kieff, E., 1997. Epstein-Barr virus nuclear protein LP stimulates EBNA-2 acidic domain-mediated transcriptional activation. *J. Virol.* 71, 6611–6618.
- He, X.-H., Liu, Y., Xu, L.-H., Zeng, Y.-Y., 2004. Cloning and identification of two novel splice variants of human PD-L2. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 36, 284–289. <https://doi.org/10.1093/abbs/36.4.284>
- Heim, L., Kachler, K., Siegmund, R., Trufa, D.I., Mittler, S., Geppert, C.-I., Friedrich, J., Rieker, R.J., Sirbu, H., Finotto, S., 2019. Increased expression of the immunosuppressive interleukin-35 in patients with non-small cell lung cancer. *Br. J. Cancer* 120, 903–912. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0444-3>
- Henle, G., Henle, W., 1966. Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. *J. Bacteriol.* 91, 1248–1256. <https://doi.org/10.1128/jb.91.3.1248-1256.1966>
- Henle, W., Henle, G., Lennette, E.T., 1979. The Epstein-Barr Virus. *Sci. Am.* 241, 48–59. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0779-48>
- Hitt, M.M., Allday, M.J., Hara, T., Karran, L., Jones, M.D., Busson, P., Tursz, T., Ernberg, I., Griffin, B.E., 1989. EBV gene expression in an NPC-related tumour. *EMBO J.* 8, 2639–2651.
- Hoagland, D.R., Lieb, L.L., 1915. THE COMPLEX CARBOHYDRATES AND FORMS OF SULPHUR IN MARINE ALGAE OF THE PACIFIC COAST. *J. Biol. Chem.* 23, 287–297. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)87617-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)87617-7)

- Holtkamp, A.D., Kelly, S., Ulber, R., Lang, S., 2009. Fucoidans and fucoidanases—focus on techniques for molecular structure elucidation and modification of marine polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1790-x>
- Hsieh, J.J., Henkel, T., Salmon, P., Robey, E., Peterson, M.G., Hayward, S.D., 1996. Truncated mammalian Notch1 activates CBF1/RBPJk-repressed genes by a mechanism resembling that of Epstein-Barr virus EBNA2. *Mol. Cell. Biol.* 16, 952–959.
- Hu, H., Luo, M.-L., Desmedt, C., Nabavi, S., Yadegarynia, S., Hong, A., Konstantinopoulos, P.A., Gabrielson, E., Hines-Boykin, R., Pihan, G., Yuan, X., Sotiriou, C., Dittmer, D.P., Fingerroth, J.D., Wulf, G.M., 2016. Epstein-Barr Virus Infection of Mammary Epithelial Cells Promotes Malignant Transformation. *EBioMedicine* 9, 148–160. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.05.025>
- Hu, Z., Usherwood, E.J., 2014. Immune escape of  $\gamma$ -herpesviruses from adaptive immunity. *Rev. Med. Virol.* 24, 365–378. <https://doi.org/10.1002/rmv.1791>
- Huang, R.-Y., Francois, A., McGray, A.R., Miliotto, A., Odunsi, K., 2016. Compensatory upregulation of PD-1, LAG-3, and CTLA-4 limits the efficacy of single-agent checkpoint blockade in metastatic ovarian cancer. *Oncoimmunology* 6, e1249561. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1249561>
- Hurwitz, S.N., Nkosi, D., Conlon, M.M., York, S.B., Liu, X., Tremblay, D.C., Meckes, D.G., 2017. CD63 Regulates Epstein-Barr Virus LMP1 Exosomal Packaging, Enhancement of Vesicle Production, and Noncanonical NF- $\kappa$ B Signaling. *J. Virol.* 91, e02251-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.02251-16>
- Hussain, T., Kotnis, A., Sarin, R., Mulherkar, R., 2012. Establishment & characterization of lymphoblastoid cell lines from patients with multiple primary neoplasms in the upper aerodigestive tract & healthy individuals. *Indian J. Med. Res.* 135, 820–829.
- Hussain, T., Mulherkar, R., 2012. Lymphoblastoid Cell lines: a Continuous in Vitro Source of Cells to Study Carcinogen Sensitivity and DNA Repair. *Int. J. Mol. Cell. Med.* 1, 75–87.
- Hutcheson, R.L., Chakravorty, A., Sugden, B., 2021. Burkitt Lymphomas Evolve to Escape Dependencies on Epstein-Barr Virus. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10.
- Hutt-Fletcher, L.M., 2007. Epstein-Barr Virus Entry. *J. Virol.* 81, 7825–7832. <https://doi.org/10.1128/JVI.00445-07>
- Hwang, P.-A., Yan, M.-D., Lin, H.-T.V., Li, K.-L., Lin, Y.-C., 2016. Toxicological Evaluation of Low Molecular Weight Fucoidan in Vitro and in Vivo. *Mar. Drugs* 14. <https://doi.org/10.3390/md14070121>
- Hyeseon, K., Lee, A., Jung, W.-K., Jeon, T., 2015. Effects of fucoidan on cell morphology and migration in osteoblasts. *Food Sci. Biotechnol.* 24, 699–704. <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0091-2>
- Iempridee, T., Das, S., Xu, I., Mertz, J.E., 2011. Transforming growth factor beta-induced reactivation of Epstein-Barr virus involves multiple Smad-binding elements cooperatively activating expression of the latent-lytic switch BZLF1 gene. *J. Virol.* 85, 7836–7848. <https://doi.org/10.1128/JVI.01197-10>
- Iizasa, H., Kim, H., Kartika, A.V., Kanehiro, Y., Yoshiyama, H., 2020. Role of Viral and Host microRNAs in Immune Regulation of Epstein-Barr Virus-Associated Diseases. *Front. Immunol.* 11.
- Imai, S., Koizumi, S., Sugiura, M., Tokunaga, M., Uemura, Y., Yamamoto, N., Tanaka, S., Sato, E., Osato, T., 1994. Gastric carcinoma: monoclonal epithelial malignant cells expressing Epstein-Barr virus latent infection protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 9131–9135.
- Incrocci, R., McCormack, M., Swanson-Mungerson, M., 2013. Epstein-Barr virus LMP2A increases IL-10 production in mitogen-stimulated primary B-cells and B-cell lymphomas. *J. Gen. Virol.* 94, 1127–1133. <https://doi.org/10.1099/vir.0.049221-0>

- Isobe, Y., Sugimoto, K., Yang, L., Tamayose, K., Egashira, M., Kaneko, T., Takada, K., Oshimi, K., 2004. Epstein-Barr Virus Infection of Human Natural Killer Cell Lines and Peripheral Blood Natural Killer Cells. *Cancer Res.* 64, 2167–2174. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-1562>
- Jeannin, P., Magistrelli, G., Aubry, J.-P., Caron, G., Gauchat, J.-F., Renno, T., Herbault, N., Goetsch, L., Blaecke, A., Dietrich, P.-Y., Bonnefoy, J.-Y., Delneste, Y., 2000. Soluble CD86 Is a Costimulatory Molecule for Human T Lymphocytes. *Immunity* 13, 303–312. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)00030-3](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)00030-3)
- Jiang, X., Wang, J., Deng, X., Xiong, F., Ge, J., Xiang, B., Wu, X., Ma, J., Zhou, M., Li, X., Li, Y., Li, G., Xiong, W., Guo, C., Zeng, Z., 2019. Role of the tumor microenvironment in PD-L1/PD-1-mediated tumor immune escape. *Mol. Cancer* 18, 10. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0928-4>
- Jiang, X.-N., Yu, B.-H., Yan, W.-H., Lee, J., Zhou, X.-Y., Li, X.-Q., 2020. Epstein–Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma features disrupted antigen capture/presentation and hijacked T-cell suppression. *OncolImmunology* 9, 1683346. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1683346>
- Jiang, Y., Li, Y., Zhu, B., 2015. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Death Dis.* 6, e1792. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.162>
- Jin, H., Park, Y., 2021. Hitting the complexity of the TIGIT-CD96-CD112R-CD226 axis for next-generation cancer immunotherapy. *BMB Rep.* 54, 2–11. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2021.54.1.229>
- Jin, J.-O., Chauhan, P.S., Arukha, A.P., Chavda, V., Dubey, A., Yadav, D., 2021. The Therapeutic Potential of the Anticancer Activity of Fucoidan: Current Advances and Hurdles. *Mar. Drugs* 19, 265. <https://doi.org/10.3390/md19050265>
- Jin, J.-O., Song, M.-G., Kim, Y.-N., Park, J.-I., Kwak, J.-Y., 2010. The mechanism of fucoidan-induced apoptosis in leukemic cells: involvement of ERK1/2, JNK, glutathione, and nitric oxide. *Mol. Carcinog.* 49, 771–782. <https://doi.org/10.1002/mc.20654>
- Jin, J.-O., Zhang, W., Du, J.-Y., Wong, K.-W., Oda, T., Yu, Q., 2014. Fucoidan Can Function as an Adjuvant In Vivo to Enhance Dendritic Cell Maturation and Function and Promote Antigen-Specific T Cell Immune Responses. *PLoS ONE* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099396>
- Jochum, S., Moosmann, A., Lang, S., Hammerschmidt, W., Zeidler, R., 2012. The EBV immunoevasins vIL-10 and BNLF2a protect newly infected B cells from immune recognition and elimination. *PLoS Pathog.* 8, e1002704. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002704>
- Johansson, P., Jansson, A., Rüetschi, U., Rymo, L., 2010. The p38 Signaling Pathway Upregulates Expression of the Epstein-Barr Virus LMP1 Oncogene. *J. Virol.* 84, 2787–2797. <https://doi.org/10.1128/JVI.01052-09>
- Jones, J.F., Shurin, S., Abramowsky, C., Tubbs, R.R., Sciotto, C.G., Wahl, R., Sands, J., Gottman, D., Katz, B.Z., Sklar, J., 1988. T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infections. *N. Engl. J. Med.* 318, 733–741. <https://doi.org/10.1056/NEJM198803243181203>
- Joshi, M., Ansell, S.M., 2020. Activating the Antitumor Immune Response in Non-Hodgkin Lymphoma Using Immune Checkpoint Inhibitors. *J. Immunol. Res.* 2020, 8820377. <https://doi.org/10.1155/2020/8820377>
- Jud, A., Kotur, M., Berger, C., Gysin, C., Nadal, D., Lünemann, A., 2016. Tonsillar CD56brightNKG2A+ NK cells restrict primary Epstein-Barr virus infection in B cells via IFN- $\gamma$ . *Oncotarget* 8, 6130–6141. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14045>
- Kaiser, C., Laux, G., Eick, D., Jochner, N., Bornkamm, G.W., Kempkes, B., 1999. The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J. Virol.* 73, 4481–4484. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.5.4481-4484.1999>

- Kakoulidou, M., Giscombe, R., Zhao, X., Lefvert, A.K., Wang, X., 2007. Human Soluble CD80 is generated by alternative splicing, and recombinant soluble CD80 binds to CD28 and CD152 influencing T-cell activation. *Scand. J. Immunol.* 66, 529–537. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2007.02009.x>
- Kanavaros, P., Gaulard, P., 2001. Virus epstein-barr et lymphomes T/NK : intérêt physiopathologique et pratique. *Rev. Fr. Lab.* 2001, 65–72. [https://doi.org/10.1016/S0338-9898\(01\)80425-X](https://doi.org/10.1016/S0338-9898(01)80425-X)
- Kaschka, W.P., Hilgers, R., Skvaril, F., 1982. Humoral immune response in Epstein-Barr virus infections. I. Elevated serum concentration of the IgG1 subclass in infectious mononucleosis and nasopharyngeal carcinoma. *Clin. Exp. Immunol.* 49, 149–156.
- Keating, S., Prince, S., Jones, M., Rowe, M., 2002. The lytic cycle of Epstein-Barr virus is associated with decreased expression of cell surface major histocompatibility complex class I and class II molecules. *J. Virol.* 76, 8179–8188. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.16.8179-8188.2002>
- Kempkes, B., Robertson, E.S., 2015. Epstein-Barr Virus Latency: Current and Future Perspectives. *Curr. Opin. Virol.* 14, 138–144. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.09.007>
- Kennedy, G., Komano, J., Sugden, B., 2003. Epstein-Barr virus provides a survival factor to Burkitt's lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 14269–14274. <https://doi.org/10.1073/pnas.2336099100>
- Kerr, J.R., 2019. Epstein-Barr virus (EBV) reactivation and therapeutic inhibitors. *J. Clin. Pathol.* 72, 651–658. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2019-205822>
- Keryer-Bibens, C., Pioche-Durieu, C., Villemant, C., Souquère, S., Nishi, N., Hirashima, M., Middeldorp, J., Busson, P., 2006. Exosomes released by EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells convey the viral Latent Membrane Protein 1 and the immunomodulatory protein galectin 9. *BMC Cancer* 6, 283. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-283>
- Khan, M., Arooj, S., Wang, H., 2021. Soluble B7-CD28 Family Inhibitory Immune Checkpoint Proteins and Anti-Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* 12.
- Khan, M., Arooj, S., Wang, H., 2020. NK Cell-Based Immune Checkpoint Inhibition. *Front. Immunol.* 11, 167. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00167>
- Kikuta, H., Taguchi, Y., Tomizawa, K., Kojima, K., Kawamura, N., Ishizaka, A., Sakiyama, Y., Matsumoto, S., Imai, S., Kinoshita, T., Koizumi, S., Osato, T., Kobayashi, I., Hamada, I., Hirai, K., 1988. Epstein-Barr virus genome-positive T lymphocytes in a boy with chronic active EBV infection associated with Kawasaki-like disease. *Nature* 333, 455–457. <https://doi.org/10.1038/333455a0>
- Kim, E.J., Park, S.Y., Lee, J.-Y., Park, J.H.Y., 2010. Fucoidan present in brown algae induces apoptosis of human colon cancer cells. *BMC Gastroenterol.* 10, 96. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-10-96>
- Kim, J.H., Kim, W.S., Hong, J.Y., Ryu, K.J., Kim, S.J., Park, C., 2017. Epstein-Barr virus EBNA2 directs doxorubicin resistance of B cell lymphoma through CCL3 and CCL4-mediated activation of NF- $\kappa$ B and Btk. *Oncotarget* 8, 5361–5370. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14243>
- Kim, J.M., Chen, D.S., 2016. Immune escape to PD-L1/PD-1 blockade: seven steps to success (or failure). *Ann. Oncol.* 27, 1492–1504. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw217>
- Kim, P.S., Ahmed, R., 2010. Features of responding T cells in cancer and chronic infection. *Curr. Opin. Immunol.* 22, 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.02.005>
- Kim, S., Lee, H.-J., Jeon, M.-S., Yi, T., Song, S.U., 2015. Galectin-9 is Involved in Immunosuppression Mediated by Human Bone Marrow-derived Clonal Mesenchymal Stem Cells. *Immune Netw.* 15, 241–251. <https://doi.org/10.4110/in.2015.15.5.241>
- Kim, W.M., Huang, Y.-H., Gandhi, A., Blumberg, R.S., 2019. CEACAM1 structure and function in immunity and its therapeutic implications. *Semin. Immunol.* 42, 101296. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.101296>

- Kimura, H., Hoshino, Y., Kanegane, H., Tsuge, I., Okamura, T., Kawa, K., Morishima, T., 2001. Clinical and virologic characteristics of chronic active Epstein-Barr virus infection. *Blood* 98, 280–286. <https://doi.org/10.1182/blood.v98.2.280>
- Kisielow, M., 2006. Lymphocyte activation gene-3 : the expression and function in the immune system. undefined.
- Klibi, J., Niki, T., Riedel, A., Pioche-Durieu, C., Souquere, S., Rubinstein, E., Le Moulec, S., Guigay, J., Hirashima, M., Guemira, F., Adhikary, D., Mautner, J., Busson, P., 2009. Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9-containing exosomes released by Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells. *Blood* 113, 1957–1966. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-142596>
- Kouo, T., Huang, L., Pucsek, A.B., Cao, M., Solt, S., Armstrong, T., Jaffee, E., 2015. Galectin-3 Shapes Antitumor Immune Responses by Suppressing CD8+ T Cells via LAG-3 and Inhibiting Expansion of Plasmacytoid Dendritic Cells. *Cancer Immunol. Res.* 3, 412–423. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0150>
- Labrecque, L.G., Barnes, D.M., Fentiman, I.S., Griffin, B.E., 1995. Epstein-Barr virus in epithelial cell tumors: a breast cancer study. *Cancer Res.* 55, 39–45.
- Lam, N., Sugden, B., 2003. CD40 and its viral mimic, LMP1: similar means to different ends. *Cell. Signal.* 15, 9–16. [https://doi.org/10.1016/s0898-6568\(02\)00083-9](https://doi.org/10.1016/s0898-6568(02)00083-9)
- Lange, P.T., White, M.C., Damania, B., 2022. Activation and Evasion of Innate Immunity by Gammaherpesviruses. *J. Mol. Biol.* 434, 167214. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167214>
- Lawson, J.S., Glenn, W.K., 2021. Catching viral breast cancer. *Infect. Agent. Cancer* 16, 37. <https://doi.org/10.1186/s13027-021-00366-3>
- Le Clorennec, C., Youlyouz-Marfak, I., Adriaenssens, E., Coll, J., Bornkamm, G.W., Feuillard, J., 2006. EBV latency III immortalization program sensitizes B cells to induction of CD95-mediated apoptosis via LMP1: role of NF-kappaB, STAT1, and p53. *Blood* 107, 2070–2078. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-05-2053>
- Le Roux, A., Kerdiles, B., Walls, D., Dedieu, J.-F., Perricaudet, M., 1994. The Epstein-Barr Virus Determined Nuclear Antigens EBNA-3A, -3B, and -3C Repress EBNA-2-Mediated Transactivation of the Viral Terminal Protein 1 Gene Promoter. *Virology* 205, 596–602. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1687>
- Lee, H., Kim, J.-S., Kim, E., 2012. Fucoïdan from Seaweed *Fucus vesiculosus* Inhibits Migration and Invasion of Human Lung Cancer Cell via PI3K-Akt-mTOR Pathways. *PLoS ONE* 7, e50624. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050624>
- Levine, P.H., Ablashi, D.V., Berard, C.W., Carbone, P.P., Waggoner, D.E., Malan, L., 1971. Elevated antibody titers to Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease. *Cancer* 27, 416–421. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197102\)27:2<416::aid-cnrcr2820270227>3.0.co;2-w](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197102)27:2<416::aid-cnrcr2820270227>3.0.co;2-w)
- Li, B., Lu, F., Wei, X., Zhao, R., 2008. Fucoïdan: Structure and Bioactivity. *Molecules* 13, 1671–1695. <https://doi.org/10.3390/molecules13081671>
- Li, C., Romero-Masters, J.C., Huebner, S., Ohashi, M., Hayes, M., Bristol, J.A., Nelson, S.E., Eichelberg, M.R., Sciver, N.V., Ranheim, E.A., Scott, R.S., Johannsen, E.C., Kenney, S.C., 2020. EBNA2-deleted Epstein-Barr virus (EBV) isolate, P3HR1, causes Hodgkin-like lymphomas and diffuse large B cell lymphomas with type II and Wp-restricted latency types in humanized mice. *PLOS Pathog.* 16, e1008590. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008590>
- Li, J., Lee, Y., Li, Y., Jiang, Y., Lu, H., Zang, W., Zhao, X., Liu, L., Chen, Y., Tan, H., Yang, Z., Zhang, M.Q., Mak, T.W., Ni, L., Dong, C., 2018. Co-inhibitory Molecule B7 Superfamily Member 1 Expressed by Tumor-Infiltrating Myeloid Cells Induces Dysfunction of Anti-tumor CD8+ T Cells. *Immunity* 48, 773-786.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.018>
- Li, L., Liu, D., Hutt-Fletcher, L., Morgan, A., Masucci, M.G., Levitsky, V., 2002. Epstein-Barr virus inhibits the development of dendritic cells by promoting apoptosis of their monocyte

- precursors in the presence of granulocyte macrophage–colony-stimulating factor and interleukin-4. *Blood* 99, 3725–3734. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.10.3725>
- Li, X., Bhaduri-McIntosh, S., 2016. A Central Role for STAT3 in Gammaherpesvirus-Life Cycle and - Diseases. *Front. Microbiol.* 7.
- Liang, C.-L., Chen, J.-L., Hsu, Y.-P.P., Ou, J.T., Chang, Y.-S., 2002. Epstein-Barr virus BZLF1 gene is activated by transforming growth factor-beta through cooperativity of Smads and c-Jun/c-Fos proteins. *J. Biol. Chem.* 277, 23345–23357. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107420200>
- Lin, M.-C., Lin, Y.-C., Chen, S.-T., Young, T.-H., Lou, P.-J., 2017. Therapeutic vaccine targeting Epstein-Barr virus latent protein, LMP1, suppresses LMP1-expressing tumor growth and metastasis in vivo. *BMC Cancer* 17, 18. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-3027-1>
- Lin, Y., Qi, X., Liu, H., Xue, K., Xu, S., Tian, Z., 2020. The anti-cancer effects of fucoidan: a review of both in vivo and in vitro investigations. *Cancer Cell Int.* 20, 154. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01233-8>
- Lin, Z., Tan, X., Zhang, Y., Li, F., Luo, P., Liu, H., 2020. Molecular Targets and Related Biologic Activities of Fucoidan: A Review. *Mar. Drugs* 18. <https://doi.org/10.3390/md18080376>
- Lindquister, G.J., Greer, K.A., Stewart, J.P., Sample, J.T., 2014. Epstein-Barr virus IL-10 gene expression by a recombinant murine gammaherpesvirus in vivo enhances acute pathogenicity but does not affect latency or reactivation. *Herpesviridae* 5, 1. <https://doi.org/10.1186/2042-4280-5-1>
- Ling, P.D., Peng, R.S., Nakajima, A., Yu, J.H., Tan, J., Moses, S.M., Yang, W.-H., Zhao, B., Kieff, E., Bloch, K.D., Bloch, D.B., 2005. Mediation of Epstein–Barr virus EBNA-LP transcriptional coactivation by Sp100. *EMBO J.* 24, 3565–3575. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600820>
- Liu, J., Haroun, F., Bittoun, P., Vassy, J., Femandjian, S., Wdziedzic-Bakala, J., Boisson-vidal, C., 2005. Inhibitory effect of fucoidan on the adhesion of adenocarcinoma cells to fibronectin. *Anticancer Res.* 25, 2129–33.
- Liu, K., Huang, A., Nie, J., Tan, J., Xing, S., Qu, Y., Jiang, K., 2021. IL-35 Regulates the Function of Immune Cells in Tumor Microenvironment. *Front. Immunol.* 12.
- Liu, S., Yang, J., Peng, X., Li, J., Zhu, C., 2020. The Natural Product Fucoidan Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis of Human Ovarian Cancer Cells: Focus on the PI3K/Akt Signaling Pathway. *Cancer Manag. Res.* 12, 6195–6207. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S254784>
- Liu, W., Chou, T.-F., Garrett-Thomson, S.C., Seo, G.-Y., Fedorov, E., Ramagopal, U.A., Bonanno, J.B., Wang, Q., Kim, K., Garforth, S.J., Kakugawa, K., Cheroutre, H., Kronenberg, M., Almo, S.C., 2021. HVEM structures and mutants reveal distinct functions of binding to LIGHT and BTLA/CD160. *J. Exp. Med.* 218, e20211112. <https://doi.org/10.1084/jem.20211112>
- Lo, A.K.-F., Dawson, C.W., Lung, H.L., Wong, K.-L., Young, L.S., 2021. The Role of EBV-Encoded LMP1 in the NPC Tumor Microenvironment: From Function to Therapy. *Front. Oncol.* 11.
- Long, H.M., Chagoury, O.L., Leese, A.M., Ryan, G.B., James, E., Morton, L.T., Abbott, R.J.M., Sabbah, S., Kwok, W., Rickinson, A.B., 2013. MHC II tetramers visualize human CD4+ T cell responses to Epstein-Barr virus infection and demonstrate atypical kinetics of the nuclear antigen EBNA1 response. *J. Exp. Med.* 210, 933–949. <https://doi.org/10.1084/jem.20121437>
- Long, H.M., Meckiff, B.J., Taylor, G.S., 2019a. The T-cell Response to Epstein-Barr Virus—New Tricks From an Old Dog. *Front. Immunol.* 0. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02193>
- Long, H.M., Meckiff, B.J., Taylor, G.S., 2019b. The T-cell Response to Epstein-Barr Virus—New Tricks From an Old Dog. *Front. Immunol.* 10.
- Lu, J., Murakami, M., Verma, S.C., Cai, Q., Haldar, S., Kaul, R., Wasik, M.A., Middeldorp, J., Robertson, E.S., 2011. Epstein-Barr Virus nuclear antigen 1 (EBNA1) confers resistance to apoptosis in EBV-positive B-lymphoma cells through up-regulation of survivin. *Virology* 410, 64–75. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.10.029>

- Lucchesi, W., Brady, G., Dittrich-Breiholz, O., Kracht, M., Russ, R., Farrell, P.J., 2008. Differential gene regulation by Epstein-Barr virus type 1 and type 2 EBNA2. *J. Virol.* 82, 7456–7466. <https://doi.org/10.1128/JVI.00223-08>
- Lünemann, A., Vanoaica, L.D., Azzi, T., Nadal, D., Münz, C., 2013. A distinct subpopulation of human natural killer cells restricts B cell transformation by the Epstein-Barr virus. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 191. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301046>
- Luthuli, S., Wu, S., Cheng, Y., Zheng, X., Wu, M., Tong, H., 2019. Therapeutic Effects of Fucoidan: A Review on Recent Studies. *Mar. Drugs* 17. <https://doi.org/10.3390/md17090487>
- MacArthur, G.J., Wilson, A.D., Birchall, M.A., Morgan, A.J., 2007. Primary CD4+ T-Cell Responses Provide both Helper and Cytotoxic Functions during Epstein-Barr Virus Infection and Transformation of Fetal Cord Blood B Cells. *J. Virol.* 81, 4766–4775. <https://doi.org/10.1128/JVI.02608-06>
- Magrath, I., 2012. Epidemiology: clues to the pathogenesis of Burkitt lymphoma. *Br. J. Haematol.* 156, 744–756. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.09013.x>
- Malissen, N., Macagno, N., Granjeaud, S., Granier, C., Moutardier, V., Gaudy-Marqueste, C., Habel, N., Mandavit, M., Guillot, B., Pasero, C., Tartour, E., Ballotti, R., Grob, J.-J., Olive, D., 2019. HVEM has a broader expression than PD-L1 and constitutes a negative prognostic marker and potential treatment target for melanoma. *Oncoimmunology* 8, e1665976. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1665976>
- Mancao, C., Hammerschmidt, W., 2007. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A is a B-cell receptor mimic and essential for B-cell survival. *Blood* 110, 3715–3721. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-05-090142>
- Mannick, J.B., Cohen, J.I., Birkenbach, M., Marchini, A., Kieff, E., 1991. The Epstein-Barr virus nuclear protein encoded by the leader of the EBNA RNAs is important in B-lymphocyte transformation. *J. Virol.* 65, 6826–6837. <https://doi.org/10.1128/JVI.65.12.6826-6837.1991>
- Markel, G., Achdout, H., Katz, G., Ling, K.-L., Salio, M., Gruda, R., Gazit, R., Mizrahi, S., Hanna, J., Gonen-Gross, T., Arnon, T.I., Lieberman, N., Stren, N., Nachmias, B., Blumberg, R.S., Steuer, G., Blau, H., Cerundolo, V., Mussaffi, H., Mandelboim, O., 2004. Biological function of the soluble CEACAM1 protein and implications in TAP2-deficient patients. *Eur. J. Immunol.* 34, 2138–2148. <https://doi.org/10.1002/eji.200425021>
- Marquitz, A.R., Raab-Traub, N., 2012. The role of miRNAs and EBV BARTs in NPC. *Semin. Cancer Biol.* 22, 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2011.12.001>
- Marshall, N.A., Vickers, M.A., Barker, R.N., 2003. Regulatory T cells secreting IL-10 dominate the immune response to EBV latent membrane protein 1. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 170, 6183–6189. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.12.6183>
- Martorelli, D., Muraro, E., Merlo, A., Turrini, R., Faè, D.A., Rosato, A., Dolcetti, R., 2012. Exploiting the Interplay between Innate and Adaptive Immunity to Improve Immunotherapeutic Strategies for Epstein-Barr-Virus-Driven Disorders. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, e931952. <https://doi.org/10.1155/2012/931952>
- Massini, G., Siemer, D., Hohaus, S., 2009. EBV in Hodgkin Lymphoma. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 1, e2009013. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2009.013>
- Matusali, G., Arena, G., De Leo, A., Di Renzo, L., Mattia, E., 2009. Inhibition of p38 MAP kinase pathway induces apoptosis and prevents Epstein Barr virus reactivation in Raji cells exposed to lytic cycle inducing compounds. *Mol. Cancer* 8, 18. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-8-18>
- Mclaren, J., Zuo, J., Grimstead, J., Poghosyan, Z., Bell, A., Rowe, M., Brennan, P., 2009. STAT1 contributes to the maintenance of the latency III viral programme observed in Epstein-Barr virus-transformed B cells and their recognition by CD8+ T cells. *J Gen Virol* 90, 2239–50. <https://doi.org/10.1099/vir.0.011627-0>



- Miao, G., Sun, X., 2021. Development of a novel anti-B7-H4 antibody enhances anti-tumor immune response of human T cells. *Biomed. Pharmacother.* 141, 111913. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111913>
- Middeldorp, J.M., 2015. Epstein-Barr Virus-Specific Humoral Immune Responses in Health and Disease, in: Münz, C. (Ed.), *Epstein Barr Virus Volume 2, Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 289–323. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-22834-1\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-22834-1_10)
- Miles, R.R., Arnold, S., Cairo, M.S., 2012. Risk factors and treatment of childhood and adolescent Burkitt lymphoma/leukaemia. *Br. J. Haematol.* 156, 730–743. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.09024.x>
- Miller, G., Robinson, J., Heston, L., Lipman, M., 1974. Differences between laboratory strains of Epstein-Barr virus based on immortalization, abortive infection, and interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71, 4006–4010. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.10.4006>
- Mimura, K., Kua, L.-F., Xiao, J.-F., Asuncion, B.R., Nakayama, Y., Syn, N., Fazreen, Z., Soong, R., Kono, K., Yong, W.-P., 2021. Combined inhibition of PD-1/PD-L1, Lag-3, and Tim-3 axes augments antitumor immunity in gastric cancer–T cell coculture models. *Gastric Cancer* 24, 611–623. <https://doi.org/10.1007/s10120-020-01151-8>
- Mir, M.A., Agrewala, J.N., 2008. Signaling through CD80: an approach for treating lymphomas. *Expert Opin. Ther. Targets* 12, 969–979. <https://doi.org/10.1517/14728222.12.8.969>
- Möller, P., Herrmann, B., Moldenhauer, G., Momburg, F., 1987. Defective expression of MHC class I antigens is frequent in B-cell lymphomas of high-grade malignancy. *Int. J. Cancer* 40, 32–39. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910400107>
- Montpellier, C., Groux, H., Auriault, C., Coll, J., 1998. Lymphoproliférations T associées au virus d'Epstein-Barr. *médecine/sciences* 14, 690. <https://doi.org/10.4267/10608/1123>
- Morris, M.A., Dawson, C.W., Laverick, L., Davis, A.M., Dudman, J.P.R., Raveenthiraraj, S., Ahmad, Z., Yap, L.-F., Young, L.S., 2016. The Epstein-Barr virus encoded LMP1 oncoprotein modulates cell adhesion via regulation of activin A/TGF $\beta$  and  $\beta$ 1 integrin signalling. *Sci. Rep.* 6, 19533. <https://doi.org/10.1038/srep19533>
- Motoharu Shibusawa, M.D., Keisuke Kidoguchi, M.D., Tetsuya Tanimoto, M.D., 2021. Epstein-Barr Virus-Positive Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Exon Publ.* 27–46. <https://doi.org/10.36255/exon-publications.lymphoma.2021.ebv-dlbcl>
- Muenst, S., Hoeller, S., Dirnhofer, S., Tzankov, A., 2009. Increased programmed death-1+ tumor-infiltrating lymphocytes in classical Hodgkin lymphoma substantiate reduced overall survival. *Hum. Pathol.* 40, 1715–1722. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2009.03.025>
- Münz, C., 2021. Regulation of the Macroautophagic Machinery, Cellular Differentiation, and Immune Responses by Human Oncogenic  $\gamma$ -Herpesviruses. *Viruses* 13, 859. <https://doi.org/10.3390/v13050859>
- Münz, C., 2017. Epstein–Barr Virus-Specific Immune Control by Innate Lymphocytes. *Front. Immunol.* 0. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01658>
- Murata, T., 2014. Regulation of Epstein–Barr virus reactivation from latency. *Microbiol. Immunol.* 58, 307–317. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12155>
- Murata, T., Sugimoto, A., Inagaki, T., Yanagi, Y., Watanabe, T., Sato, Y., Kimura, H., 2021. Molecular Basis of Epstein–Barr Virus Latency Establishment and Lytic Reactivation. *Viruses* 13, 2344. <https://doi.org/10.3390/v13122344>
- Murthy, S.L., Hitchcock, M.A., Endicott-Yazdani, T.R., Watson, J.T., Krause, J.R., 2017. Epstein-Barr virus–positive diffuse large B-cell lymphoma. *Proc. Bayl. Univ. Med. Cent.* 30, 443–444.
- Nagy, N., Ádori, M., Rasul, A., Heuts, F., Salamon, D., Ujvári, D., Madapura, H.S., Leveau, B., Klein, G., Klein, E., 2012. Soluble factors produced by activated CD4<sup>+</sup> T cells modulate EBV latency. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 1512–1517. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120587109>

- Najjar, I., Baran-Marszak, F., Le Clorennec, C., Laguillier, C., Schischmanoff, O., Youlyouz-Marfak, I., Schlee, M., Bornkamm, G.W., Raphaël, M., Feuillard, J., Fagard, R., 2005. Latent membrane protein 1 regulates STAT1 through NF-kappaB-dependent interferon secretion in Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *J. Virol.* 79, 4936–4943. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.8.4936-4943.2005>
- Nanbo, A., Inoue, K., Adachi-Takasawa, K., Takada, K., 2002. Epstein-Barr virus RNA confers resistance to interferon-alpha-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma. *EMBO J.* 21, 954–965. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.5.954>
- Nath, K., Tsang, H., Gandhi, M.K., 2021. Tumor microenvironment of follicular lymphoma. *Ann. Lymphoma* 5. <https://doi.org/10.21037/aol-20-55>
- Nijland, M.L., Kersten, M.J., Pals, S.T., Bemelman, F.J., ten Berge, I.J.M., 2015. Epstein-Barr Virus–Positive Posttransplant Lymphoproliferative Disease After Solid Organ Transplantation: Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Management. *Transplant. Direct* 2, e48. <https://doi.org/10.1097/TXD.0000000000000557>
- Nikiforow, S., Bottomly, K., Miller, G., 2001. CD4+ T-Cell Effectors Inhibit Epstein-Barr Virus-Induced B-Cell Proliferation. *J. Virol.* 75, 3740–3752. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.8.3740-3752.2001>
- Nkosi, D., Sun, L., Duke, L.C., Jr, D.G.M., 2020. Epstein-Barr virus LMP1 manipulates the content and functions of extracellular vesicles to enhance metastatic potential of recipient cells. *PLOS Pathog.* 16, e1009023. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009023>
- Oliveira, C., Neves, N.M., Reis, R.L., Martins, A., Silva, T.H., 2020. A review on fucoidan antitumor strategies: From a biological active agent to a structural component of fucoidan-based systems. *Carbohydr. Polym.* 239, 116131. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116131>
- Oyama, R., Kanayama, M., Mori, M., Matsumiya, H., Taira, A., Shinohara, S., Takenaka, M., Yoneda, K., Kuroda, K., Tanaka, F., 2022. CD155 expression and its clinical significance in non-small cell lung cancer. *Oncol. Lett.* 23, 1–8. <https://doi.org/10.3892/ol.2022.13286>
- Panjwani, P.K., Charu, V., DeLisser, M., Molina-Kirsch, H., Natkunam, Y., Zhao, S., 2018. Programmed death-1 ligands PD-L1 and PD-L2 show distinctive and restricted patterns of expression in lymphoma subtypes. *Hum. Pathol.* 71, 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2017.10.029>
- Pannone, G., Zamparese, R., Pace, M., Pedicillo, M.C., Cagianò, S., Somma, P., Errico, M.E., Donofrio, V., Franco, R., De Chiara, A., Aquino, G., Bucci, P., Bucci, E., Santoro, A., Bufo, P., 2014. The role of EBV in the pathogenesis of Burkitt's Lymphoma: an Italian hospital based survey. *Infect. Agent. Cancer* 9, 34. <https://doi.org/10.1186/1750-9378-9-34>
- Pappworth, I.Y., Wang, E.C., Rowe, M., 2007. The Switch from Latent to Productive Infection in Epstein-Barr Virus-Infected B Cells Is Associated with Sensitization to NK Cell Killing. *J. Virol.* 81, 474–482. <https://doi.org/10.1128/JVI.01777-06>
- Park, G., Kim, Y.S., Lee, H.-K., Cho, D.-H., Kim, D., Hur, D., 2013. CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) induce EBV-transformed B cell apoptosis through the Fas/FasL pathway. *Int. J. Oncol.* 43. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.2091>
- Park, G.B., Kim, Y.S., Lee, H.-K., Song, H., Cho, D.-H., Lee, W.J., Hur, D.Y., 2010. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of EBV-transformed B cells by cross-linking of CD70 is dependent upon generation of reactive oxygen species and activation of p38 MAPK and JNK pathway. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 185, 7274–7284. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001547>
- Park, G.B., Kim, Y.S., Song, H., Kim, S., Park, D.M., Lee, W.J., Hur, D.Y., 2011. Cross-linking of CD80 and CD86 Diminishes Expression of CD54 on EBV-transformed B Cells through Inactivation of RhoA and Ras. *Immune Netw.* 11, 390–398. <https://doi.org/10.4110/in.2011.11.6.390>
- Park, H.Y., Han, M.H., Park, C., Jin, C.-Y., Kim, G.-Y., Choi, I.-W., Kim, N.D., Nam, T.-J., Kwon, T.K., Choi, Y.H., 2011. Anti-inflammatory effects of fucoidan through inhibition of NF-κB, MAPK and Akt

- activation in lipopolysaccharide-induced BV2 microglia cells. *Food Chem. Toxicol.* 49, 1745–1752. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.04.020>
- Park, S., Lee, J., Ko, Y.H., Han, A., Jun, H.J., Lee, S.C., Hwang, I.G., Park, Y.H., Ahn, J.S., Jung, C.W., Kim, K., Ahn, Y.C., Kang, W.K., Park, K., Kim, W.S., 2007. The impact of Epstein-Barr virus status on clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 110, 972–978. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-01-067769>
- Pioche-Durieu, C., Keryer, C., Souquère, S., Bosq, J., Faigle, W., Loew, D., Hirashima, M., Nishi, N., Middeldorp, J., Busson, P., 2005. In Nasopharyngeal Carcinoma Cells, Epstein-Barr Virus LMP1 Interacts with Galectin 9 in Membrane Raft Elements Resistant to Simvastatin. *J. Virol.* 79, 13326–13337. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.21.13326-13337.2005>
- Podojil, J.R., Chiang, M.-Y., Ifergan, I., Copeland, R., Liu, L.N., Maloveste, S., Langermann, S., Liebenson, D., Balabanov, R., Chi, H., Chen, L., Vignali, D.A.A., Miller, S.D., 2018. B7-H4 Modulates Regulatory CD4+ T Cell Induction and Function via Ligation of a Semaphorin 3a/Plexin A4/Neuropilin-1 Complex. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 201, 897–907. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700811>
- Pol, J., Kroemer, G., 2018. Anti-CTLA-4 immunotherapy: uncoupling toxicity and efficacy. *Cell Res.* 28, 501–502. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0031-9>
- Popa, S.J., Stewart, S.E., Moreau, K., 2018. Unconventional secretion of annexins and galectins. *Semin. Cell Dev. Biol., SI: Unconventional protein secretion* 83, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.02.022>
- Portis, T., Dyck, P., Longnecker, R., 2003. Epstein-Barr Virus (EBV) LMP2A induces alterations in gene transcription similar to those observed in Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 102, 4166–4178. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-04-1018>
- Precopio, M.L., Sullivan, J.L., Willard, C., Somasundaran, M., Luzuriaga, K., 2003. Differential kinetics and specificity of EBV-specific CD4+ and CD8+ T cells during primary infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 170, 2590–2598. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.5.2590>
- Priatel, J.J., Chung, B.K., Tsai, K., Tan, R., 2014. Natural killer T cell strategies to combat Epstein-Barr virus infection. *Oncoimmunology* 3, e28329. <https://doi.org/10.4161/onci.28329>
- Price, A.M., Messinger, J.E., Luftig, M.A., 2018. c-Myc Represses Transcription of Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 Early after Primary B Cell Infection. *J. Virol.* 92, e01178-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01178-17>
- Qiu, J., Smith, P., Leahy, L., Thorley-Lawson, D.A., 2015. The Epstein-Barr Virus Encoded BART miRNAs Potentiate Tumor Growth In Vivo. *PLOS Pathog.* 11, e1004561. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004561>
- Quinn, L.L., Williams, L.R., White, C., Forrest, C., Zuo, J., Rowe, M., 2015. The Missing Link in Epstein-Barr Virus Immune Evasion: the BDLF3 Gene Induces Ubiquitination and Downregulation of Major Histocompatibility Complex Class I (MHC-I) and MHC-II. *J. Virol.* 90, 356–367. <https://doi.org/10.1128/JVI.02183-15>
- Rabinovich, G.A., Toscano, M.A., 2009. Turning “sweet” on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 338–352. <https://doi.org/10.1038/nri2536>
- Rabouille, C., 2017. Pathways of Unconventional Protein Secretion. *Trends Cell Biol.* 27, 230–240. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.11.007>
- Rechsteiner, M.P., Berger, C., Zauner, L., Sigrist, J.A., Weber, M., Longnecker, R., Bernasconi, M., Nadal, D., 2008. Latent Membrane Protein 2B Regulates Susceptibility to Induction of Lytic Epstein-Barr Virus Infection. *J. Virol.* 82, 1739–1747. <https://doi.org/10.1128/JVI.01723-07>
- Revoltella, R.P., Vigneti, E., Fruscalzo, A., Park, M., Ragona, G., Rocchi, G., Calef, E., 1989. Epstein-Barr virus DNA sequences in precursor monocyte-macrophage cell lines established from the bone marrow of children with maturation defects of haematopoiesis. *J. Gen. Virol.* 70 ( Pt 5), 1203–1215. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-70-5-1203>

- Rickinson, A.B., Long, H.M., Palendira, U., Münz, C., Hislop, A.D., 2014. Cellular immune controls over Epstein-Barr virus infection: new lessons from the clinic and the laboratory. *Trends Immunol.* 35, 159–169. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.01.003>
- Rickinson, A.B., Young, L.S., Rowe, M., 1987. Influence of the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA 2 on the growth phenotype of virus-transformed B cells. *J. Virol.* 61, 1310–1317. <https://doi.org/10.1128/JVI.61.5.1310-1317.1987>
- Rosemarie, Q., Sugden, B., 2020. Epstein–Barr Virus: How Its Lytic Phase Contributes to Oncogenesis. *Microorganisms* 8, 1824. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111824>
- Rotte, A., 2019. Combination of CTLA-4 and PD-1 blockers for treatment of cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 38, 255. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1259-z>
- Rovedo, M., Longnecker, R., 2007. Epstein-barr virus latent membrane protein 2B (LMP2B) modulates LMP2A activity. *J. Virol.* 81, 84–94. <https://doi.org/10.1128/JVI.01302-06>
- Rowe, M., Raithatha, S., Shannon-Lowe, C., 2014. Counteracting Effects of Cellular Notch and Epstein-Barr Virus EBNA2: Implications for Stromal Effects on Virus-Host Interactions. *J. Virol.* 88, 12065–12076. <https://doi.org/10.1128/JVI.01431-14>
- Rowe, M., Zuo, J., 2010. Immune responses to Epstein–Barr virus: molecular interactions in the virus evasion of CD8+ T cell immunity. *Microbes Infect.* 12, 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.12.001>
- Ruvolo, P.P., 2016. Galectin 3 as a guardian of the tumor microenvironment. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res., Tumor Microenvironment Regulation of Cancer Cell Survival, Metastasis, Inflammation and Immune Surveillance* 1863, 427–437. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.08.008>
- Sabbaghi, A., Miri, S.M., Keshavarz, M., Mahooti, M., Zebardast, A., Ghaemi, A., 2020. Role of  $\gamma\delta$  T cells in controlling viral infections with a focus on influenza virus: implications for designing novel therapeutic approaches. *Virol. J.* 17, 174. <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01449-0>
- Sakamoto, K., Sekizuka, T., Uehara, T., Hishima, T., Mine, S., Fukumoto, H., Sato, Y., Hasegawa, H., Kuroda, M., Katano, H., 2017. Next-generation sequencing of miRNAs in clinical samples of Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphomas. *Cancer Med.* 6, 605–618. <https://doi.org/10.1002/cam4.1006>
- Satou, A., Nakamura, S., 2021. EBV-positive B-cell lymphomas and lymphoproliferative disorders: Review from the perspective of immune escape and immunodeficiency. *Cancer Med.* 10, 6777–6785. <https://doi.org/10.1002/cam4.4198>
- Sausen, D.G., Bhutta, M.S., Gallo, E.S., Dahari, H., Borenstein, R., 2021. Stress-Induced Epstein-Barr Virus Reactivation. *Biomolecules* 11, 1380. <https://doi.org/10.3390/biom11091380>
- Savard, M., Bélanger, C., Tardif, M., Gourde, P., Flamand, L., Gosselin, J., 2000. Infection of Primary Human Monocytes by Epstein-Barr Virus. *J. Virol.* 74, 2612–2619.
- Seidel, J.A., Otsuka, A., Kabashima, K., 2018. Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations. *Front. Oncol.* 8, 86. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00086>
- Senthilkumar, K., Manivasagan, P., Venkatesan, J., Kim, S.-K., 2013. Brown seaweed fucoidan: Biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer. *Int. J. Biol. Macromol.* 60, 366–374. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.06.030>
- Sheng, J., Chen, W., Zhu, H.-J., 2015. The immune suppressive function of transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) in human diseases. *Growth Factors Chur Switz.* 33, 92–101. <https://doi.org/10.3109/08977194.2015.1010645>
- Shi, Y., Tang, D., Li, X., Xie, X., Ye, Y., Wang, L., 2022. Galectin Family Members: Emerging Novel Targets for Lymphoma Therapy? *Front. Oncol.* 12.
- Simonnet, A., Engelmann, I., Moreau, A.-S., Garcia, B., Six, S., El Kalioubie, A., Robriquet, L., Hober, D., Jourdain, M., 2021. High incidence of Epstein–Barr virus, cytomegalovirus, and human-

- herpes virus-6 reactivations in critically ill patients with COVID-19. *Infect. Dis. Now* 51, 296–299. <https://doi.org/10.1016/j.idnow.2021.01.005>
- Skinnider, B.F., Mak, T.W., 2002. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 99, 4283–4297. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-01-0099>
- Smatti, M.K., Al-Sadeq, D.W., Ali, N.H., Pintus, G., Abou-Saleh, H., Nasrallah, G.K., 2018. Epstein-Barr Virus Epidemiology, Serology, and Genetic Variability of LMP-1 Oncogene Among Healthy Population: An Update. *Front. Oncol.* 8.
- Smith, P.R., de Jesus, O., Turner, D., Hollyoake, M., Karstegl, C.E., Griffin, B.E., Karran, L., Wang, Y., Hayward, S.D., Farrell, P.J., 2000. Structure and coding content of CST (BART) family RNAs of Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 74, 3082–3092. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.7.3082-3092.2000>
- Sobhani, N., Tardiel-Cyril, D.R., Davtyan, A., Generali, D., Roudi, R., Li, Y., 2021. CTLA-4 in Regulatory T Cells for Cancer Immunotherapy. *Cancers* 13, 1440. <https://doi.org/10.3390/cancers13061440>
- Solinas, C., Aiello, M., Rozali, E., Lambertini, M., Willard-Gallo, K., Migliori, E., 2020. Programmed Cell Death-Ligand 2: A Neglected But Important Target in the Immune Response to Cancer? *Transl. Oncol.* 13, 100811. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100811>
- Strowig, T., Brilot, F., Arrey, F., Bougras, G., Thomas, D., Muller, W.A., Münz, C., 2008. Tonsillar NK Cells Restrict B Cell Transformation by the Epstein-Barr Virus via IFN- $\gamma$ . *PLOS Pathog.* 4, e27. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040027>
- Styles, C.T., Paschos, K., White, R.E., Farrell, P.J., 2018. The Cooperative Functions of the EBNA3 Proteins Are Central to EBV Persistence and Latency. *Pathogens* 7, 31. <https://doi.org/10.3390/pathogens7010031>
- Su, C., Wang, H., Liu, Y., Guo, Q., Zhang, L., Li, J., Zhou, W., Yan, Y., Zhou, X., Zhang, J., 2020. Adverse Effects of Anti-PD-1/PD-L1 Therapy in Non-small Cell Lung Cancer. *Front. Oncol.* 10.
- Sugawara, I., Ishizaka, S., 1982. Polysaccharides with sulfate groups are human T-cell mitogens and murine polyclonal B-cell activators (PBAs): I. Fucoidan and heparin. *Cell. Immunol.* 74, 162–171. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(82\)90016-8](https://doi.org/10.1016/0008-8749(82)90016-8)
- Sun, Jia, Sun, Jintang, Song, B., Zhang, L., Shao, Q., Liu, Y., Yuan, D., Zhang, Y., Qu, X., 2016. Fucoidan inhibits CCL22 production through NF- $\kappa$ B pathway in M2 macrophages: a potential therapeutic strategy for cancer. *Sci. Rep.* 6. <https://doi.org/10.1038/srep35855>
- Susanibar-Adaniya, S., Barta, S.K., 2021. 2021 Update on Diffuse large B cell lymphoma: A review of current data and potential applications on risk stratification and management. *Am. J. Hematol.* 96, 617–629. <https://doi.org/10.1002/ajh.26151>
- Szymula, A., Palermo, R.D., Bayoumy, A., Groves, I.J., Ba abdullah, M., Holder, B., White, R.E., 2018. Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-LP is essential for transforming naïve B cells, and facilitates recruitment of transcription factors to the viral genome. *PLoS Pathog.* 14, e1006890. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006890>
- Tabiasco, J., Vercellone, A., Meggetto, F., Hudrisier, D., Brousset, P., Fournié, J.-J., 2003. Acquisition of viral receptor by NK cells through immunological synapse. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 170, 5993–5998. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.12.5993>
- Tagawa, T., Albanese, M., Bouvet, M., Moosmann, A., Mautner, J., Heissmeyer, V., Zielinski, C., Lutter, D., Hoser, J., Hastreiter, M., Hayes, M., Sugden, B., Hammerschmidt, W., 2016. Epstein-Barr viral miRNAs inhibit antiviral CD4+ T cell responses targeting IL-12 and peptide processing. *J. Exp. Med.* 213, 2065–2080. <https://doi.org/10.1084/jem.20160248>
- Takada, H., Imadome, K.-I., Shibayama, H., Yoshimori, M., Wang, L., Saitoh, Y., Uota, S., Yamaoka, S., Koyama, T., Shimizu, N., Yamamoto, K., Fujiwara, S., Miura, O., Arai, A., 2017. EBV induces persistent NF- $\kappa$ B activation and contributes to survival of EBV-positive neoplastic T- or NK-cells. *PLoS ONE* 12, e0174136. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174136>
- Takamatsu, K., Tanaka, N., Hakozaki, K., Takahashi, R., Teranishi, Y., Murakami, T., Kufukihara, R., Niwa, N., Mikami, S., Shinojima, T., Sasaki, T., Sato, Y., Kume, H., Ogawa, S., Kakimi, K.,

- Kamatani, T., Miya, F., Tsunoda, T., Aimonio, E., Nishihara, H., Sawada, K., Imamura, T., Mizuno, R., Oya, M., 2021. Profiling the inhibitory receptors LAG-3, TIM-3, and TIGIT in renal cell carcinoma reveals malignancy. *Nat. Commun.* 12, 5547. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25865-0>
- Tangye, S.G., Palendira, U., Edwards, E.S.J., 2017. Human immunity against EBV—lessons from the clinic. *J. Exp. Med.* 214, 269–283. <https://doi.org/10.1084/jem.20161846>
- Teruya, K., Kusumoto, Y., Eto, H., Nakamichi, N., Shirahata, S., 2019. Selective Suppression of Cell Growth and Programmed Cell Death-Ligand 1 Expression in HT1080 Fibrosarcoma Cells by Low Molecular Weight Fucoidan Extract. *Mar. Drugs* 17, 421. <https://doi.org/10.3390/md17070421>
- Thijssen, V.L., Heusschen, R., Caers, J., Griffioen, A.W., 2015. Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review. *Biochim. Biophys. Acta* 1855, 235–247. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.03.003>
- Thorley-Lawson, D.A., 2015. EBV Persistence—Introducing the Virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 390, 151–209. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8_8)
- Toben, H.R., Smith, R.G., 1977. T lymphocytes bearing complement receptors in a patient with chronic lymphocytic leukaemia. *Clin. Exp. Immunol.* 27, 292–302.
- Tomkinson, B., Robertson, E., Kieff, E., 1993. Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J. Virol.* 67, 2014–2025. <https://doi.org/10.1128/JVI.67.4.2014-2025.1993>
- Torii, Y., Kawada, J., Murata, T., Yoshiyama, H., Kimura, H., Ito, Y., 2017. Epstein-Barr virus infection-induced inflammasome activation in human monocytes. *PLOS ONE* 12, e0175053. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175053>
- Trempat, P., Tabiasco, J., Andre, P., Faumont, N., Meggetto, F., Delsol, G., Gascoyne, R.D., Fournie, J.-J., Vivier, E., Brousset, P., 2002. Evidence for Early Infection of Nonneoplastic Natural Killer Cells by Epstein-Barr Virus. *J. Virol.* 76, 11139–11142. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.21.11139-11142.2002>
- Trentin, L., Zambello, R., Sancetta, R., Facco, M., Cerutti, A., Perin, A., Siviero, M., Basso, U., Bortolin, M., Adami, F., Agostini, C., Semenzato, G., 1997. B lymphocytes from patients with chronic lymphoproliferative disorders are equipped with different costimulatory molecules. *Cancer Res.* 57, 4940–4947.
- Tse, E., Kwong, Y.-L., 2015. Epstein Barr virus-associated lymphoproliferative diseases: the virus as a therapeutic target. *Exp. Mol. Med.* 47, e136. <https://doi.org/10.1038/emm.2014.102>
- Tugizov, S., Herrera, R., Veluppillai, P., Greenspan, J., Greenspan, D., Palefsky, J.M., 2007. Epstein-Barr Virus (EBV)-Infected Monocytes Facilitate Dissemination of EBV within the Oral Mucosal Epithelium. *J. Virol.* 81, 5484–5496. <https://doi.org/10.1128/JVI.00171-07>
- Tynell, E., Aurelius, E., Brandell, A., Julander, I., Wood, M., Yao, Q.-Y., Rickinson, A., Akerlund, B., Andersson, J., 1996. Acyclovir and prednisolone treatment of acute infectious mononucleosis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled study. *J. Infect. Dis.* 174, 324–331. <https://doi.org/10.1093/infdis/174.2.324>
- Ungerer, C., Quade-Lyssy, P., Radeke, H.H., Henschler, R., Königs, C., Köhl, U., Seifried, E., Schüttrumpf, J., 2014. Galectin-9 Is a Suppressor of T and B Cells and Predicts the Immune Modulatory Potential of Mesenchymal Stromal Cell Preparations. *Stem Cells Dev.* 23, 755–766. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0335>
- Van Weelden, G., Bobiński, M., Okła, K., Van Weelden, W.J., Romano, A., Pijnenborg, J.M.A., 2019. Fucoidan Structure and Activity in Relation to Anti-Cancer Mechanisms. *Mar. Drugs* 17, 32. <https://doi.org/10.3390/md17010032>
- Vaysberg, M., Lambert, S.L., Krams, S.M., Martinez, O.M., 2009. Activation of the JAK/STAT pathway in Epstein Barr virus+ associated posttransplant lymphoproliferative disease: role of

- interferon-gamma. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 9, 2292–2302. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2009.02781.x>
- Velapasamy, S., Dawson, C.W., Young, L.S., Paterson, I.C., Yap, L.F., 2018. The Dynamic Roles of TGF- $\beta$  Signalling in EBV-Associated Cancers. *Cancers* 10, 247. <https://doi.org/10.3390/cancers10080247>
- Vishchuk, O.S., Ermakova, S.P., Zvyagintseva, T.N., 2013. The Effect of Sulfated (1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Fucan from the Brown Alga *Saccharina cichorioides* Miyabe on Resveratrol-Induced Apoptosis in Colon Carcinoma Cells. *Mar. Drugs* 11, 194–212. <https://doi.org/10.3390/md11010194>
- Vockerodt, M., Cader, F.Z., Shannon-Lowe, C., Murray, P., 2014. Epstein-Barr virus and the origin of Hodgkin lymphoma. *Chin. J. Cancer* 33, 591–597. <https://doi.org/10.5732/cjc.014.10193>
- Waltzer, L., Logeat, F., Brou, C., Israel, A., Sergeant, A., Manet, E., 1994. The human J kappa recombination signal sequence binding protein (RBP-J kappa) targets the Epstein-Barr virus EBNA2 protein to its DNA responsive elements. *EMBO J.* 13, 5633–5638. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06901.x>
- Wang, J., Zhang, Q., Zhang, Z., Li, Z., 2008. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. *Int. J. Biol. Macromol.* 42, 127–132. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.10.003>
- Wang, J., Zhang, Q., Zhang, Z., Song, H., Li, P., 2010. Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica*. *Int. J. Biol. Macromol.* 46, 6–12. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.10.015>
- Wang, L., Ren, J., Li, G., Moorman, J.P., Yao, Z.Q., Ning, S., 2017. LMP1 signaling pathway activates IRF4 in latent EBV infection and a positive circuit between PI3K and Src is required. *Oncogene* 36, 2265–2274. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.380>
- Wang, M., Yu, F., Wu, W., Wang, Y., Ding, H., Qian, L., 2018. Epstein-Barr virus-encoded microRNAs as regulators in host immune responses. *Int. J. Biol. Sci.* 14, 565–576. <https://doi.org/10.7150/ijbs.24562>
- Wang, Y., Xing, M., Cao, Q., Ji, A., Liang, H., Song, S., 2019. Biological Activities of Fucoidan and the Factors Mediating Its Therapeutic Effects: A Review of Recent Studies. *Mar. Drugs* 17, 183. <https://doi.org/10.3390/md17030183>
- Watanabe, N., Gavrieli, M., Sedy, J.R., Yang, J., Fallarino, F., Loftin, S.K., Hurchla, M.A., Zimmerman, N., Sim, J., Zang, X., Murphy, T.L., Russell, J.H., Allison, J.P., Murphy, K.M., 2003. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat. Immunol.* 4, 670–679. <https://doi.org/10.1038/ni944>
- Weber-Nordt, R.M., Egen, C., Wehinger, J., Ludwig, W., Gouilleux-Gruart, V., Mertelsmann, R., Finke, J., 1996. Constitutive activation of STAT proteins in primary lymphoid and myeloid leukemia cells and in Epstein-Barr virus (EBV)-related lymphoma cell lines. *Blood* 88, 809–816.
- Wei, S.C., Anang, N.-A.A.S., Sharma, R., Andrews, M.C., Reuben, A., Levine, J.H., Cogdill, A.P., Mancuso, J.J., Wargo, J.A., Pe'er, D., Allison, J.P., 2019. Combination anti-CTLA-4 plus anti-PD-1 checkpoint blockade utilizes cellular mechanisms partially distinct from monotherapies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116, 22699–22709. <https://doi.org/10.1073/pnas.1821218116>
- Wei, Y., Li, Z., 2022. LAG3-PD-1 Combo Overcome the Disadvantage of Drug Resistance. *Front. Oncol.* 12.
- White, R.E., Groves, I.J., Turro, E., Yee, J., Kremmer, E., Allday, M.J., 2010. Extensive co-operation between the Epstein-Barr virus EBNA3 proteins in the manipulation of host gene expression and epigenetic chromatin modification. *PLoS One* 5, e13979. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013979>
- Williams, H., McAulay, K., Macsween, K.F., Gallacher, N.J., Higgins, C.D., Harrison, N., Swerdlow, A.J., Crawford, D.H., 2005. The immune response to primary EBV infection: a role for natural killer cells. *Br. J. Haematol.* 129, 266–274. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05452.x>

- Willsmore, Z.N., Coumbe, B.G.T., Crescioli, S., Reci, S., Gupta, A., Harris, R.J., Chenoweth, A., Chauhan, J., Bax, H.J., McCraw, A., Cheung, A., Osborn, G., Hoffmann, R.M., Nakamura, M., Laddach, R., Geh, J.L.C., MacKenzie-Ross, A., Healy, C., Tsoka, S., Spicer, J.F., Josephs, D.H., Papa, S., Lacy, K.E., Karagiannis, S.N., 2021. Combined anti-PD-1 and anti-CTLA-4 checkpoint blockade: Treatment of melanoma and immune mechanisms of action. *Eur. J. Immunol.* 51, 544–556. <https://doi.org/10.1002/eji.202048747>
- Wilson, A.D., Morgan, A.J., 2002. Primary Immune Responses by Cord Blood CD4+ T Cells and NK Cells Inhibit Epstein-Barr Virus B-Cell Transformation In Vitro. *J. Virol.* 76, 5071–5081. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.10.5071-5081.2002>
- Wilson, A D, Redchenko, I., Williams, N.A., Morgan, A.J., 1998. CD4+ T cells inhibit growth of Epstein-Barr virus-transformed B cells through CD95-CD95 ligand-mediated apoptosis. *Int. Immunol.* 10, 1149–1157. <https://doi.org/10.1093/intimm/10.8.1149>
- Wilson, A. D., Redchenko, I., Williams, N.A., Morgan, A.J., 1998. CD4+ T cells inhibit growth of Epstein-Barr virus-transformed B cells through CD95-CD95 ligand-mediated apoptosis. *Int. Immunol.* 10, 1149–1157. <https://doi.org/10.1093/intimm/10.8.1149>
- Wolf, H., zur Hausen, H., Becker, V., 1973. EB viral genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells. *Nature. New Biol.* 244, 245–247. <https://doi.org/10.1038/newbio244245a0>
- Xing, C., Li, H., Li, R.-J., Yin, L., Zhang, H.-F., Huang, Z.-N., Cheng, Z., Li, J., Wang, Z.-H., Peng, H.-L., 2021. The roles of exosomal immune checkpoint proteins in tumors. *Mil. Med. Res.* 8, 56. <https://doi.org/10.1186/s40779-021-00350-3>
- Xu, J., Menezes, J., Prasad, U., Ahmad, A., 1999. Elevated serum levels of transforming growth factor beta1 in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma patients. *Int. J. Cancer* 84, 396–399. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19990820\)84:4<396::aid-ijc11>3.0.co;2-#](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19990820)84:4<396::aid-ijc11>3.0.co;2-#)
- Xue, M., Liang, H., Tang, Q., Xue, C., He, X., Zhang, Li, Zhang, Z., Liang, Z., Bian, K., Zhang, Lichen, Li, Z., 2017. The Protective and Immunomodulatory Effects of Fucoidan Against 7,12-Dimethyl benz[a]anthracene-Induced Experimental Mammary Carcinogenesis Through the PD1/PDL1 Signaling Pathway in Rats. *Nutr. Cancer* 69, 1234–1244. <https://doi.org/10.1080/01635581.2017.1362446>
- Yamamoto, R., Nishikori, M., Kitawaki, T., Sakai, T., Hishizawa, M., Tashima, M., Kondo, T., Ohmori, K., Kurata, M., Hayashi, T., Uchiyama, T., 2008. PD-1-PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma. *Blood* 111, 3220–3224. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-05-085159>
- Yang, C., Chung, D., Shin, I.-S., Lee, H., Kim, J., Lee, Y., You, S., 2008. Effects of molecular weight and hydrolysis conditions on anticancer activity of fucoidans from sporophyll of *Undaria pinnatifida*. *Int. J. Biol. Macromol.* 43, 433–437. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2008.08.006>
- Yang, G., Zhang, Q., Kong, Y., Xie, B., Gao, M., Tao, Y., Xu, H., Zhan, F., Dai, B., Shi, J., Wu, X., 2015. Antitumor activity of fucoidan against diffuse large B cell lymphoma in vitro and in vivo. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 47, 925–931. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmv094>
- Yang, J., Yang, X., Pan, W., Wang, M., Lu, Y., Zhang, J., Fang, Z., Zhang, X., Ji, Y., Bei, J.-X., Dong, J., Wu, Y., Pan, C., Yu, G., Zhou, P., Li, B., 2021. Fucoidan-Supplemented Diet Potentiates Immune Checkpoint Blockage by Enhancing Antitumor Immunity. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 733246. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.733246>
- Yang, R., Sun, L., Li, C.-F., Wang, Y.-H., Yao, J., Li, H., Yan, M., Chang, W.-C., Hsu, J.-M., Cha, J.-H., Hsu, J.L., Chou, C.-W., Sun, X., Deng, Y., Chou, C.-K., Yu, D., Hung, M.-C., 2021. Galectin-9 interacts with PD-1 and TIM-3 to regulate T cell death and is a target for cancer immunotherapy. *Nat. Commun.* 12, 832. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21099-2>
- Yang, S., Wei, W., Zhao, Q., 2020. B7-H3, a checkpoint molecule, as a target for cancer immunotherapy. *Int. J. Biol. Sci.* 16, 1767–1773. <https://doi.org/10.7150/ijbs.41105>



- Yasinska, I.M., Sakhnevych, S.S., Pavlova, L., Teo Hansen Selnø, A., Teuscher Abeleira, A.M., Benlaouer, O., Gonçalves Silva, I., Mosimann, M., Varani, L., Bardelli, M., Hussain, R., Siligardi, G., Cholewa, D., Berger, S.M., Gibbs, B.F., Ushkaryov, Y.A., Fasler-Kan, E., Klenova, E., Sumbayev, V.V., 2019. The Tim-3-Galectin-9 Pathway and Its Regulatory Mechanisms in Human Breast Cancer. *Front. Immunol.* 10, 1594. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01594>
- Ye, C., Yano, H., Workman, C.J., Vignali, D.A.A., 2021. Interleukin-35: Structure, Function and Its Impact on Immune-Related Diseases. *J. Interferon Cytokine Res.* 41, 391–406. <https://doi.org/10.1089/jir.2021.0147>
- Yi, F., Saha, A., Murakami, M., Kumar, P., Knight, J.S., Cai, Q., Choudhuri, T., Robertson, E.S., 2009. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C targets p53 and modulates its transcriptional and apoptotic activities. *Virology* 388, 236–247. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.03.027>
- Yoo, H.J., You, D.-J., Lee, K.-W., 2019. Characterization and Immunomodulatory Effects of High Molecular Weight Fucoidan Fraction from the Sporophyll of *Undaria pinnatifida* in Cyclophosphamide-Induced Immunosuppressed Mice. *Mar. Drugs* 17, 447. <https://doi.org/10.3390/md17080447>
- Zayed, A., El-Aasr, M., Ibrahim, A.R., Ulber, R., 2020. Fucoidan Characterization: Determination of Purity and Physicochemical and Chemical Properties. *Mar. Drugs* 18, 571. <https://doi.org/10.3390/md18110571>
- Zayed, A., Ulber, R., 2020. Fucoidans: Downstream Processes and Recent Applications. *Mar. Drugs* 18, 170. <https://doi.org/10.3390/md18030170>
- Zeidler, R., Eissner, G., Meissner, P., Uebel, S., Tampé, R., Lazis, S., Hammerschmidt, W., 1997. Downregulation of TAP1 in B lymphocytes by cellular and Epstein-Barr virus-encoded interleukin-10. *Blood* 90, 2390–2397.
- Zeng, T., Cao, Y., Jin, T., Tian, Y., Dai, C., Xu, F., 2021. The CD112R/CD112 axis: a breakthrough in cancer immunotherapy. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 40, 285. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-02053-y>
- Zhang, C., Huang, D., Baloche, V., Zhang, L., Xu, J., Li, B., Zhao, X., He, J., Mai, H., Chen, Q., Zhang, X., Busson, P., Cui, J., Li, J., 2020. Galectin-9 promotes a suppressive microenvironment in human cancer by enhancing STING degradation. *Oncogenesis* 9, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41389-020-00248-0>
- Zhang, J., Zhang, Y., Wang, Q., Li, C., Deng, H., Si, C., Xiong, H., 2019. Interleukin-35 in immune-related diseases: protection or destruction. *Immunology* 157, 13–20. <https://doi.org/10.1111/imm.13044>
- Zhang, L., Hong, K., Zhang, J., Pagano, J.S., 2004. Multiple signal transducers and activators of transcription are induced by EBV LMP-1. *Virology* 323, 141–152. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.007>
- Zhou, K., Guo, S., Li, F., Sun, Q., Liang, G., 2020. Exosomal PD-L1: New Insights Into Tumor Immune Escape Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Front. Cell Dev. Biol.* 8.
- Zhou, W.-T., Jin, W.-L., 2021. B7-H3/CD276: An Emerging Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* 12.
- Zuo, L., Yu, H., Liu, L., Tang, Y., Wu, H., Yang, J., Zhu, M., Du, S., Zhao, L., Cao, L., Li, G., Lu, J., 2015. The copy number of Epstein-Barr virus latent genome correlates with the oncogenicity by the activation level of LMP1 and NF- $\kappa$ B. *Oncotarget* 6, 41033–41044. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5708>

Dans le cadre de mes travaux de thèse, j'ai eu l'opportunité d'encadrer des étudiants avec le Dr. Chantal JAYAT-VIGNOLES et de participer à des congrès nationaux et internationaux.

### Encadrements :

- ✚ Juin – Juillet 2022 (S. Laburthe – M1 Biologie/Santé - médecine, Travaux d'Initiation à la Recherche en Laboratoire) : *Etude du profil d'expression des galectines 3 et 9 dans l'immunosurveillance des lymphocytes B en latence III de l'EBV.*
- ✚ Mars – Mai 2022 (X. Chapelot – M1 Biologie/Santé, parcours : Oncologie moléculaire et Biothérapies) : *Expression de points de contrôle inhibiteurs de la réponse immune antitumorale par les lymphocytes B en latence III de l'EBV.*
- ✚ Mars – Mai 2021 (C. Gressein – M1 Biologie/Santé, Oncologie moléculaire et Biothérapies) : *Etude de l'expression de molécules inhibitrices de la réponse antitumorale NK par les B en Latence III de L'EBV.*

### Communications orales et écrites

Nom souligné : présenté par

#### ✚ Communications orales

- **2022 : 20<sup>th</sup> International EBV symposium, Sienna, Italie**  
**Saliba J.**, Manseur C. Gressein C., Groult H, Akil H., Tannoury M., Troutaud D., Feuillard J., Arnaudin I., Jayat-Vignoles C.  
  
Role of fucoidans in the restoration of the anti-tumor T-cell response inhibited by EBV latency III B cells via the PD-L1 immune checkpoint.
- **2021 : Journée Scientifique Herpès Virus et Pathologies Associées (HerPAs), Paris, France**  
**Saliba J.**, Gressein C., Akil H., Tannoury M., Feuillard J., Jayat-Vignoles C.  
  
Modulation de la réponse NK anti-tumorale par les cellules B en latence III de l'EBV : un échappement à l'immunosurveillance?

- **2021: 7<sup>th</sup> International Polysaccharide Conference**  
Manseur C., Groult H., Cousin R., **Saliba J.**, Vignoles C., Colin B., Piot J., Maugard T., Arnaudin I.  
 Preparation of bioactive A-carrageenan and fucoidan oligosaccharides containing anti-tumor activities.
  
- ✚ Communications écrites
- **2022 : French Society of Extracellular Vesicles (FSEV) 5<sup>th</sup> Congress, Paris, France**  
 Ansart N., Ouk C., Akil H., **Saliba J.**, Jayat-Vignoles C., Troutaud D.  
 Study of the relationship between small extracellular vesicles (sEV) CD20 expression and cell surface CD20 level of parental DLBCL cells.
  
- **2022 : Immune Responses in Cancer and Infection (IRCI), Lyon, France**  
Saliba J., Manseur C., Groult H., Akil H., Tannoury M., Troutaud D., Feuillard J., Arnaudin I., Jayat-Vignoles C.  
 The EBV latency III tumoral B cell model allow to point fucoidans as a potential adjuvant of anti-PD-L1 immunotherapy.
  
- **2021: 3rd European B cell Forum 2021 (Virtual event), France**  
Saliba J., Gressein C., Akil H., Tannoury M., Troutaud D., Feuillard J., Jayat-Vignoles C.  
 Modulation of the anti-tumor NK response by EBV latency III B cells: an escape route from immune surveillance?
  
- **2021: Journées Cancéropôle Grans Sud-Ouest, Carcassonne, France**  
Saliba J., Gressein C., Akil H., Tannoury M., Troutaud D., Feuillard J., Jayat-Vignoles C.  
 Assessment of immune inhibitory checkpoints expressed by EBV latency III B cells and impact of fucoidans on the PD- L1/PD-1 axis.
  
- **2019: Journée Ligue contre le Cancer, Limoges, France**  
Akil H., **Saliba J.**, D., Feuillard J., Jayat-Vignoles C.  
 Restauration de la réponse immune T antitumorale dans les lymphomes B associés à l'EBV: Rôle potentiel des fucoïdanes.



## **Points de contrôle inhibiteurs de la réponse immune exprimés par les lymphocytes B en latence III de l'EBV et fucoïdanes : exemple de PD-L1**

Le virus d'Epstein Barr (EBV) infecte plus de 95% de la population mondiale et persiste de manière latente dans l'organisme. Il a la capacité d'immortaliser les cellules B *in vitro* (LCLs (Lymphoblastoid Cell Line) – latence III) et *in vivo*, et est associé à plusieurs lymphomes. Les travaux antérieurs du laboratoire ont montré que les LCLs surexpriment le point de contrôle PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1) responsable de l'expansion des T-régulateurs et de l'inhibition des T-effecteurs *via* l'axe PD-L1/PD-1. Il peut inhiber la réponse immune (T et NK) et est visé en immunothérapie, avec de nombreux défis et limitations, d'où la nécessité de trouver de nouvelles stratégies tel que la baisse au préalable de son expression. Le fucoïdane est un polysaccharide sulfaté extrait des algues brunes et connu pour ses activités anti-tumorales et immunomodulatrices, en fonction de son poids moléculaire et de son niveau de sulfatation. Le but de ma thèse a été de tester l'effet de deux formules originales de très bas poids moléculaire (vLMW-F) avec différents niveaux de sulfatation. Nous montrons leurs effets antiprolifératifs et pro-apoptotiques sur les LCLs et DLBCLs (Diffuse Large B Cell Lymphoma), ainsi que la baisse de PD-L1 aux niveaux transcriptionnel et à la surface cellulaire (par altération du cytosquelette d'actine et limitation du trafic sécrétoire). Il n'y a aucun effet cytotoxique sur les cellules normales. La seconde partie de ma thèse vise à préciser le profil immuno-inhibiteur des LCLs par les points de contrôle. Nous avons mis en évidence l'expression de PD-L1, PD-L2, CD80, CD86 et des galectines -3 et -9 et plus faiblement de B7-H3, ainsi que l'absence d'expression spécifique de B7-H4, CD112, CD115, CEACAM1 et HVEM. Nous avons également montré la baisse d'expression des galectines par les vLMW-F. Ces travaux mettent en évidence une nouvelle stratégie prometteuse de l'utilisation des vLMW-F comme adjuvant aux immunothérapies visant en particulier l'axe PD-L1/PD-1. Des études fonctionnelles *in vitro* sur des modèles de co-culture avec des T autologues et des cellules NK, et des études *in vivo* sur des modèles tumoraux murins constituent les prochaines étapes.

**Mots clés :** EBV, latence III, PD-L1, fucoïdane, vLMW-F, point de contrôle, immunosurveillance.

## **Immune response inhibitory checkpoints expressed by EBV latency III B cells and fucoidans: example of PD-L1**

Epstein Barr virus (EBV) infects more than 95% of the world population and persists latently in the body. It has the ability to immortalize B cells *in vitro* (LCLs (Lymphoblastoid Cell Line) – latency III) and *in vivo*, and is associated with many lymphomas. Previous laboratory work has shown that the LCLs overexpress the checkpoint PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1) which is responsible for the expansion of regulatory T-cells and the inhibition of effector T-cells *via* the PD-L1/PD-1 axis. It inhibits the immune response (T and NK) and is targeted in immunotherapy, with many challenges and limitations, hence the need to find new strategies such as lowering its expression. Fucoidan is a sulfated polysaccharide extracted from brown algae and known for its anti-tumor and immunomodulatory activities, depending on its molecular weight and sulfation level. My thesis aims to test the effect of two original formulas of very Low Molecular Weight (vLMW-F) with different sulfation levels. We showed their anti-proliferative and pro-apoptotic effects on LCLs and DLBCLs (Diffuse Large B Cell Lymphoma), as well as PD-L1 decrease at the transcriptional level and at the cell surface (by alteration of the actin cytoskeleton and limitation of secretory traffic). There is no cytotoxic effect on normal cells. The second part of my thesis aims to clarify the immuno-inhibitory profile of LCLs by checkpoints. We highlighted the expression of PD-L1, PD-L2, CD80, CD86 and galectins -3 and -9 and more weakly of B7-H3, as well as the absence of specific expression of B7-H4, CD112, CD115, CEACAM1 and HVEM. We also showed the decrease in galectins expressions by vLMW-F. This work highlights a new promising strategy for the use of vLMW-F as an adjuvant to immunotherapies targeting in particular the PD-L1/PD-1 axis. Functional studies *in vitro* on co-culture models with autologous T cells and NK cells, and *in vivo* studies on murine tumor models are the next steps.

**Keywords:** EBV, latency III, PD-L1, fucoidan, vLMW-F, checkpoint, immunosurveillance.