

Thèse de Doctorat

Coraline CHÉNEAU

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : *Biologie-Santé*

Discipline : *Biologie*

Spécialité : *Immunologie-virologie*

Unité de recherche : *INSERM U1064, ITUN*

Soutenue le *19/10/2015*

Caractérisation moléculaire des interactions HCMV/cellules dendritiques : impact des glycosylations de l'enveloppe virale sur le tropisme.

JURY

Rapporteurs : **Franck FIESCHI**, Professeur, Institut de Biologie Structurale, Grenoble
Yann GUERARDEL, DR2, UGSF, UGSF CNRS UMR 8576, Lille

Examineurs : **Julie DECHANET-MERVILLE**, DR1, CNRS UMR 5164, Bordeaux
Sébastien GOUIN, CR1, Faculté des sciences et techniques, Nantes

Directeur de Thèse : **Franck HALARY**, CR1, ITUN UMR1064, Nantes

Remerciements

J'adresse mes plus sincères remerciements au docteur Franck Halary. Franck, merci pour ces trois années de formation! Merci pour la confiance que tu m'as accordé et ce dès le début. Pour ton optimisme, tes conseils, ta disponibilité et ta porte de bureau toujours grande ouverte.

Je remercie le professeur Franck Fieschi et le docteur Yann Guerardel pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse et pour avoir lu avec attention mon manuscrit, ainsi que le docteur Julie Dechanet-Merville et le docteur Sébastien Gouin pour avoir accepté de faire parti de mon jury de thèse.

Je remercie le docteur Ignacio Anegon de m'avoir accepté au sein de son laboratoire de recherche.

Je tiens aussi à remercier Céline Bressolette et Jacques Lependu qui ont fait parti de mon comité de thèse et ont permis d'apporter un autre regard sur ce travail.

Un grand merci à toute l'équipe 1.

Merci Fabie pour ta bonne humeur sans limite, ta gentillesse et ta disponibilité.

Flora, ton aide aura été précieuse. Tes mains sont d'or quand il s'agit de BM!

Merci à Mathieu et Janina pour avoir été de supers co-doctorants, toujours prêts à donner un petit coup de pouce quand j'en ai eu besoin.

Merci aussi à Delfine. Tu as su faire rapidement tes preuves et a été une super stagiaire.

Je tiens à remercier le bureau.

Un grand merci à Emilie pour avoir rempli le tiroir de gâteaux, de chocolat, de Lions, de Mars... mais aussi pour m'avoir trainé au sport. Tu m'as fait découvrir de supers romans.

Merci à toi, tout simplement, pour avoir partagé des petits moments de vies (et de m'avoir écouté râler, parfois).

Merci à Véro, Annaïck, Lucas, Simon et Reynald qui ont fait que l'ambiance du bureau soit agréable et qui ont toujours eu du temps pour papoter ou un conseil à donner pour une manip.

Je tiens à remercier le deuxième bureau.

Un énorme merci à Lucile, Julien et Thomas sans qui la vie au labo n'aurait pas été la même. Thomas pour nous avoir appris « qu'il n'y a pas de fatigue qui soit ». Tu nous auras entraînés dans tous les restaurants et les bars de Nantes (les meilleurs comme les pires)!

Merci à Lu et Ju pour avoir partagé les repas, les pauses café, les potins, les dilemmes des manip et aussi les soirées à n'en plus finir au labo comme ailleurs! À quand le projet HO-1, TORID, Th17, DC-SIGN et CMV dans un modèle d'EAE, de diabète ou de colite (et aussi notre prix Nobel de modèle animal)?

Un grand merci à Cédric pour tous tes conseils! Dans sept ans, je ne sais pas où je serai mais je ne piquerai pas de la pierre et ne porterai pas constamment un jogging et des running. Voilà, c'est écrit...

Merci à Vaness' et Gaëlle pour (entre autres) les « petites » soirées Perrock... !

Merci à Flora et Mélanie Chesneau, le duo infernal sans qui je n'aurai jamais découvert les « merveilleux ».

Merci à Jean Paul. Tu as été un super binôme de ménage !

Et plus particulièrement à Valentin, Laura, Caro M., Laurence D., Fred, Laurent, Aurélie L., Aurélie M., Apo, Sarah et Mélanie N. qui m'ont donné un petit coup de pouce dans mes manip ou m'ont consacré du temps ou qui ont été là pour papoter le temps d'une centri :)

Merci à toute l'U1064 pour un bonjour ou un sourire !

Un grand merci à mes amies Sarah, Amélie, Mégane, Marlène et Clémence. Une nouvelle étape est passée. Je vais « enfin finir mes études et trouver un boulot maintenant » (!). Merci d'être là, tout simplement.

En écrivant cette partie, j'ai eu une pensée pour vous : Benou, Elena, Mathilde, Charlotte et Manon M. qui avez chacun fait partis d'une période de la fac et sans qui ça n'aurait pas été aussi bien... C'est bientôt votre tour !

À ma famille. À mon papa et ma maman qui ont toujours été présents pour moi quoique je choisisse de faire et où que je choisisse d'aller. Et qui m'ont aussi nourrit tous les dimanches, ces trois dernières années. À mon petit frère qui devient un grand « jeune homme » (mais qui restera mon petit boloss).

Mes derniers remerciements sont adressés à Alexis qui m'a soutenu, encouragé et supporté (dans les deux sens du terme) au quotidien surtout dans cette dernière ligne droite qui n'a pas été la plus simple. J'ai hâte que l'on réalise plein de beaux projets ensemble...

Sommaire

Résumé.....	5
Abstract	6
Abréviations	7
INTRODUCTION	10
1. Le cytomégalovirus.....	11
1.1. Histoire du CMV	11
1.2. Epidémiologie.....	11
1.3. Biologie du CMV	12
1.3.1. Structure de la particule virale	13
1.3.2. Le tégument.....	14
1.3.3. L'enveloppe du CMV	14
1.4. La réponse immunitaire anti-CMV	15
1.4.1. La réponse immunitaire innée	15
1.4.1.1. Les lymphocytes « Natural Killer » ou cellules NK.....	15
1.4.1.2. Les cellules dendritiques	16
1.4.2. La réponse immunitaire adaptative	18
1.4.2.1. Les lymphocytes T $\alpha\beta$	18
1.4.2.2. Les lymphocytes B	20
1.4.2.3. Les lymphocytes T $\gamma\delta$	20
1.4.3. Schéma récapitulatif.....	21
1.5. Echappement viral.....	22
1.6. Pathologies	24
1.6.1. Maladies de l'immunodéprimé	25
1.6.2. Infections congénitales.....	26
1.7. Les traitements anti-CMV.....	27
1.7.1. Les traitements actuels	27
1.7.2. Les traitements en cours de développement.....	27

2.	L'interaction entre le CMV et son hôte	30
2.1.	Le tropisme du CMV	30
2.2.	Inoculation du CMV	31
2.2.1.	Les cellules dendritiques	33
2.2.1.1.	Généralités	33
2.2.1.2.	Les cellules dendritiques myéloïdes.....	33
2.3.	L'entrée du virus dans sa cellule hôte	36
2.4.	Le rôle de la gB	40
2.4.1.	Structure et fonction	40
2.4.2.	Récepteurs de la gB	45
2.4.3.	Sites de N-glycosylations	45
3.	Les lectines de type C	52
3.1.	DC-SIGN	52
3.1.1.	Structure.....	52
3.1.2.	Tétramérisation.....	55
3.1.3.	Expression cellulaire	56
3.1.4.	Fonctions et ligands.....	57
3.1.4.1.	Les N-glycanes	58
3.1.4.2.	Ligands du soi	59
3.1.4.3.	Ligands du non soi	60
3.2.	DC-SIGNR	64
3.3.	Langérine	64
3.3.1.	Structure.....	64
3.3.2.	Fonctions et ligands.....	65
3.4.	Inhibiteurs de DC-SIGN.....	66
4.	Hypothèses de travail.....	68
4.1.	L'interaction gB/DC-SIGN	68
4.2.	Tropisme et glycosylations	69

RESULTATS.....	70
1. Caractérisation de l'interaction gB/DC-SIGN.....	71
2. Inhibiteurs saccharidiques de l'interaction gB/DC-SIGN	91
3. Caractérisation de l'interaction gB/langérine	96
4. Tropisme du CMV et glycosylations	103
DISCUSSION	111
References.....	117

Résumé

Les cellules dendritiques (DC) perçoivent et alertent de l'intrusion dans l'organisme d'agents pathogènes tels que des virus. Un type de récepteurs exprimés chez les DC myéloïdes, les lectines membranaires dépendantes des ions calcium (ou de type C), peuvent reconnaître des virus. Notre équipe a démontré antérieurement que le domaine lectine ou CRD (Carbohydrate Recognition Domain) de DC-SIGN interagissait avec une glycoprotéine d'enveloppe du cytomegalovirus humain (HCMV), la glycoprotéine B (gB) (Halary et al., 2002). Ce travail de thèse a participé à une meilleure caractérisation de l'interaction entre DC-SIGN et la gB. Pour cela, j'ai utilisé des mutants de DC-SIGN, de la gB ainsi que des anticorps dirigés contre ces deux protéines. De plus, j'ai analysé les sucres à la surface de la gB et leur importance dans l'interaction avec DC-SIGN. Ce travail de thèse est aussi axé sur le tropisme du CMV. Les souches de CMV amplifiées au laboratoire présentent un tropisme directement dépendant du type de cellule ayant servi à générer le stock viral (Towler et al., 2012). Le tropisme différentiel du CMV pour les cellules endothéliales ou des leucocytes du lignage myéloïde a été récemment imputé à un groupe de gènes viraux, UL128-UL131A, codant pour des glycoprotéines d'enveloppe. Néanmoins, ces produits de gènes n'expliquent pas tout (Lauron et al., 2014). L'hypothèse avancée dans cette thèse est que le tropisme du CMV pourrait être en partie dû à des différences de glycosylations de surface (Nystrom et al., 2007; Nystrom et al., 2009). Pour explorer cette hypothèse, j'ai utilisé deux stocks de CMV produits sur fibroblastes ou sur cellules endothéliales et j'ai analysé les sucres de leur enveloppe, leur infectiosité et les voies de glycosylations impliquées lors de l'infection.

Abstract

Dendritic cells (DC) sense and alert the host after pathogenic virus intrusions. We have shown previously that the lectin domain of DC-SIGN could interact with the human cytomegalovirus (HCMV) envelope glycoprotein B (gB) (Halary et al., 2002). However, how these two molecules interact is not well defined. Therefore I've undertaken this characterization as a first goal of my thesis in order to establish whether or not the DC-SIGN/HCMV gB complex is basically a suitable target for further new therapeutic developments. To this aim, DC-SIGN and gB mutants as well as anti-DC-SIGN or -gB antibodies were used to delineate the interaction zone between both interactants. A second aim of my thesis work was to answer the question "are HCMV envelope glycosylated proteins involved in tropism alterations?". Briefly, it has been shown previously that laboratory strains tropism may be dependent on the producing cell type from which they were originating (Towler et al., 2012). This differential tropism of HCMV for endothelial cells and leukocytes was recently found to correlate with the presence of the UL128L locus within the viral genome. However, this locus cannot explain on its own the former observations. So we proposed that the HCMV tropism could be in part due to differential glycosylation profiles on HCMV particles. To start solving this question, I differentially analyzed glycoprofiles on two HCMV stocks respectively produced on fibroblasts and on an endothelial cell line *via* a home-made lectin-based interaction assay. Then I analyzed also their respective infectiousness and how glycosylation pathways might be altered at a basal state for each cell type and also in the course of infection.

Abréviations

APC	« Antigen-Presenting Cell », Cellule Présentatrice d'Antigènes
Asn	Asparagine
$\beta 2m$	Béta-2-microglobuline
BAC	« Bacterial Artificial Chromosome », Chromosome Artificiel Bactérien
BSA	« Bovine Serum Albumin », Albumine de Sérum Bovin
BDCA	« Blood Dendritic Cell Antigen »
Ca^{2+}	Ion Calcium bivalent
$CaCl_2$	Chlorure de Calcium
CCL	« Chemokine Ligand »
CCR	« Chemokine Receptor »
CD	Cluster de Différenciation
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV	Cytomégalovirus
CLR	« C-type Like Receptors »
CRD	« Carbohydrate Recognition Domain », Domaine de Reconnaissance des Carbohydrates
DC	« Dendritic Cell », Cellule Dendritique
DAMP	« Danger-Associated Molecular Patterns », motifs Moléculaires Associés au Danger
DC-SIGN	« Dendritic Cell-Specific ICAM3-Grabbing Non-integrin»
DC-SIGNR	« DC-SIGN Related »
EBV	« Epstein-Barr Virus », Virus de l'Epstein-Barr
EGF-R	« Epithelial Growth Factor Receptor », Récepteur du Facteur de croissance Epithélial
FcR	« Fc Receptor»
Fuc	Fucose
GalNAc	N-Acétyle galactosamine
GCV	ganciclovir
GlcNAc	N-Acétyle glucosamine
GM-CSF	« Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor»
gB	Glycoprotéine B
HEC	« Human Endothelial Cells », Cellules Endothéliales Humaines
HFF	« Human Foreskin Fibroblasts », Fibroblastes de prépuces Humains
HHV-8	« Human Herpesvirus-8 », Herpesvirus Humain-8

HLA	« Human Leucocyte Antigen »
HSPG	« Heparan Sulfate Proteoglycan »
HSV	« Herpes Simplex Virus », Virus Herpes Simplex
IC ₅₀	50% Inhibitor Concentration
IE	« Immediate Early »
IFN	Interféron
IRL	« Internal Repeat Long »
IRS	« Internal Repeat Short »
ICAM	« Intracellular Cell Adhesion Molecule »
ITAM	« Immunoreceptor Tyrosine-based Activated Motif »
ITIM	« Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif »
Kbp	« kilo base pairs », kilo paires de bases
kDa	kilo Dalton
LC	« Langerhans Cell », Cellule de Langerhans
L-SIGN	« Liver/lymph node-Specific ICAM3-Grabbing Non-integrin »
LB	Lymphocyte B
LIR	« Leucocyte Ig-like receptors »
LT	Lymphocyte T
Man	Mannose
MIEP	« Major IE Promoter »
MR	« Mannose Receptor », Récepteur au Mannose
mDC	« myeloid Dendritic Cells », Cellules Dendritiques myéloïdes
MDDC	« Monocytes Derived Dendritic Cells », Cellules Dendritiques Dérivées de Monocytes
MgCl ₂	Chlorure de Magnésium
MOI	« Multiplicity Of Infection »
NK	« Natural Killer »
PAMP	« Pathogen-Associated Molecular Patterns »
PC	« Pentameric Complex », Complexe Pentamérique
pDC	« plasmacytoid Dendritic Cells », Cellules Dendritiques plasmacytoïdes
PDGFRa	« Platelet-Derived Growth Factor Receptor a »
PRR	« Pattern Recognition Receptors »
RPE	« Retinal Pigment Epithelium », Epithélium Pigmentaire Rétinien
SIDA	Syndrome de l'Immunodéficience Acquise
Siglec	« Sialic-acid-binding-Immunoglobulin-Like Lectin »
TGF-β	« Transforming Growth Factor-β »

TCR	« T Cell Receptor », Récepteur des Cellules T
TLR	« Toll Like Receptors »
TRL	« Terminal Repeat Long »
TRS	« Terminal Repeat Short »
UL	« Unique Long »
US	« Unique Short »
VIH-1	Virus de l'Immunodéficience Humaine-1

INTRODUCTION

1. Le cytomégalovirus

1.1.Histoire du CMV

En 1904, Ribbert, Jesionek et Kiolemenoglou décrivent pour la première fois la présence de grandes cellules à inclusion intranucléaire dans le foie, les poumons, les reins et dans les glandes salivaires de fœtus et d'enfants mort-nés. La maladie est alors appelée « maladie des inclusions cytomégaliqes ». Le virus est isolé indépendamment par Weller, Smith et Rowe en 1956-1957, Smith ayant auparavant déjà réussi à isoler le virus murin dans les glandes salivaires de souris. Le terme « cytomégalovirus » est donné en 1960 par Weller et *al.* en raison de la morphologie des cellules infectées (Weller et al., 1960). En effet, les cellules infectées voient leur cytoplasme (cyto) augmenter de volume (mégalie) (figure 1).

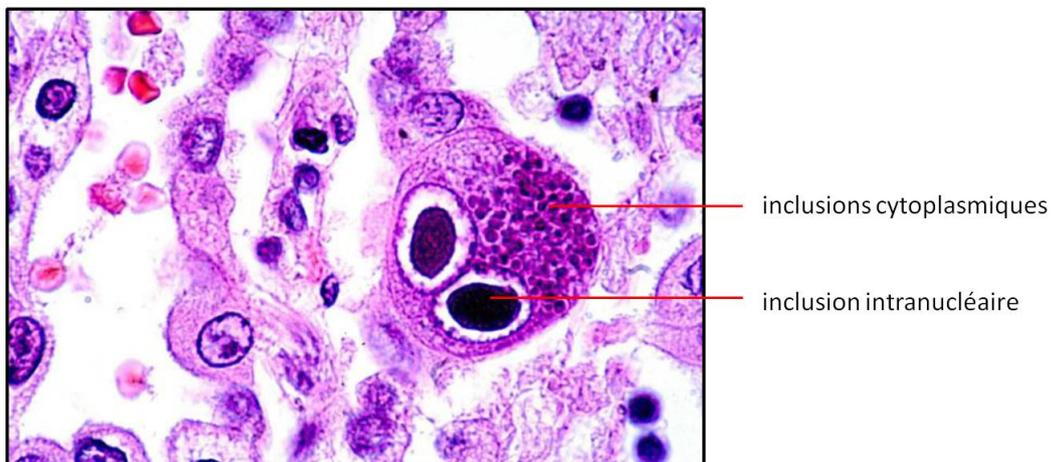


Figure 1

Aspect caractéristique de cellules infectées par le CMV

L'inclusion intranucléaire a une apparence typique en « œil de hibou » à cause de son halo clair. Parfois, des inclusions sont également visibles dans le cytoplasme. Image prise par microscope optique au grossissement x480 d'une coupe de tissu pulmonaire colorée à l'hématoxyline-éosine (d'après Danny L Wiedbrauk, Virology & Molecular Biology, Warde Medical Laboratory, Michigan).

1.2.Epidémiologie

Le CMV est spécifique d'espèce, ce qui signifie que chaque espèce est son propre réservoir. La séroprévalence de ce virus varie en fonction des zones géographiques et peut aller de 40 à 100% selon les pays ou zones géographiques (Cannon et al., 2010). Ce pourcentage est fortement lié aux conditions sanitaires et socio-économiques du pays. En France, la dernière étude publiée en 2013

démontre que 45,6% des femmes entre 15 et 49 ans sont infectées par le CMV (Lepoutre et al., 2013).

Le CMV étant un virus enveloppé, sa demi-vie en dehors d'un organisme est courte. Il est aussi sensible aux pH acides, peut être détruit par les solvants et ne résiste pas à la chaleur (supérieure à 56°C). La demi-vie du virus hors d'une cellule, *in vitro*, est d'environ 24h (Christian Sinzger, communication personnelle). Comme tous les virus, il a besoin d'un hôte pour persister et se répliquer. La transmission du virus s'effectue donc par contact étroit avec des fluides biologiques infectés. En effet, le CMV peut être transmis par les fluides corporels tels que la salive, l'urine, le sang, les sécrétions génitales ou encore le lait maternel (Nelson and Demmler, 1997; Pass and Hutto, 1986; Pass et al., 1982).

1.3. Biologie du CMV

Le cytomégalovirus fait partie de la famille des *Herpesviridae* dans laquelle il existe huit virus infectant l'homme classés en trois sous familles, les alpha-, beta- et gamma-*herpesvirinae*. Le CMV appartient à la sous famille des beta-*herpesvirinae*. Il est aussi appelé HHV-5 pour « Human Herpesvirus 5 » (tableau 1). Le CMV partage de nombreux attributs avec les autres herpesvirus, notamment au niveau du génome, de la structure des virions et de la capacité d'induire une infection persistante due à une mise en latence du virus.

Identification			Génome
Désignation	Nom usuel (abréviation anglo-saxonne)	Sous-famille	Taille (kpb)
HHV-1	Herpès simplex 1 (HSV-1)	α	152
HHV-2	Herpès simplex 2 (HSV-2)	α	152
HHV-3	virus de la varicelle (VZV)	α	125
HHV-4	Virus d'Epstein Barr (EBV)	γ	172
HHV-5	Cytomégalovirus Humain (HCMV)	β	248
HHV-6 A	roseolovirus	β	159
HHV-6-B	roseolovirus	β	162
HHV-7		β	
HHV-8	virus du sarcome de Kaposi (KSHV)	α	230

Tableau 1

Virus de la famille des *Herpesviridae* infectant l'homme

Il existe huit virus faisant partie de la famille des *Herpesviridae*. Ces virus sont classés en trois sous familles, les alpha-, beta- et gamma-*herpesvirinae*. Les HHV-1, -2 et -3 et -8 font partis des alpha-*herpesvirinae*, les HHV-5, -6A, -6B et -7 font partie des beta-*herpesvirinae* et le HHV-4 fait partie des gamma-*herpesvirinae* (Pellett, 2007).

1.3.1. Structure de la particule virale

Le CMV est considéré comme étant un « gros virus ». En effet, son diamètre est d'environ 200 nm. C'est un virus enveloppé, comprenant un tégument et une capsidie icosaédrique enfermant l'ADN double brin linéaire (figure 2).

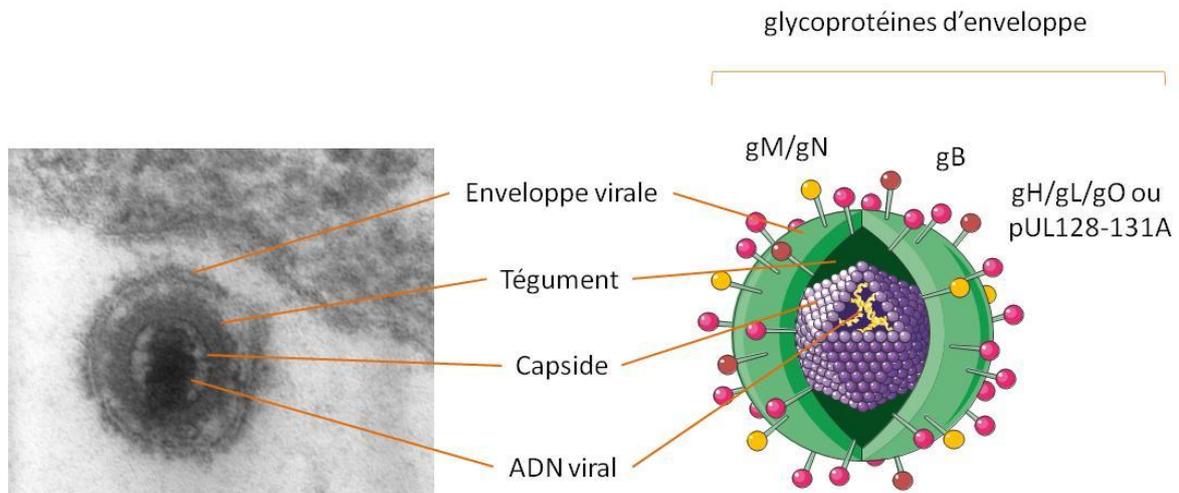


Figure 2

Structure du CMV

Le cytomégalovirus est composé d'ADN double brin encapsidé. Autour de la capsidie se trouve le tégument puis l'enveloppe virale. Celle-ci est composée de diverses glycoprotéines. Une image du CMV prise en microscopie électronique à transmission (MET) est montrée à gauche et une représentation schématique de la structure du CMV est montrée à droite (d'après P. Pilet & F. Halary; TEM facility, SFR Bonamy, Nantes).

Le génome du CMV est composé d'environ 230 kbp ce qui constitue un des plus larges génomes viraux. Ce génome peut être divisé en deux régions uniques non répétées :

- une région longue (UL : Unique long)
- une région courte (US : Unique Short)

Ces deux régions sont flanquées de séquences répétitives terminales (TR : Terminal Repeat) appelées TRL à l'extrémité de la séquence UL et TRS à l'extrémité de la séquence US. La jonction des 2 segments UL et US est constituée de la répétition inversée des TRL et TRS appelées respectivement IRL et IRS (figure 3). Tout au long des séquences UL et US se trouvent des régions promotrices de la transcription. La plus étudiée est la séquence MIEP (Major IE Promoter) qui est responsable de la régulation de l'expression des gènes très précoces IE1 et IE2 (Immediate Early) nécessaires à l'initiation du cycle viral. On trouve sur cette séquence des sites de fixations à de nombreux facteurs de transcriptions cellulaires ainsi qu'un site de fixation pour IE2 permettant la répression du promoteur en phase plus tardive du cycle.

Il existe plus de 200 cadres ouverts de lecture (ORF) qui peuvent potentiellement coder pour une protéine (Davison, 2003; Dolan, 2004).

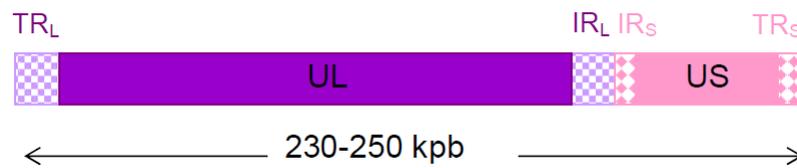


Figure 3

Structure du génome du CMV

UL: Unique long; US: Unique short; TRL: Terminal repeat long; TRS: terminal repeat short; IRL: internal repeat long; IRS: internal repeat short (tiré du manuscrit de Faure, 2010).

Le génome du CMV est enfermé dans la capsid virale (ou nucléocapside). Cette capsid est composée de 162 capsomères formant une structure icosaédrique et mesurant environ 100 nanomètres de diamètre. Elle est constituée d'au moins sept protéines (Gibson, 1996a). La capsid du CMV est elle-même entourée d'un tégment.

1.3.2. Le tégment

Le tégment est la région située entre la capsid et l'enveloppe. Il représente 40% de la masse totale du virion. Ce compartiment est composé en majorité de protéines virales mais on peut aussi retrouver des protéines et des ARN cellulaires. Les protéines constituant le tégment sont majoritairement phosphorylées (la phosphorylation semblant favoriser l'incorporation de ces protéines dans ce compartiment) et très souvent immunogènes (Britt and Boppana, 2004; Munger et al., 2006). La protéine la plus présente est pp65 qui est codée par le gène UL83 et qui représente 15% de la masse virale, suivie par pp71 et pp150. Même si la structure du tégment semble aléatoire, elle est en fait beaucoup plus construite que ce que laissent à penser les images de microscopies électroniques. Globalement, les protéines tégmentaires sont séparées en deux catégories : l'une comprend les protéines nécessaires à l'assemblage ou au désassemblage du virion et l'autre comprend les protéines de régulation, que ce soit pour contrôler la réponse immunitaire, favoriser la réplication virale ou perturber le cycle cellulaire.

1.3.3. L'enveloppe du CMV

L'enveloppe du CMV est constituée d'une bicouche lipidique dérivée du réticulum endoplasmique (RE) ou du compartiment intermédiaire RE/Golgi (ERGIC) de la cellule infectée. Cette enveloppe est composée d'une multitude de glycoprotéines virales telles que la gB, la gH, la gL, la gO, la gM ou

encore la gN (Baldick and Shenk, 1996; Gibson, 1996b; Hobom et al., 2000). Ces glycoprotéines sont regroupées en complexes notés gCI, gCII et gCIII (Gretch et al., 1988). La gB, associée en trimère, compose le complexe protéique gCI (Britt and Auger, 1986). Le complexe gCII est composé des glycoprotéines gM et gN et le complexe protéique gCIII est composé des glycoprotéines gH, gL et gO (Huber and Compton, 1998; Mach et al., 2000). Un groupe de glycoprotéines UL128, UL130 et UL131A a récemment été décrit comme formant, en association avec les glycoprotéines gH/gL, un complexe pentamérique (PC) (Hahn et al., 2004).

Il a été démontré que la plupart de ces glycoprotéines d'enveloppe sont impliquées dans la production de particules infectieuses ainsi que dans l'entrée du virus dans la cellule hôte (Compton, 2004; Hahn et al., 2004; Hobom et al., 2000). De plus, ces glycoprotéines d'enveloppe portent de nombreux épitopes reconnus par des anticorps neutralisants et seront les principales cibles de la vaccination.

Le rôle de ces glycoprotéines dans l'attachement et l'entrée du virus dans sa cellule hôte sera détaillé dans le prochain chapitre.

1.4. La réponse immunitaire anti-CMV

1.4.1. La réponse immunitaire innée

La réponse immunitaire innée constitue une première barrière à l'infection virale. Elle va jouer un rôle important dans la défense anti-CMV et va permettre par la suite d'activer la réponse immunitaire adaptative qui aura pour but de contrôler l'infection ainsi que d'éliminer les cellules infectées par le CMV. L'activation du système immunitaire inné va induire la sécrétion de cytokines inflammatoires, ce qui va engendrer le recrutement sur le site d'infection de cellules de l'immunité. En effet, la réponse immunitaire innée est une association de l'activité antivirale des interférons de type I (IFN α et IFN β), de l'activité cytotoxique des cellules « natural killer » (NK) et de l'activité phagocytaire des cellules dendritiques (DC) et des macrophages (Salazar-Mather et al., 2002; Simmen et al., 2001).

1.4.1.1. Les lymphocytes « Natural Killer » ou cellules NK

Les cellules NK sont capables d'une réponse immunitaire innée non-spécifique conduisant à la lyse des cellules infectées. Ces cellules possèdent de très nombreux récepteurs de surfaces inhibiteurs ou activateurs capables de reconnaître différents types de signaux. Parmi les récepteurs inhibiteurs, LIR (pour Leucocyte Ig-like receptors) interagit avec le CMH-I et les récepteurs CD94, NKG2A et NKG2B interagissent avec une molécule du CMH non classique : HLA-E (Braud et al., 1998). Parmi les récepteurs activateurs, NKG2D interagit avec le CMH-I. C'est la somme de ces signaux inhibiteurs et

activateurs reçus par les récepteurs de la cellule NK qui conduit à la lyse ou non de la cellule cible, cette lyse pouvant s'effectuer *via* la sécrétion des molécules perforines et granzymes ou *via* l'expression de ligands pour les récepteurs de mort. Par exemple, lors de l'infection par le CMV, l'expression des molécules du CMH-I à la membrane de la cellule infectée va diminuer. Le CMH-I envoyant un signal inhibiteur aux cellules NK *via* son interaction avec le récepteur LIR, la diminution à la surface du CMH-I de la cellule infectée la rendra susceptible à la lyse par les cellules NK. De plus, des études sur un modèle murin démontrent l'impact d'une délétion des cellules NK sur la réponse anti-CMV. Les souris déficientes sont hautement susceptibles à l'infection par le MCMV mais le transfert de cellules NK leurs confère une protection (Bukowski et al., 1985; Bukowski et al., 1988). Chez l'homme les exemples sont moins clairs puisque les déficiences en cellules NK sont peu fréquentes. Toutefois cette rare déficience peut entraîner des épisodes sérieux et récurrents d'infections à CMV (Biron et al., 1989). Les études incluant des patients transplantés démontrent une corrélation entre la restauration de la réponse NK et une protection contre des maladies à CMV (Quinnan et al., 1982). De plus, la réactivation virale après une transplantation allogénique est associée à l'apparition d'une population particulière de cellules NK qui est plus efficace pour la synthèse d'IFN et la protection contre le CMV (Foley et al., 2011). Les cellules NK aident aussi à la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative par la sécrétion de nombreuses cytokines.

1.4.1.2. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques et les macrophages vont capturer les antigènes viraux et participer à la mise en place de la réponse immunitaire adaptative (Banchereau and Steinman, 1998).

La mobilité est une propriété fondamentale de ces cellules de l'immunité. En effet, les DC possèdent des capacités de mobilités importantes qui vont différer en fonction de leur stade de maturation. La migration sélective de la moelle osseuse vers les tissus périphériques puis vers les organes lymphoïdes secondaires est extrêmement sophistiquée et fortement régulée. Elle dépend de l'expression de molécules d'adhérences (sélectines et intégrines) qui vont leur permettre de se lier spécifiquement à l'endothélium des vaisseaux sanguins d'un organe particulier et de traverser cet endothélium pour migrer dans l'organe. L'accumulation rapide de DC en périphérie, au niveau du site d'entrée du virus, est la conséquence du recrutement de précurseurs de DC en réponse à la production de chimiokines inflammatoires locales. En effet, la migration des DC est dépendante de l'expression différentielle de récepteurs aux chimiokines tels que la molécule CCR6 qui permet aux DC immatures de migrer vers les tissus périphériques suite à un signal inflammatoire et la molécule CCR7 qui permet aux DC matures de migrer vers les ganglions lymphatiques (Dieu et al., 1998; Forster et al., 1999; Randolph et al., 2008).

Au stade immature, les DC sont très efficaces pour la capture d'antigènes puis la prise en charge des pathogènes tels que le CMV. Elles reconnaissent les pathogènes directement par des récepteurs nommés PRR (Pattern Recognition Receptors). Ils sont définis comme des récepteurs reconnaissant des produits d'agents infectieux (virus, bactéries, champignons et protozoaires) qui sont appelés les PAMP (Pathogen-Associated Molecular patterns). Ils peuvent aussi reconnaître des signaux de dangers endogènes (cellules nécrotiques par exemple) qui sont alors appelés DAMP (Danger-associated Molecular Patterns) (figure 4) (Matzinger, 2002). Parmi les PRR exprimés par les DC, les «Toll-Like receptors» (TLR) font l'objet de nombreuses études (Janeway and Medzhitov, 1999; Medzhitov, 2001). Ces PRR comprennent aussi les « C-type Like receptors » (CLR) et les récepteurs d'opsonisation (récepteurs Fc ou certains récepteurs aux compléments). Ces différentes familles de récepteurs se lient spécifiquement aux différentes classes de pathogènes et permettent la capture des antigènes. Cette capture peut se faire par plusieurs mécanismes distincts qui vont induire l'internalisation de la particule. Les récepteurs impliqués dans la reconnaissance du CMV et les mécanismes d'entrée du virus dans les DC seront abordés dans un chapitre suivant.

Cette première phase d'activation générée par des signaux inflammatoires cytokiniques et par les agents pathogènes va induire la maturation des DC. Cela se traduit par des modifications profondes du phénotype de ces DC telles que la diminution de ses capacités de phagocytose et l'augmentation de ses capacités de présentation d'antigènes. De plus, ces cellules diminuent leur sensibilité aux signaux inflammatoires en augmentant l'expression du récepteur CCR7 qui leur permet de migrer vers les ganglions lymphatiques en réponse aux ligands CCL19 et CCL21 dans le but d'initier la réponse adaptative (figure 4) (Dieu et al., 1998; Sallusto et al., 1998).

Une fois mature, les DC sont capables de présenter des antigènes viraux *via* leurs CMH-I et leurs CMH-II, les premiers permettant l'activation des lymphocytes T CD8⁺ et les seconds des lymphocytes T CD4⁺. Les deux voies d'apprêtements d'antigènes sont différentes, l'apprêtement au CMH-I est issu d'antigènes intracellulaires et l'apprêtement au CMH-II est issu d'antigènes extracellulaires (ou des corps apoptotiques dérivés de cellules infectées). Les DC détiennent par ailleurs la caractéristique de pouvoir présenter des antigènes exogènes sur leur CMH-I, ce mécanisme est appelé présentation croisée. Il est essentiel pour répondre efficacement aux différents pathogènes, en particulier intracellulaires, comme les virus tels que le CMV. Une fois le complexe CMH/peptide présenté à la surface des DC matures, il pourra interagir avec le TCR des cellules T, au sein de la synapse immunologique. Cette interaction va induire l'activation des cellules T et ainsi conduire à une réponse immunitaire adaptative (Banchereau et al., 2000; Grakoui et al., 1999; Guermonprez et al., 2002).

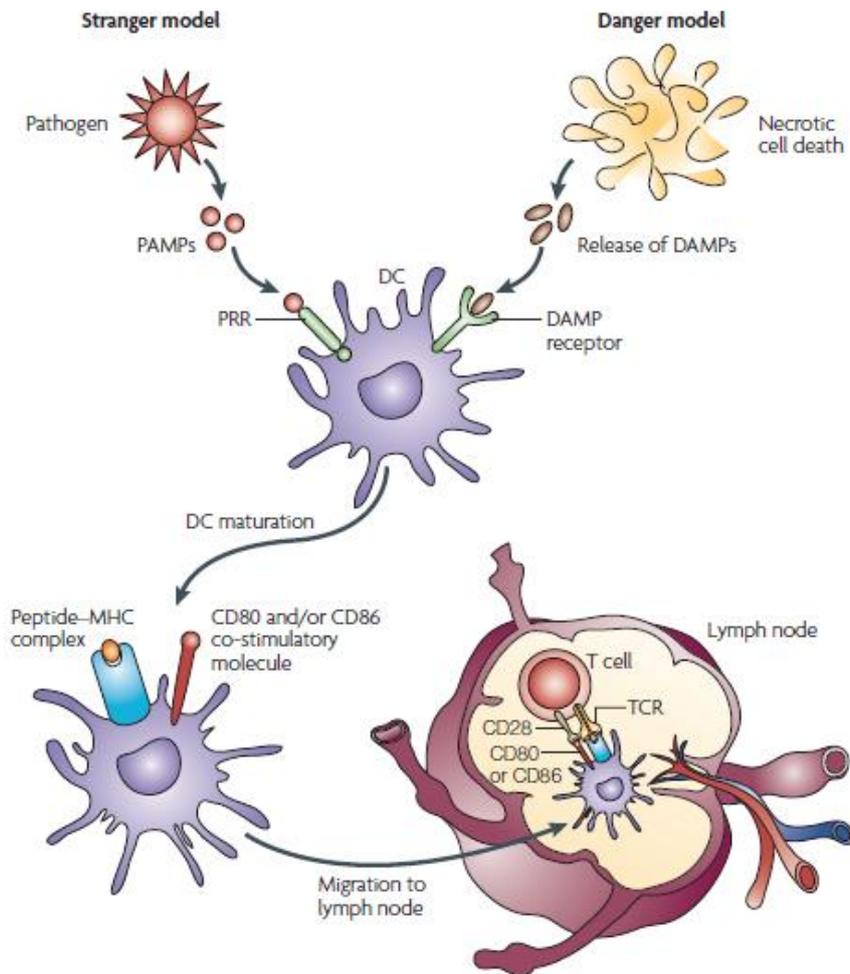


Figure 4

Capture d'antigènes par les DC et leur présentation aux lymphocytes T

Après avoir reconnu un signal de danger PAMP ou DAMP *via* ces PRR, la DC va maturer et migrer jusqu'au nœud lymphatique où elle pourra activer les lymphocytes T *via* l'interaction CMH/TCR (Kono and Rock, 2008).

1.4.2. La réponse immunitaire adaptative

1.4.2.1. Les lymphocytes T $\alpha\beta$

La réponse immunitaire adaptative médiée par les lymphocytes T (LT) reste le mécanisme prédominant du contrôle de l'infection par le CMV.

L'importance des LT $CD4^+$ a tout d'abord été démontrée chez la souris. La déplétion de ce compartiment cellulaire à long terme induit une répllication virale persistante (Jonjic et al., 1989). Cette réponse $CD4^+$ est principalement orientée Th1. En effet, on retrouve dans le sang des personnes infectées des LT $CD4^+$ producteurs d'IFN- γ et de TNF- α (type Th1) mais pas de cellules productrices d'IL-4 (type Th2) (Rentenaar et al., 2000). Ces résultats sont en corrélation avec la très forte réponse LT $CD8^+$ induite par l'infection qui a besoin de l'aide des LT $CD4^+$ Th1 pour se mettre en

place et se maintenir. Chez les patients transplantés rénaux, l'apparition des LT CD4⁺ précède toujours l'apparition des LT CD8⁺ lorsque l'infection est asymptomatique. Si l'émergence de cette réponse est retardée, des maladies à CMV sont possibles (Gamadia et al., 2004).

La réponse antivirale médiée par les LT CD8⁺ est essentielle pour le contrôle de l'infection et la baisse de la charge virale chez les personnes infectées par le CMV. Chez l'homme, la reconstitution du compartiment LT CD8⁺ après transplantation de moelle osseuse est associée à la protection contre les maladies à CMV (Cwynarski et al., 2001).

Il existe un large panel de reconnaissance des antigènes du CMV par les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺. Les protéines ciblées par la réponse CD4⁺ sont proches de celles ciblées par la réponse CD8⁺. Les premières identifiées ont été IE1 et pp65 mais de nombreuses autres protéines peuvent être ciblées par cette réponse telles que pp50, gB, gH ou encore IE2 (figure 5) (Borysiewicz et al., 1988; McLaughlin-Taylor et al., 1994).

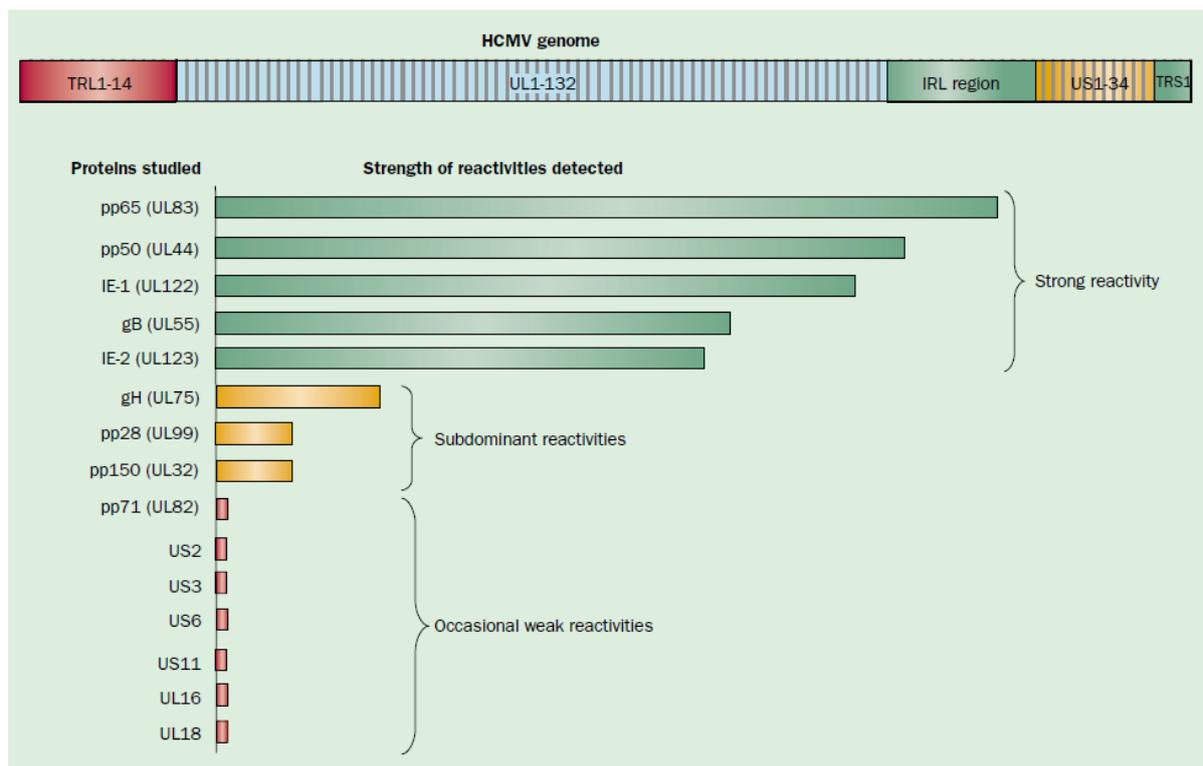


Figure 5

Les antigènes du CMV

Représentation schématique des antigènes viraux reconnus par la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ chez les personnes en bonne santé. La réactivité relative pour chaque protéine est basée sur les réponses T détectées *ex vivo* et *in vitro* (Gandhi and Khanna, 2004).

1.4.2.2. Les lymphocytes B

Parallèlement à la réponse médiée par les LT, la réponse humorale se traduit par une activation des lymphocytes B (LB) sécrétant des anticorps.

Dans les modèles animaux, notamment chez le cochon d'inde, la réponse humorale qui se développe lors d'une immunisation permet de protéger d'une transmission materno-fœtale (Harrison et al., 1995). Chez l'homme, la présence d'anticorps suite à une primo-infection avant la grossesse joue un rôle important pour limiter cette transmission au fœtus (Fowler et al., 1992). Récemment, l'équipe de Peirera a démontré que l'immunisation passive (transfert d'immunoglobulines spécifiques du CMV par transcytose) de femmes enceintes infectées lors de la grossesse permet de réduire les effets de l'infection, notamment en limitant la réplication virale au niveau du placenta (Maidji et al., 2010). La plupart des anticorps neutralisants sont dirigés contre la gB d'enveloppe du CMV (Britt et al., 1990). La réponse humorale est aussi dirigée contre la gH qui induit aussi des anticorps neutralisants, ainsi que des protéines du tégument comme pp65 ou pp50 ou encore des protéines non structurales telles qu'IE1 (Britt, 1991; Urban et al., 1996). Le complexe pentamérique (gH/gL/UL128/UL1301/131) nécessaire à l'infection des cellules endothéliales permet aussi la production d'anticorps spécifiques neutralisants et ce de façon encore plus efficace que les protéines gB et gH seules (Macagno et al., 2010).

1.4.2.3. Les lymphocytes T $\gamma\delta$

Ces cellules représentent un faible pourcentage des lymphocytes circulants (moins de 6%) mais sont présentes en grand nombre dans les tissus périphériques tels que la peau ou les muqueuses.

Une étude chez des patients transplantés rénaux a démontré une augmentation du pourcentage de LT $\gamma\delta$ avec jusqu'à 40% des LT $\gamma\delta$ circulants lors de l'infection par le CMV (Dechanet et al., 1999). Ces LT $\gamma\delta$ ayant par ailleurs la capacité de lyser des cellules infectées par le virus (Halary et al., 2005). Le même phénomène est observé chez tous les receveurs d'organes solides, dans lesquels l'expansion des LT $\gamma\delta$ est corrélée avec la réactivation virale (Couzi et al., 2011).

1.4.3. Schéma récapitulatif

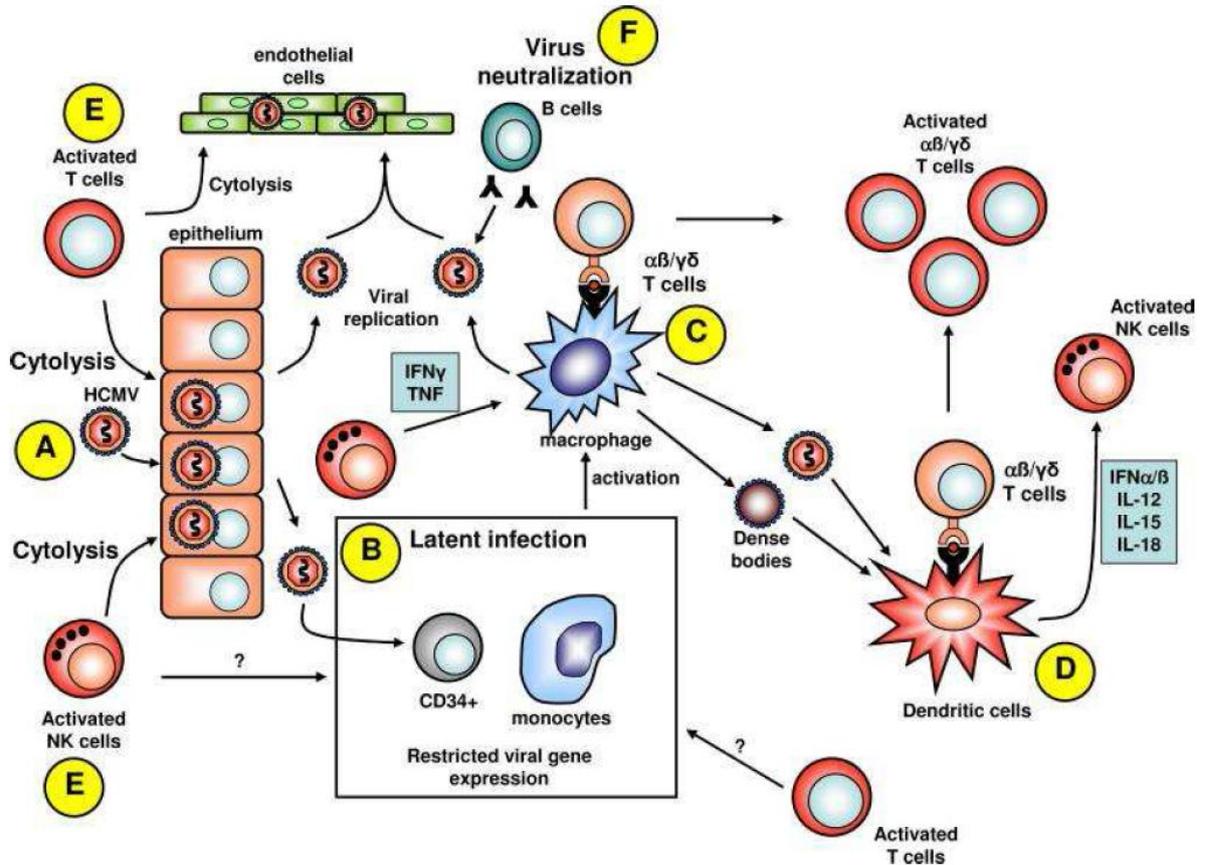


Figure 6

Contrôle du CMV par l'immunité innée et adaptative

(A) L'infection primaire par le CMV chez les individus en bonne santé commence typiquement dans les épithéliums des muqueuses, (B) après quoi le virus se dissémine dans les cellules myéloïdes incluant les monocytes et les cellules CD34⁺, où il établira sa latence. Une expression restreinte des gènes viraux est observée dans ces cellules infectées de manière latente ce qui limite leur reconnaissance par les cellules effectrices. (C) La différenciation de ces monocytes infectés en macrophages ou DC peut initier l'infection productive. (D) Les particules virales ou les corps denses peuvent être présentés par les DC pouvant alors stimuler les LT spécifiques de l'antigène. Parallèlement à cela, les DC activées *via* leur TLR peuvent aussi sécréter un panel de cytokines activant les cellules effectrices de la réponse innée. (C) Les macrophages infectés peuvent activer directement les LT spécifiques d'antigènes. (E) Ces LT activés (CD8⁺, CD4⁺ et $\gamma\delta$) et les cellules NK peuvent directement lyser les cellules infectées par cytolysé ou bloquer la réplique virale au travers de la sécrétion de cytokines telles que l'IFN- γ ou encore du TNF. (F) Une autre réponse importante est médiée par les LB activés qui vont contrôler les virions libres dans le milieu extracellulaire par le biais de la production d'anticorps neutralisants (Crough and Khanna, 2009).

1.5. Echappement viral

Tout comme la plupart des *Herpesviridae*, le CMV a développé de nombreux mécanismes d'échappement aux acteurs des réponses immunitaires innées et adaptatives. Le CMV dédie plus de 20% de ses gènes pour assurer une persistance à long terme (Mocarski, 2002).

Les protéines virales spécifiques du détournement de la réponse immunitaire par le CMV sont appelées des immuno-évasines (figure 7). Au vu du large panel de protéines virales destinées à l'échappement du CMV, je ne citerai que certaines d'entre elles. Les immuno-évasines interviennent à différents niveaux. Elles peuvent principalement :

- altérer la présentation des peptides viraux aux lymphocytes T par la séquestration, clivage ou inhibition du transport des protéines du CMH,
- interférer avec la fonction des cellules NK, par l'intermédiaire de leurs récepteurs,
- modifier le cycle cellulaire et inhiber l'apoptose.

Le défaut d'expression des molécules du CMH est dû à l'intervention en cascade des produits de plusieurs gènes (US2-US11) conduisant à la rétention puis à la dégradation de ces molécules dans la cellule. La protéine virale US2 empêche le bon adressage des molécules HLA-DR et HLA-DM et entraîne leur dégradation, inhibant ainsi la présentation par le CMH-II (Miller et al., 2001). Une protéine homologue du CMH-I, la protéine virale UL18, va limiter la reconnaissance des cellules infectées (Beck and Barrell, 1988).

Le virus peut aussi interférer avec la fonction des cellules NK. Les peptides viraux UL16 et UL40 vont se lier aux CMH non classiques pour inhiber l'activation des cellules NK (Dunn et al., 2003; Tomasec et al., 2000).

Enfin une protéine homologue à l'IL-10 codée par UL111a possède les mêmes caractéristiques que l'IL-10 cellulaire. Elle va limiter l'inflammation et l'apoptose pour faciliter la dissémination du virus (Kotenko et al., 2000).

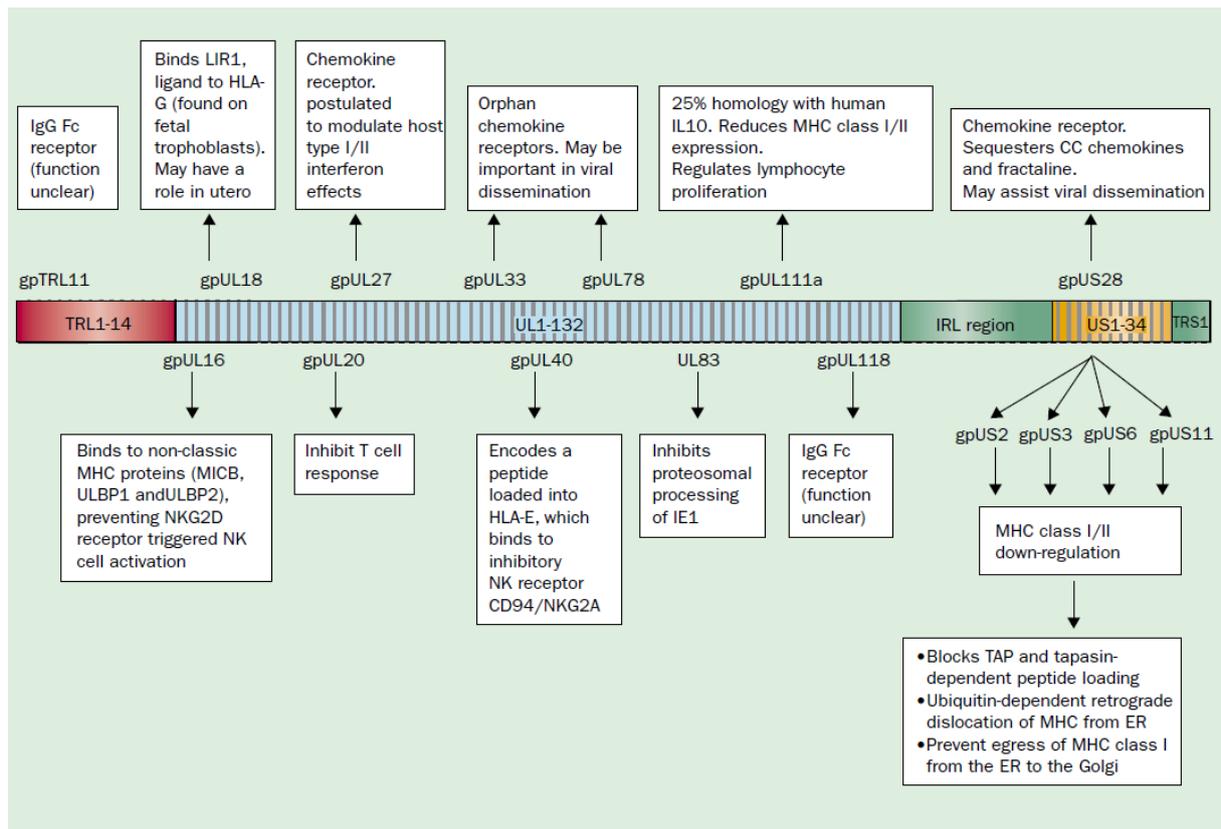


Figure 7

Récapitulatif des différents gènes viraux impliqués dans l'échappement à la réponse immunitaire

Chaque gène viral est indiqué avec sa localisation dans le génome viral et sa fonction associée (Gandhi and Khanna, 2004).

Des stratégies autres que les immuno-évasines peuvent être déployées par le CMV pour échapper à la réponse immunitaire. Le CMV peut infecter les précurseurs hématopoïétiques de la moelle osseuse, les cellules CD34⁺ (Hahn et al., 1998). Dans ces cellules, le virus va pouvoir entrer en état de latence. Il va restreindre l'expression de ces gènes viraux, ce qui le met alors à l'abri des défenses immunitaires cellulaires. Ces précurseurs donnent naissance à une progénie myéloïde porteuse de l'épisome du CMV dans une faible proportion des cas (1/1000 à 1/10000 cellules filles). Les monocytes notamment puis les DC ou les macrophages porteurs de l'épisome pourront alors réactiver le virus (Khaiboullina et al., 2004).

Sur la base de travaux *in vitro* de notre équipe, les DC pourraient aussi être détournées de leur fonction première et être utilisées comme transporteurs du CMV pour qu'il puisse rejoindre d'autres organes et ainsi se disséminer. Ce virus utiliserait les DC tels un cheval de Troie pour être transmis à des cellules plus permissives (phénomène appelé *trans*-infection) (Haspot et al., 2012).

1.6.Pathologies

Diverses pathologies peuvent être développées après une infection par le CMV, et ce dépendamment du statut immunitaire de l'hôte.

Pour les individus immunocompétents, l'infection par le CMV sera asymptomatique dans la majorité des cas. En effet, chez ces individus, la réponse immunitaire antivirale est efficace et va permettre de contrôler l'infection. Néanmoins, chez certains individus immunocompétents, l'infection par le CMV sera symptomatique. Ces individus vont présenter une fièvre, des myalgies ainsi qu'un syndrome mononucléosique (identique à celui causé par le virus d'Epstein-Barr ou EBV). Dans des cas plus graves, ces individus peuvent développer une pneumopathie, une myocardite, une hépatite ou encore une encéphalite (tableau 2) (Rafailidis et al., 2008; Wreghitt et al., 2003). L'atteinte d'organe cible reste cependant exceptionnelle chez l'immunocompétent.

<i>Contexte de survenue</i>	<i>Principales manifestations cliniques</i>
Primo-infection de l'adulte immunocompétent et du grand enfant	Asymptomatique (90%) Syndrome mononucléosique
Réactivations-réinfections	Asymptomatiques
Infection congénitale	Asymptomatique Retard psychomoteur, surdité Embryofœtopathie disséminée (MIC), décès
Infection périnatale	Asymptomatique Pneumopathie interstitielle bénigne
Infection du nouveau-né prématuré	Infection grave, avec pneumopathie
Primo-infection des personnes immunodéprimées	Dissémination sanguine avec fièvre persistante
Transplantation	
Grefe de moelle	Pneumopathie interstitielle, rejet
Receveur d'organe	Atteinte digestive, pneumopathie, Rejet
Sida (<100 lymphocytes CD4+/mm ³ de sang)	Rétinite, colite, atteinte neurologique

Tableau 2

Manifestations cliniques de l'infection par le CMV

Les manifestations cliniques de l'infection par le CMV sont diverses et dépendantes du contexte de survenue de l'infection (Sophie Alain, source document internet, www.unilim.fr).

1.6.1. Maladies de l'immunodéprimé

Les individus immunodéprimés sont des personnes dont le système immunitaire (SI) n'est pas capable d'apporter une réponse suffisamment efficace pour permettre à l'organisme de se défendre. Ces individus peuvent être des patients atteints du SIDA ou encore des patients transplantés traités par immunosuppresseurs. En marge de ces deux catégories d'individus immunodéprimés peuvent être également cités les fœtus et nouveau-nés ou encore les personnes âgées dont le système immunitaire est respectivement soit immature soit « fatigué », c'est-à-dire dont les réponses humorales et cellulaires sont sur-sélectionnées. La gravité de l'infection et ses manifestations cliniques dépendent directement qualitativement et quantitativement de l'importance du déficit immunitaire ou charge nette d'immunosuppression. Chez ces individus, l'infection ou la réactivation du CMV est une cause majeure de morbidité voire de mortalité.

Chez les patients infectés par le HIV au stade SIDA, le CMV reste une des infections opportunistes les plus répandues. La prévalence du CMV ainsi que ses voies de transmissions font que la majorité des patients infectés par le HIV le sont aussi pour le CMV. L'infection reste asymptomatique dans un premier temps et se traduit uniquement par une excrétion du CMV dans les urines, la salive et les sécrétions génitales. Cependant, lorsque le patient devient immunodéprimé, le CMV se manifestera le plus souvent par une rétinite (Song et al., 2003). L'atteinte de la rétine se traduit par une baisse de l'acuité visuelle dont l'extension est irréversible. L'infection peut alors s'aggraver en provoquant des troubles neuronaux tels qu'une encéphalite subaigüe (tableau 2).

Dans le cas d'une greffe, le CMV occupe un des premiers rangs en termes de complications infectieuses. Chez les transplantés, la maladie à CMV représente un risque majeur d'infection (60 à 100% des transplantés rénaux). Ce pourcentage varie en fonction de la transplantation (organe solide ou moelle osseuse), du statut du donneur et du receveur (CMV positif ou négatif) et du traitement utilisé lors de la greffe (Bruminhent et al., 2015; Ramanan and Razonable, 2013). En effet, le traitement immunosuppresseur a une action activatrice envers le CMV (réactivation ou primo-infection symptomatique) mais la réduction des immunosuppresseurs (IS) au cours de l'infection peut entraîner le rejet de la greffe.

En plus de ces maladies directement liées à la réplication virale, le CMV semble avoir un effet oncomodulateur. On retrouve une fréquence plus élevée de CMV dans les tissus de tumeurs malignes telles que les cancers du côlon, les gliomes malins, les maladies d'Hodgkin EBV négative (Cinatl et al., 2005)...

1.6.2. Infections congénitales

Le fœtus n'est pas pourvu d'un système immunitaire totalement développé. Ce système immunitaire, dit naïf, ne sera pas apte à apporter une réponse suffisamment efficace pour permettre au fœtus de se défendre. Le CMV est capable de passer de la mère au fœtus par le placenta. Si la mère a déjà été infectée auparavant par le CMV et qu'elle est réinfectée durant sa grossesse ou qu'elle réactive simplement son virus endogène, la réponse immunitaire adaptative mémoire sera rapide et le risque d'infection du fœtus peu élevé. En revanche, lorsqu'il s'agit d'une primo-infection, le système immunitaire de la mère n'a jamais rencontré le virus auparavant. La réponse immunitaire sera plus longue à mettre en place et le risque de transmission du virus au fœtus sera plus élevé. Ce risque est aussi dépendant du stade de développement de l'embryon/fœtus.

L'infection congénitale par le CMV représente un enjeu majeur. En effet, cette infection congénitale a une prévalence élevée et les séquelles engendrées peuvent être graves. Selon la population, la prévalence de cette infection congénitale varie entre 0,5 et 2%. Parmi ces infections, 10% seront symptomatiques dont 5-10% vont conduire à une mortalité néonatale (Kenneson and Cannon, 2007). Les fœtus ayant été infectés par le CMV et ayant développés des symptômes subiront des séquelles majeures telles que la perte de l'ouïe, des déficits ophtalmologiques et des malformations du système nerveux central (Syggelou et al., 2010).

Cependant, une étude française, portant sur 5173 femmes enceintes, a récemment démontré que des informations simples sur les mesures d'hygiène données à une large population de femmes enceintes au début de leur grossesse réduisent significativement l'incidence d'une infection congénitale durant la grossesse et le nombre de fœtus infectés (Vauloup-Fellous et al., 2009). Au vu des répercussions graves dues aux infections congénitales symptomatiques et du manque de prévention face à cette infection, certaines associations ont vu le jour (réseau d'action « Stop CMV »). Mais des efforts sont encore à faire pour mieux informer la population sur les risques de l'infection au CMV.

1.7. Les traitements anti-CMV

Si la maladie des inclusions cytomégaliqes est connue depuis 1904, il a fallu attendre 1956 pour isoler le virus responsable: le cytomégalo virus humain. C'est après plus de 30 ans de recherche que le premier traitement curatif, le ganciclovir (GCV), a été commercialisé en France. Depuis, seules des mesures préventives et les traitements curatifs limitent l'incidence et la gravité des infections à CMV.

1.7.1. Les traitements actuels

Le ganciclovir a été le premier traitement curatif, en 1988, à être approuvé comme traitement du CMV. Il est aujourd'hui considéré comme le « gold standard » en cas d'infection ou de réactivation du CMV chez l'individu immunodéficient. Ce composé est un analogue de guanosine qui a besoin d'être triphosphorylé pour être incorporé dans l'ADN et inhiber la réplication virale par arrêt de synthèse du génome viral. La première phosphorylation est faite par une kinase virale UL97 ce qui permet de cibler uniquement les cellules infectées (Littler et al., 1992). D'autres molécules ont été commercialisées telles que le foscarnet en 1991, le cidofovir en 1997, le leflunomide ou encore le maribavir (Chacko and John, 2012; Marty et al., 2011). Néanmoins, le développement de nouvelles molécules a été freiné par la chute de l'incidence de la maladie à CMV chez les patients infectés par le HIV. L'arsenal thérapeutique anti-CMV reste alors limité à ces inhibiteurs de l'ADN polymérase virale.

Ces molécules ont déjà démontré leurs limites puisqu'elles ne sont pas dénuées de toxicité et d'effets secondaires indésirables limitant grandement leur utilisation chez les patients, notamment les transplantés rénaux (néphrotoxicité importante) et interdit totalement leur utilisation chez la femme enceinte, ne laissant aucune alternative à la prévention de l'infection congénitale. De plus, malheureusement, l'apparition fréquente de mutations sur la séquence codant pour les gènes UL97 conduit à l'émergence de souches virales résistantes voire multirésistantes aux traitements (Biron et al., 1986; Smith et al., 1997). Il est aussi important de préciser qu'aucun de ces traitements n'est en mesure de neutraliser le virus latent à l'abri dans son réservoir.

1.7.2. Les traitements en cours de développement

Dès les années 1970, un vaccin vivant atténué utilisant la souche de CMV Towne, délétée d'une partie de son génome, a fait l'objet d'essais cliniques (Adler et al., 1995; Adler, 1998). L'absence d'immunité durable induite par cette souche a fait arrêter l'utilisation de ce vaccin. Ces essais ont été suivis par un vaccin combinant deux souches recombinantes de CMV: Towne et Toledo (Heineman et al., 2006). Celui-ci ne démontrant pas une protection suffisante, il a été abandonné et d'autres essais ont été lancés depuis. Le dernier en date repose sur l'utilisation de la glycoprotéine B (gB)

d'enveloppe du CMV indispensable à la pénétration du virus dans la cellule ou la protéine pp65 du tégument du CMV. Il s'agissait dans ces cas d'induire une réponse immunitaire en injectant uniquement un ou plusieurs antigènes immunogènes. Les premiers essais de vaccins recombinants intégrant la gB ou la protéine pp65 dans un vecteur aviaire canarypox semblent encourageants, mais ces vaccins nécessitent plusieurs injections (Berencsi et al., 2001; Bernstein et al., 2002). D'autres vaccins ont été développés tels que ceux utilisant les « denses bodies » (particules virales défectives) ou encore les polyépitopes dans le but d'induire une réponse cellulaire (Becke et al., 2010; Pepperl et al., 2000). Une des approches les plus prometteuses a été de générer un vaccin sous unitaire à partir de protéines recombinantes. Cette stratégie démontre des résultats encourageants. En effet, un essai clinique en phase II, basé sur un vaccin contenant la gB recombinante et l'adjuvant MF59 induit une protection de 50% des femmes vaccinées après une primo-infection au CMV (Pass, 2009; Pass et al., 2009). Ce même vaccin a aussi démontré son efficacité pour protéger des receveurs séronégatifs transplantés avec un organe solide de donneur séropositif (figure 8) (Griffiths et al., 2011). Récemment, Wussow et al. ont développé un candidat vaccin co-exprimant 5 protéines d'enveloppe gH/gL/UL128/UL130/UL131A. Leur étude démontre que ce vaccin induit la production d'anticorps neutralisants permettant de diminuer l'infection chez des macaques (Wussow et al., 2014). Ce vaccin très prometteur devrait prochainement être testé chez l'homme.

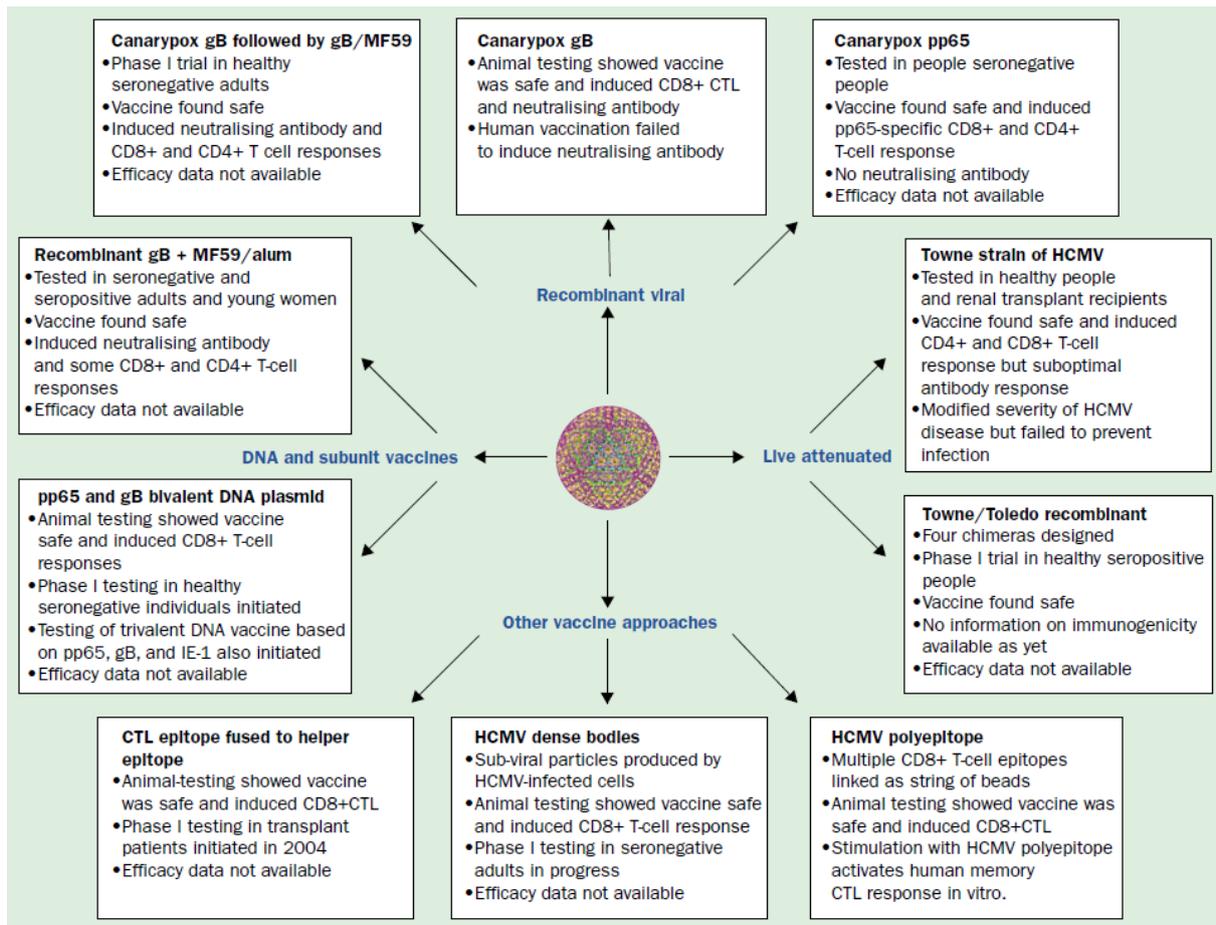


Figure 8

Les différentes stratégies de développement de vaccins anti-CMV

Les trois premières stratégies de développement de vaccin anti-CMV ont été d'utiliser des virus atténués (Towne et/ou Toledo), sous-unitaires ou des vecteurs viraux recombinants (gB et/ou pp65). Récemment, d'autres approches ont vues le jour telles que les « dense bodies » ou encore les polyepitopes (Gandhi and Khanna, 2004).

A l'heure actuelle, aucun traitement ni vaccin n'a montré une protection satisfaisante face à ce virus. Seuls des traitements permettant de diminuer la charge virale sont proposés. Il est nécessaire de mieux connaître ce virus pour être capable de le cibler et l'empêcher de se disséminer dans l'organisme.

2. L'interaction entre le CMV et son hôte

2.1. Le tropisme du CMV

Le tropisme d'un virus est sa capacité à infecter et à effectuer un cycle répliatif dans un type cellulaire particulier. Le CMV peut infecter un grand nombre de types cellulaires : cellules endothéliales, cellules épithéliales, fibroblastes, monocytes, cellules dendritiques, macrophages, cellules nerveuses, cellules musculaires lisses et hépatocytes (Beck et al., 2003; Compton and Feire, 2007; Plachter et al., 1996; Sinzger et al., 2008; Sinzger and Jahn, 1996). Cette particularité fait du CMV un virus capable d'infecter de nombreux tissus et ainsi d'être retrouvé dans la plupart des organes. Ce virus présente deux types majeurs de tropisme :

- fibroblastotrope : il infectera préférentiellement les cellules de type fibroblastique. C'est le cas des souches de laboratoire Towne, Toledo et AD169 ;
- endothéliotrope : il infectera préférentiellement les cellules endothéliales et épithéliales. C'est le cas des souches de laboratoire VHL/E, TB40/E et Merlin. Le terme endothéliotrope englobe les virus leucotropes qui vont avoir la capacité d'infecter préférentiellement des leucocytes comme les DC par exemple.

Ce tropisme différentiel a récemment été imputé au locus UL128L codant pour les trois glycoprotéines : UL128, UL130 et UL131A. Ces trois glycoprotéines forment, en association avec les glycoprotéines gH/gL, le complexe pentamérique (PC). Lorsqu'il est présent au sein de l'enveloppe virale, ce complexe protéique confère au virus un tropisme endothéliotrope (Hahn et al., 2004). En effet, des délétions indépendantes des protéines UL128, UL130 et UL131A d'un virus endothéliotrope induit sa perte d'infectiosité pour les cellules endothéliales. Adler et *al.* ont démontré qu'une particule virale contenait un mix de complexes gH/gL/gO et de PC (Adler and Sinzger, 2009). C'est alors le ratio de ces complexes qui va déterminer le tropisme du virus.

De plus, une variabilité génétique notable est observée entre les souches de CMV de laboratoire (Towne, Merlin, AD169, Toledo) (Bradley et al., 2009). Néanmoins, ces souches de laboratoires diffèrent des souches dites « cliniques ». En effet, une étude démontre qu'après séquençage de la totalité du génome de plusieurs souches, une différence importante a été remarquée entre les souches de laboratoires et les souches cliniques. Bien que démontrant près de 98% de séquences identiques, les souches cliniques codent au minimum 19 gènes supplémentaires à la souche de laboratoire AD169. Ces gènes ont sûrement été inactivés dans la souche de laboratoire par de nombreuses délétions et réarrangements lors des passages en culture *in vitro* (Cha et al., 1996). Une étude de Dargan et *al.* démontre que le CMV s'adapte à la culture cellulaire et va muter au cours des passages répétés en culture *in vitro*. En cultivant quatre souches cliniques sur des cellules

endothéliales, des cellules épithéliales et des fibroblastes, des mutations aux régions RL13 et UL145-UL140 vont être observées pour toutes les souches cliniques. En contrepartie, le locus UL128L n'est muté que lorsque les souches cliniques sont cultivées sur fibroblastes (après 20 passages), leur faisant ainsi perdre leur tropisme endothéliotrope (Dargan et al., 2010; Hahn et al., 2004; Stanton et al., 2010).

La variabilité du CMV serait alors en partie due à des phénomènes de recombinaison, déjà démontrés *in vitro* mais aussi *in vivo* et facilités par les infections multiples et simultanées chez un même patient (Faure-Della Corte et al., 2010; Haberland et al., 1999).

Il est possible qu'au sein d'une population, les souches de CMV soient variées. Le terme de quasi-espèce pour parler du CMV n'a été employé que très récemment et est encore sujet à débat. La notion de quasi-espèces virales a été définie comme étant la distribution dynamique de génomes soumis à une variation génétique, à la concurrence et à la sélection, et agissant comme une unité de sélection (Lauring and Andino, 2010; Ojosnegros et al., 2010).

2.2. Inoculation du CMV

Le CMV va pouvoir infecter (ou ré-infecter) un individu soit par voie naturelle soit par voie iatrogène (ou médicale), le mettant en contact avec différents tissus.

La transmission par voie naturelle peut être horizontale ou verticale. La transmission horizontale s'effectue *via* un contact direct avec des fluides corporels de personnes infectées (salive, urines, larmes, sang, sperme...) et ne peut avoir lieu par aérosol. Les deux types d'expositions les plus importants sont l'activité sexuelle et le contact avec des enfants (Coonrod et al., 1998; Murph et al., 1986). L'infection est plus répandue chez les enfants mis en crèche ainsi qu'au début de la vie sexuelle des adolescents. Dans le cas de la transmission horizontale, le virus entrera alors en contact avec les muqueuses oro-pharyngées ou ano-génitales.

La transmission verticale fait référence aux infections congénitales. Elle peut s'effectuer de façon *trans*-placentaire au cours de la gestation, lors du passage par les voies génitales (si le virus est présent dans le tractus génital lors de l'accouchement) ou encore par le lait maternel (Dworsky et al., 1983; Reynolds et al., 1973). L'infection du fœtus implique une infection préexistante chez la mère, une réinfection ou une séroconversion durant la grossesse (Boppana et al., 2001). Dans certains cas de transmissions horizontales, le virus entrera en contact avec les muqueuses oro-pharyngées (lait maternel) (figure 9).

La transmission par voie iatrogène est due principalement à l'augmentation de l'activité de transplantation dans les pays développés, l'organe transplanté pouvant provenir d'un donneur séropositif. L'immunosuppression nécessaire au maintien du greffon est aussi responsable de la réactivation du virus latent. Les risques de réactivations virales et de maladies à CMV suite à une transplantation sont encore plus importants voire systématiques lorsque le donneur est séropositif et le receveur séronégatif (D+/R-) (figure 9) (Lowance et al., 1999).

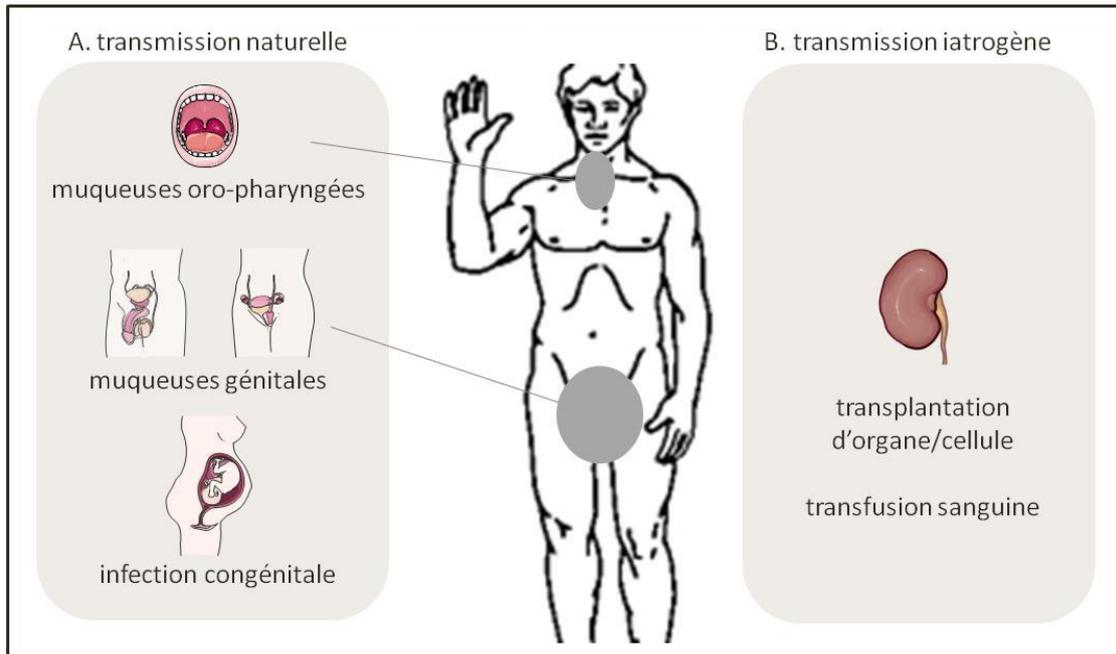


Figure 9

Les voies de transmission du CMV

(A) Le CMV peut être transmis par voie naturelle. C'est par les fluides corporels que le virus entre en contact avec les muqueuses oraux-pharyngales ou les muqueuses génitales. Il peut aussi passer de la mère au fœtus *via* le placenta. (B) Le CMV peut être transmis par voie iatrogène lors d'une transplantation d'organe ou d'une transfusion sanguine.

Lors d'une infection par le CMV, dépendamment de son tropisme, il pourra infecter certains types cellulaires. Le CMV peut entrer dans son hôte par plusieurs voies, le mettant en contact avec différents types de cellules selon la voie d'entrée. Les cellules des muqueuses ont une position clé puisqu'elles marquent la frontière entre l'organisme et l'environnement extérieur, notamment, lors d'infection naturelle par les fluides corporels. Elles jouent ainsi un rôle primordial dans la dissémination du virus car elles interviennent lors des phases de pénétration et d'excrétion du virus. Certaines cellules retrouvées dans cette muqueuse, telles que les cellules dendritiques myéloïdes, pourraient disséminer le virus dans les tissus.

2.2.1. Les cellules dendritiques

2.2.1.1. Généralités

Les cellules dendritiques ont été décrites pour la première fois au niveau de l'épiderme par Paul Langerhans en 1868. Près d'un siècle plus tard, au cours des années 1970, l'identification de cellules dendritiques (DC) dans la rate de souris par Steinman et Cohn a relancé la recherche sur ce type cellulaire (Steinman et al., 1975; Steinman and Cohn, 1973; Steinman et al., 1974). Ces cellules doivent leur nom aux nombreux prolongements, semblables aux dendrites des neurones, qui leur donnent leur forme étoilée. Elles représentent 1 à 3% des cellules de la peau et des muqueuses et moins de 1% des leucocytes circulants. Ces cellules sont aussi appelées « sentinelles » de l'organisme. En effet, les DC font partie des cellules présentatrices d'antigènes (APC), par conséquent elles sont essentielles dans la mise en place de la réponse immunitaire (Banchereau and Steinman, 1998).

Les DC constituent une population hétérogène de leucocytes d'origine hématopoïétique. Il existe plusieurs sous-types de DC se distinguant par leur morphologie, leur fonction et leur localisation (Banchereau et al., 2000; Lundberg et al., 2013; Shortman and Naik, 2007; Villadangos and Schnorrer, 2007). Chez l'homme, elles sont classées en deux sous-types :

- les DC plasmacytoïdes (pDC)
- les DC myéloïdes (mDC) ou DC conventionnelles (cDC)

Les pDC qui sortent du cadre d'étude ne seront pas décrites. Les DC myéloïdes, dont certaines expriment à leur surface DC-SIGN, la protéine d'intérêt sur laquelle repose un des axes de cette thèse, seront abordées avec plus de détails.

2.2.1.2. Les cellules dendritiques myéloïdes

Les mDC sanguines et tissulaires se caractérisent par l'expression du marqueur CD11c ainsi que des marqueurs BDCA-1 et BDCA-3. Le microenvironnement du tissu dans lequel elles résident semble avoir un impact majeur sur la différenciation terminale de ces cellules. On distingue deux sous-groupes de mDC dans les tissus périphériques tels que la peau, les muqueuses ou les tissus lymphoïdes (ganglions, etc...):

- les DC interstitielles,
- les cellules de Langerhans (LC).

Dans la peau, on retrouve les DC interstitielles dans le derme (appelées dans ce cas des DC dermiques) et les LC dans l'épiderme. Dans les muqueuses, les DC interstitielles vont être retrouvées dans la *lamina propria* et les LC dans l'épithélium stratifié (figure 10).

Une partie des DC interstitielles sont caractérisées par l'expression de la lectine DC-SIGN (figure 10). Les LC se distinguent des autres DC par l'expression de la langérine ainsi que par des vésicules intracytoplasmiques caractéristiques ayant une structure particulière en « raquette de tennis » ou zip: les granules de Birbeck (figure 10 et 11) (Romani et al., 2010; Stossel et al., 1990; Valladeau et al., 2000). Ces cellules expriment également l'E-cadhérine et EpCAM qui leur permettent d'adhérer aux kératinocytes par des liaisons homo- ou hétérotypiques (Tang et al., 1993). Les LC vont former un réseau dense à l'aide de leurs dendrites au niveau de l'épiderme de la peau ou de l'épithélium des muqueuses.

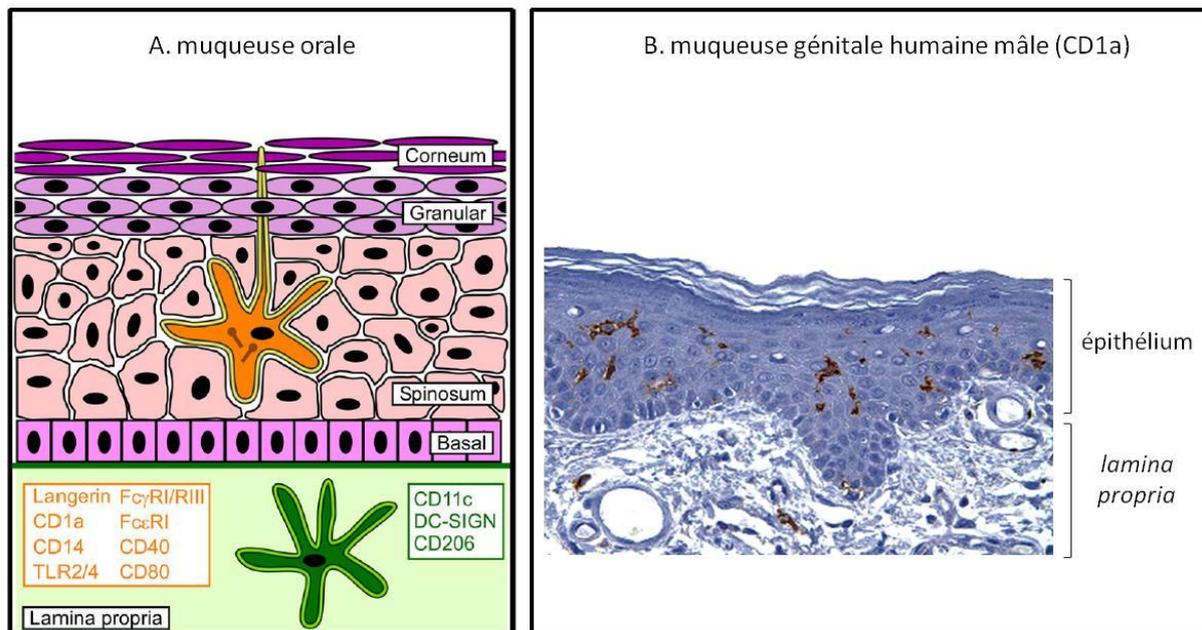


Figure 10

Les cellules dendritiques myéloïdes de la muqueuse orale et génitale humaine

(A) La muqueuse orale est composée d'un épithélium stratifié (violet/rose) attaché à la *lamina propria* (zone verte) via une membrane basale (ligne vert). Les LC (orange) sont le seul type de DC retrouvé dans l'épithélium de la muqueuse orale. Elles sont reconnaissables par la présence de granules de Birbeck (clou noir) et par l'expression des marqueurs de surfaces listés en orange. Contrairement aux LC de la peau, les LC de la muqueuse orale vont étendre les dendrites pour atteindre la surface de l'épithélium et entrer en contact direct avec les microorganismes externes. Les LC vont alors être les premières cellules de l'immunité à rencontrer des pathogènes, tels que le CMV, qui peuvent entrer par la cavité orale. Les DC myéloïdes (vertes) sont retrouvées dans la *lamina propria* et sont caractérisées par l'expression de marqueurs de surfaces listés en

vert. La représentation de l'épithélium n'est pas à l'échelle (Hertel, 2014). (B) Marquage d'une muqueuse génitale humaine mâle (CD1a). L'image représente un marquage de muqueuse génitale humaine montrant l'épithélium (couche supérieure) et la *lamina propria* (couche inférieure). Le marquage CD1a (en marron) permet d'observer les cellules dendritiques myéloïdes de la muqueuse. Les cellules CD1a de l'épithélium sont des cellules de Langerhans et les cellules CD1a de la *lamina propria* sont des cellules dendritiques interstitielles (d'après Velasquez et *al.*, Histology for Pathologists, 3rd Edition. Copyright 2007, Lippincott Williams & Wilkins).

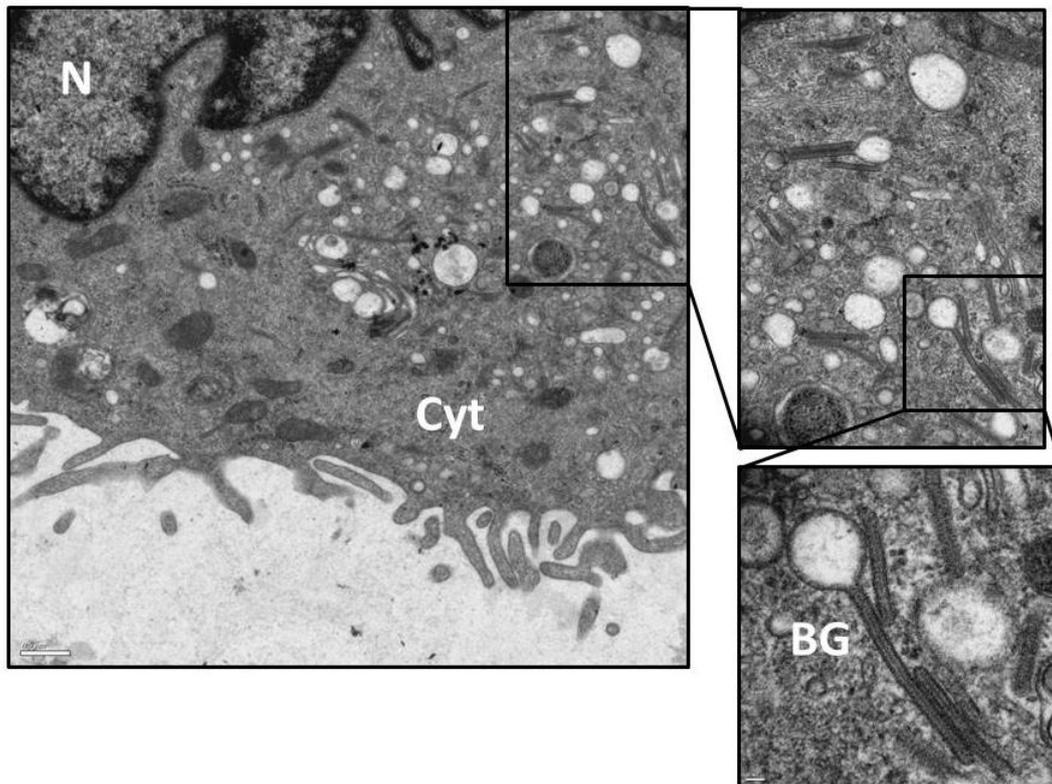


Figure 11

Granules de Birbeck

Image prise par microscopie électronique à transmission (MET) de cellules de Langerhans contenant des granules de Birbeck. Ces granules ont une structure caractéristique dite en forme « de raquette de tennis ». Le diamètre de la tige est d'environ 50 nm. N : noyau, Cyt : cytoplasme et BG : Granule de Birbeck (P. Pilet & F. Halary; TEM facility, SFR Bonamy, Nantes).

Du fait de leur localisation, les DC interstitielles et les LC vont être les premières cellules de l'immunité à rencontrer des agents pathogènes. Elles vont alors jouer un rôle de « sentinelles » capables d'alerter le système immunitaire. Ces cellules sont capables de reconnaître toutes sortes de pathogènes tels que des virus, des bactéries ou encore des champignons. Il a été démontré, *in vitro*, que les DC et LC sont susceptibles à l'infection par le CMV (Beck et al., 2003; Hertel et al., 2003; Riegler et al., 2000). Elles vont avoir un rôle pivot dans la réponse immunitaire anti-CMV puisqu'elles

sont essentielles à la mise en place de la réponse adaptative. Ces DC myéloïdes après avoir reconnu l'antigène, sont capables de migrer à partir des tissus périphériques vers les ganglions où elles présentent alors un phénotype mature (Villadangos et al., 2005). La fonction de ces DC est la présentation d'antigènes. Elle consiste en l'internalisation d'antigènes, leurs dégradations puis leurs présentations *via* les molécules du CMH aux LT CD4⁺ et CD8⁺ afin de les stimuler et de les orienter vers une réponse spécifique adaptée.

Il est possible de générer *in vitro* des cellules équivalentes aux mDC de type inflammatoire (infDC) à partir de monocytes cultivés avec le cocktail de cytokines : GM-CSF et IL-4. Les cellules obtenues sont appelées cellules dendritiques dérivées de monocytes ou MDDC pour « Monocyte-derived dendritic cells » (Lundberg et al., 2013; Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Elles sont caractérisées par l'expression des marqueurs : HLA-DR, CD11c, BDCA1, CD1a, FcεRI, CD206, CD172a, CD14 et CD11b (Segura et al., 2013). Ces cellules générées *in vitro*, les MDDC, ont été utilisées dans diverses expériences réalisées au cours de cette thèse.

2.3.L'entrée du virus dans sa cellule hôte

Le CMV peut infecter un grand nombre de cellules de types différents. Il n'existe pas de récepteur au CMV clairement identifié, suggérant que ce virus peut interagir avec divers récepteurs (Compton and Feire, 2007). Les récepteurs ayant été décrits comme pouvant interagir avec le CMV sont :

- la β2-microglobuline (β2m) (McKeating et al., 1986),
- HLA-B27 (Beersma et al., 1992),
- les héparanes sulfates (HSPG) (Boyle and Compton, 1998; Compton et al., 1992),
- CD13 (Giugni et al., 1996; Soderberg et al., 1993),
- l'annexin II (Pietropaolo and Compton, 1997; Wright et al., 1995; Wright et al., 1994),
- DC-SIGN (Halary et al., 2002),
- TLR-2 (Boehme et al., 2006; Compton et al., 2003),
- les intégrines α1/α3 (Feire et al., 2004; Wang et al., 2005),
- le récepteur au facteur de croissance des plaquettes (PDGFRα) (Soroceanu et al., 2008; Vanarsdall et al., 2012).

Le récepteur à l'EGF (EGFR) a aussi été décrit comme pouvant interagir avec le CMV (Wang et al., 2003) mais il a été démontré par la suite que ce récepteur n'est pas important pour l'entrée du virus dans sa cellule hôte (Isaacson et al., 2007).

Les récepteurs cités précédemment peuvent être soit exprimés par de nombreux types cellulaires, soit être spécifiques d'un seul type cellulaire. Parmi eux, les intégrines semblent être les plus

pertinentes (notamment dû au grand nombre de types cellulaires les exprimant). Néanmoins, d'autres récepteurs au CMV peuvent être nécessaires tels que des membres des familles des TLR et des CRL. Les TLR et les CRL sont des familles de récepteurs se liant spécifiquement aux différentes classes de pathogènes et permettent la capture des antigènes. La reconnaissance de virus fait intervenir plus particulièrement le TLR-2 au moment de l'entrée du virus notamment par sa fixation à la gB et la gH d'enveloppe du CMV (Boehme et al., 2006; Compton et al., 2003). Un membre des CLR, DC-SIGN, interagit avec le CMV *via* la gB (Halary et al., 2002). Cette lectine peut être considérée comme un récepteur d'accrochage spécifique des DC et des macrophages.

Malgré le nombre important de récepteurs décrits, les étapes initiales d'attachement et de pénétration du virus dans sa cellule hôte ne sont pas complètement connues. En effet, le mécanisme d'entrée du CMV varie selon le type cellulaire ciblé. L'entrée du virus dans les fibroblastes se fait par fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire (Compton et al., 1992) alors que l'entrée du virus dans les cellules endothéliales ou épithéliales se fait par endocytose (Ryckman et al., 2006). De plus, notre équipe a démontré que le CMV peut entrer dans les MDDC par macropinocytose, une forme particulière d'endocytose compatible avec l'entrée de particules d'une taille supérieure à 80-100nm (Haspot et al., 2012).

Un des modèles d'entrée du virus dans sa cellule hôte a été proposé par Teresa Compton (Compton, 2004) et illustré dans la figure 12. Ce modèle est restreint à l'entrée du CMV par fusion dans un fibroblaste (et n'est pas valable pour l'entrée du virus dans des cellules épithéliales ou endothéliales).

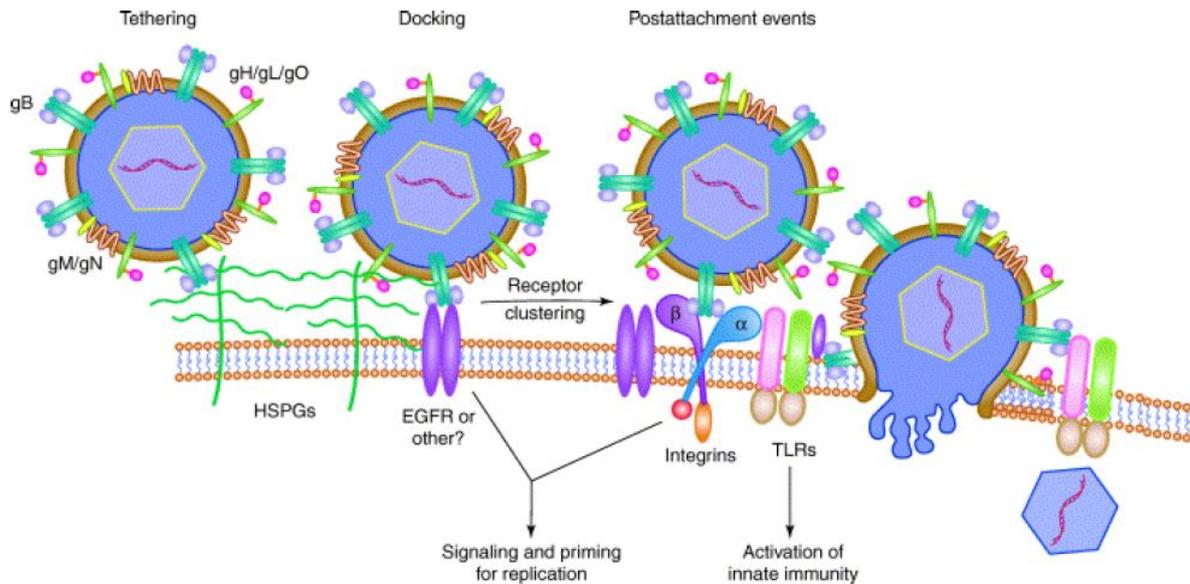


Figure 12

Modèle d'entrée du CMV par fusion dans sa cellule hôte

Le modèle d'entrée du virus par fusion fait intervenir différentes protéines. La gB, gM/gN et gH/gL/gO pour le virus et les HSPG, l'EGFR et les intégrines pour la cellule hôte. Après la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire, la capside sera relarguée dans le cytoplasme de la cellule infectée (Compton, 2004).

Depuis, ce modèle a évolué avec la mise en évidence de nouveaux acteurs impliqués dans ce processus. L'entrée du CMV commence par des interactions de basse affinité entre les molécules d'héparane sulfates (HSPG) de la cellule et les glycoprotéines gM ou gB de l'enveloppe virale (Boyle and Compton, 1998). Cependant, bien que strictement requises, ces interactions ne sont pas suffisantes pour l'infection. Le CMV engage alors le PDGFR et les intégrines cellulaires, probablement à travers leur interaction avec la gB (Feire et al., 2004; Soroceanu et al., 2008; Wang et al., 2005). Le récepteur à l'EGF (EGFR) a été initialement décrit comme étant nécessaire (Compton, 2004; Wang et al., 2003) mais ensuite comme n'étant pas important dans le processus d'entrée du CMV (Isaacson et al., 2007). L'entrée du virus doit être suivie de l'intervention du complexe gH/gL. Il existe différents complexes gH/gL facilitant l'entrée du virus dans les fibroblastes, les cellules épithéliales ou les cellules endothéliales. L'entrée du CMV dans les fibroblastes requiert l'intervention de l'hétérodimère gH/gL alors que l'entrée dans les cellules épithéliales et endothéliales requiert l'intervention du complexe pentamérique gH/gL/UL128/UL130/UL131A (ou gH/gL/UL128-131) en plus du complexe gH/gL (figure 13) (Adler and Sinzger, 2009; Ryckman et al., 2006; Wille et al., 2010). Dans le cas de l'entrée du CMV dans les fibroblastes, suite à l'interaction des ligands du CMV avec ces récepteurs, l'enveloppe virale peut fusionner avec la membrane cellulaire. Ce processus est médié par la gB et le complexe gH/gL (Cranage et al., 1986; Urban et al., 1996). Ces glycoprotéines ont été

décrites comme étant nécessaires et suffisantes pour la fusion. Elles constituent le centre de fusion (« core fusion machinery ») du CMV qui est indispensable pour la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire (Vanarsdall et al., 2008). Une étude utilisant des virus mutés pour la gH (CMV gH_null) a démontré que l'absence de cette glycoprotéine ne perturbait pas l'assemblage de l'enveloppe mais qu'en revanche la particule virale ne pouvait pas entrer dans la cellule hôte. Les mutants CMV gL-null sont eux défectueux pour l'entrée du virus. De plus, ce complexe a besoin d'un troisième partenaire, la gO qui est une protéine chaperonne. Ce centre de fusion est bien conservé parmi les herpesvirus (Eisenberg et al., 2012). Néanmoins son mécanisme précis n'a pas encore été défini. Après avoir fusionné avec la membrane cellulaire, le virus pourra libérer sa capside dans le cytoplasme de la cellule infectée.

Dans le cas de virus contenant le complexe pentamérique, l'entrée se fera par endocytose de la particule virale.

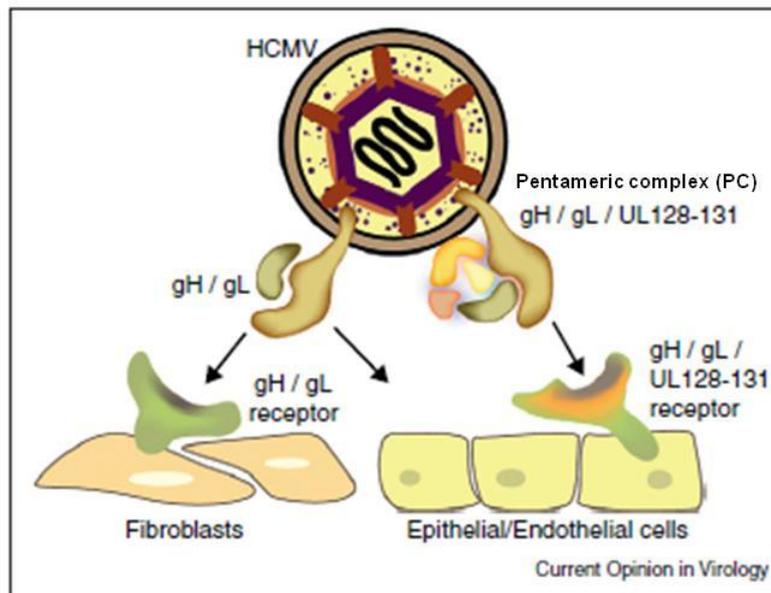


Figure 13

Interaction du CMV avec ces récepteurs *via* les complexes gH/gL et le complexe pentamérique

Le complexe gH/gL est nécessaire pour l'entrée du virus dans les fibroblastes. Le complexe pentamérique gH/gL/UL128/UL130/UL131A (ou gH/gL/UL128-131) est nécessaire pour l'entrée du virus dans les cellules épithéliales et endothéliales (d'après Vanarsdall and Johnson, 2012).

Bien que le complexe gH/gL et le complexe pentamérique aient été définis comme ayant un rôle crucial dans l'entrée du virus dans sa cellule hôte, aucun récepteur ne leur a été attribué pour le moment.

Un des buts de cette thèse a été de clarifier les modalités d'interaction de la gB du CMV, en déterminant les domaines participant à la fixation de cette glycoprotéine à son récepteur.

2.4. Le rôle de la gB

La gB est retrouvée en grande quantité dans l'enveloppe virale et est impliquée dans l'entrée du virus dans sa cellule hôte. De plus, c'est une des glycoprotéines d'enveloppe du CMV majoritairement reconnue par le système immunitaire. Cette reconnaissance se traduit par la production d'anticorps anti-gB permettant de neutraliser l'infection dans certains cas. La gB sous forme recombinante, associée à l'adjuvant MF59, est en phase II de test clinique comme candidat pour la vaccination. Cette gB recombinante a été utilisée dans diverses expériences réalisées au cours de cette thèse.

2.4.1. Structure et fonction

Le gène UL55 code pour la gB du CMV. C'est une glycoprotéine de 904 acides aminés et d'environ 130kDa. Elle est composée de deux sous-unités reliées entre-elles par un pont disulfure : gp55 et gp116. La sous-unité gp55 est formée de la partie cytoplasmique et est ancrée dans l'enveloppe virale (Britt and Auger, 1986; Britt and Vugler, 1992; Cranage et al., 1986). La sous-unité gp116 se situe vers l'extérieur de la particule virale.

Les glycoprotéines B des virus de la famille des *Herpesviridae* présentent un certain niveau d'homologie au niveau protéique. La première à avoir été étudiée pour sa structure tridimensionnelle est la gB du HSV-1 (un virus de la sous-famille des *alpha-herpesvirinae*) (tableau 1). Heldwein et al. ont résolu la structure tridimensionnelle de l'ectodomaine de la gB du HSV-1 par microscopie électronique (figure 14) (Heldwein et al., 2006; Patrone et al., 2014). À partir de ces données, un modèle tridimensionnel de la gB du CMV a été généré par Potzsh et al. (figure 15) (Potzsch et al., 2011; Sharma et al., 2013).

La gB du CMV est constituée de cinq domaines allant de dom-I à dom-V ou de AD-1 à AD-5 (pour Antigenic Domains) selon le système de dénomination. Le domaine AD-1 comprend les AA 560-640, le domaine AD-2 comprend les AA 50-77, le domaine AD-3 correspond à une partie intraparticulaire de la gB, le domaine AD-4 comprend les AA 121-132 et AA 344-438 et le domaine AD-5 comprend les AA 133-343 (Potzsch et al., 2011). Parmi ces domaines, on retrouve un site de clivage par la furine (endoprotéases) aux résidus AA 460-461 qui permet de cliver le précurseur de la gB (160 kDa) en deux sous-unités gp55 et gp116 (130 kDa) (Vey et al., 1995). La gB contient aussi un motif de liaison aux intégrines (disintegrin-like domain) aux résidus AA 92-111 (Feire et al., 2004) (figure 15).

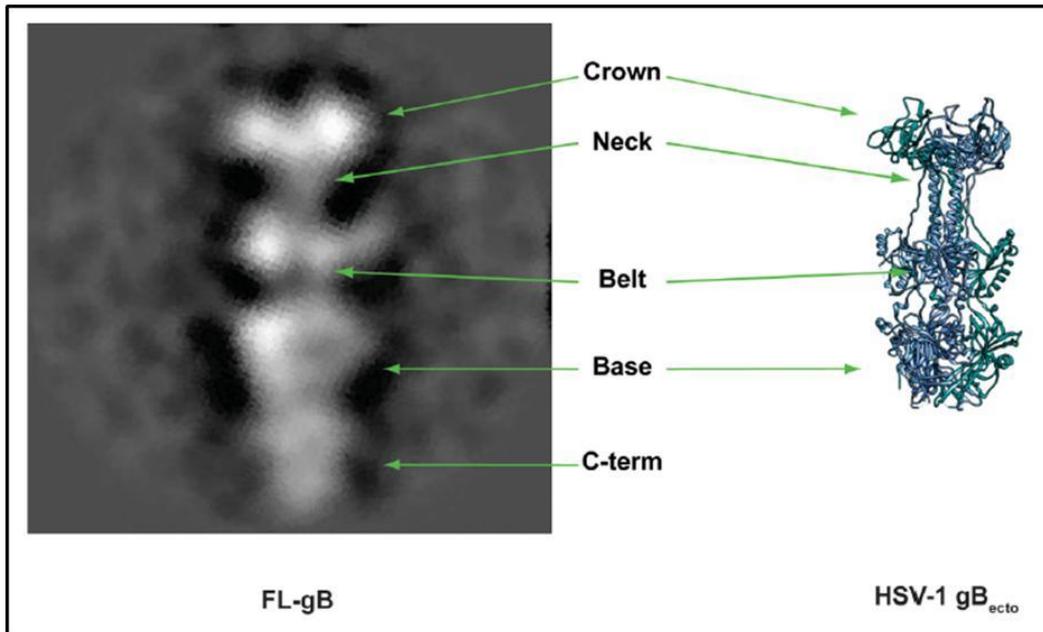


Figure 14

Modèle tridimensionnel de l'ectodomaine de la gB du HSV-1 sous sa forme trimérique

La structure de la gB du HSV-1 (gauche) a permis de générer un modèle tridimensionnel de l'ectotrimère de cette gB (droite). La gB sous sa forme entière (Full Length-gB) est en conformation « post-fusion », l'image a été prise par microscopie électronique en contraste négatif (gauche) (Patrone et al., 2014).

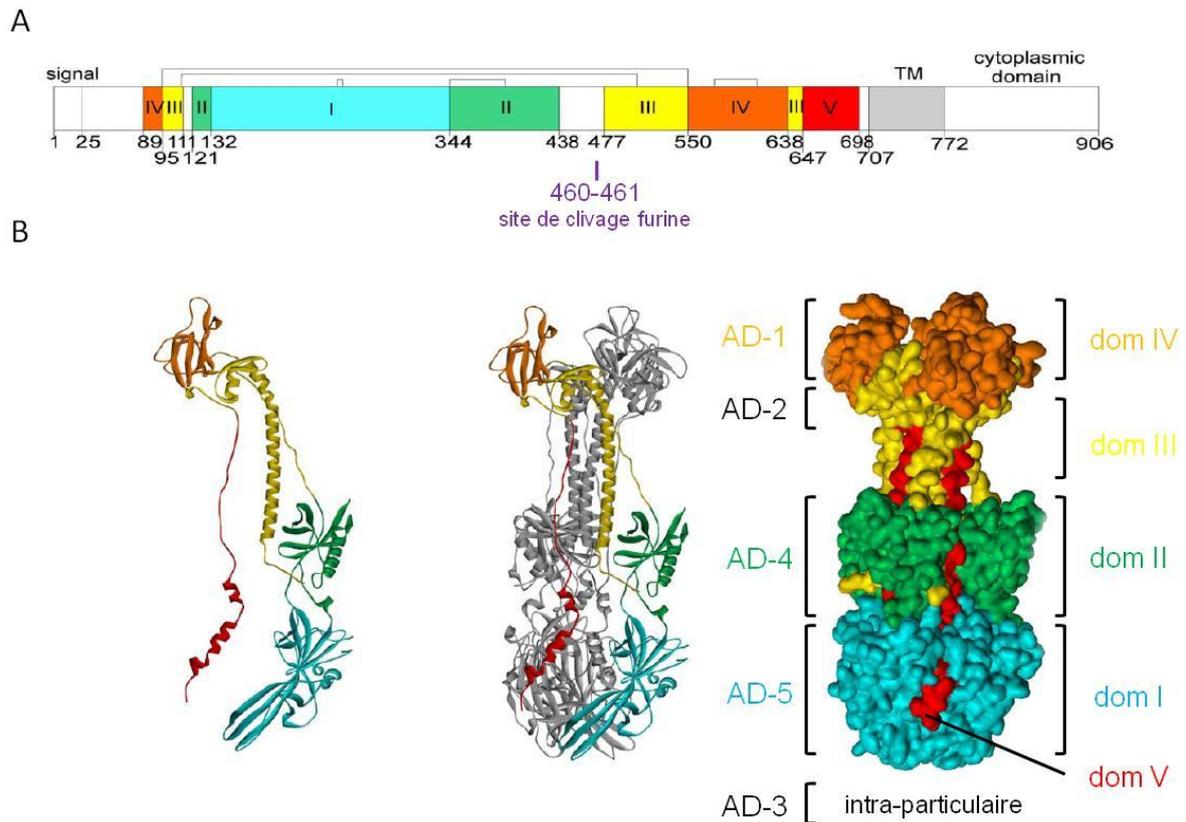


Figure 15

Domaines architecturaux de la gB du CMV

(A) Représentation de la séquence d'acides aminés de la gB du CMV. Chaque domaine a une couleur particulière et le début de chaque domaine est indiqué par son premier résidu (en bas). Le domaine I est représenté en bleu, le domaine II en vert, le domaine III en jaune, le domaine IV en orange et le domaine V en rouge. Les zones blanches sont des parties n'ayant pas pu être modélisées. Les parenthèses représentent des ponts disulfures (en haut). (B) La gB est représentée sous sa forme monomérique (gauche), protomérique (milieu) et trimérique (droite). Les séquences ont été colorées en accord avec (A). Les deux systèmes de dénomination de la gB sont indiqués sur le trimère : à gauche, les domaines antigéniques (AD) allant de AD-1 à AD-5 et à droite, les domaines allant de dom-I à dom-V (d'après Potzsch et al., 2011).

Les travaux de modélisation des gB démontrent que la gB du CMV sous forme monomérique et l'organisation de cette sous-unité en trimère sont fortement similaires aux structures de la gB du HSV-1. Ces gB ont été décrites comme étant présentées sous forme de trimère et en conformation « post-fusion » en solution.

La gB du CMV a été récemment décrite comme étant une protéine de fusion (Wille et al., 2013). D'autres gB d'herpesvirus telles que la gB du HSV-1 et la gB de l'EBV ont la même propriété fusogène. Elles font toutes les trois parties des protéines virales de fusion de classe III, confirmant la forte similitude entre les gB des herpesvirus (Harrison, 2008; Steven and Spear, 2006).

Pour délivrer son matériel génétique dans sa cellule hôte, le virus va devoir fusionner son enveloppe avec la membrane lipidique de sa cellule hôte. Le processus de fusion des herpesvirus est complexe et requiert l'action de trois glycoprotéines : la gB et le complexe gH/gL. Le mécanisme d'entrée le mieux étudié parmi les herpesvirus est celui du HSV-1 (figure 16) (Eisenberg et al., 2012; Heldwein, 2009). Durant ce processus, les glycoprotéines d'enveloppe vont passer par différentes conformations allant, pour la gB, de la conformation « pré-fusion » à la conformation « post-fusion » (ou inversement) (figure 17) (Heldwein et al., 2006).

En plus de son rôle dans la fusion avec la membrane cellulaire, la gB a été décrite pour participer à l'attachement aux récepteurs cellulaires (Compton, 2004). L'utilisation d'anticorps neutralisants dirigés contre la gB peut inhiber l'attachement et la fusion virus/cellules (Gicklhorn et al., 2003). Mais cela reste controversé car certaines études démontrent qu'elle est uniquement impliquée dans la fusion (Isaacson and Compton, 2009; Navarro et al., 1992).

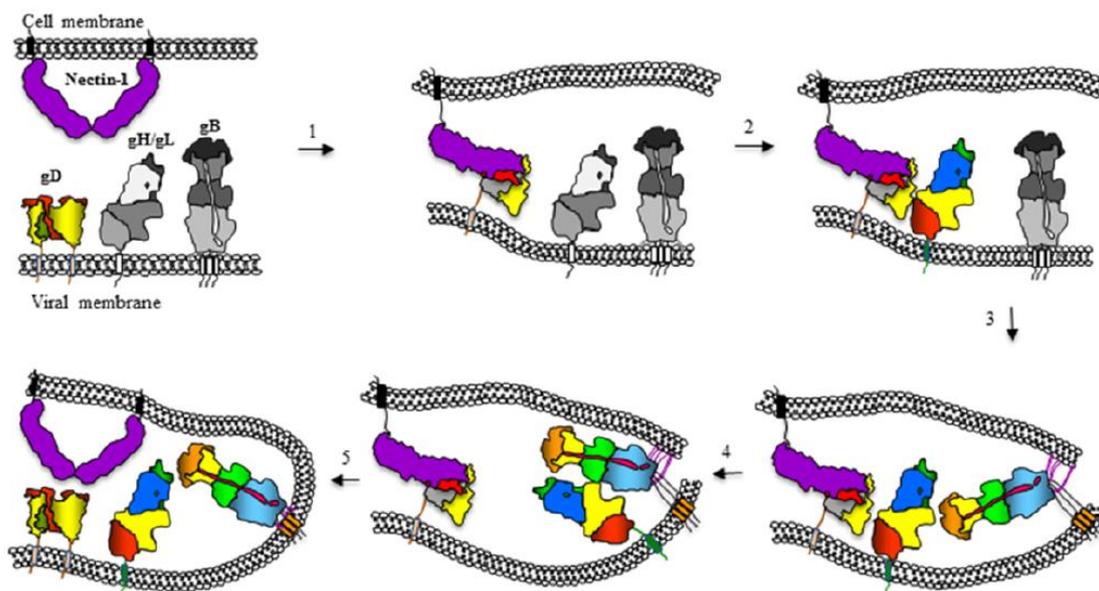


Figure 16

Représentation schématique des événements séquentiels permettant l'entrée du HSV

Le processus d'entrée débute par l'interaction de la gD avec son récepteur (nectine-1, en violet) (étape 1). Cette interaction provoque le déplacement de la partie C-terminale de la gD qui exposerait une région auparavant cachée de la gD, pouvant interagir avec le complexe gH/gL (étape 2). Cette interaction provoque un changement de conformation du complexe gH/gL qui lui permet de faire entrer la gB en stade fusogène. À ce stade, la gB entrerait en contact avec des protéines cellulaires *via* sa boucle de fusion (étape 3) tout en interagissant avec le complexe gH/gL (étape 4). La gB passe de la forme « pré-fusion » à la forme « post-fusion » résultant à la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire et délivrant la nucléocapside dans la cellule hôte (étape 5) (Eisenberg et al., 2012).

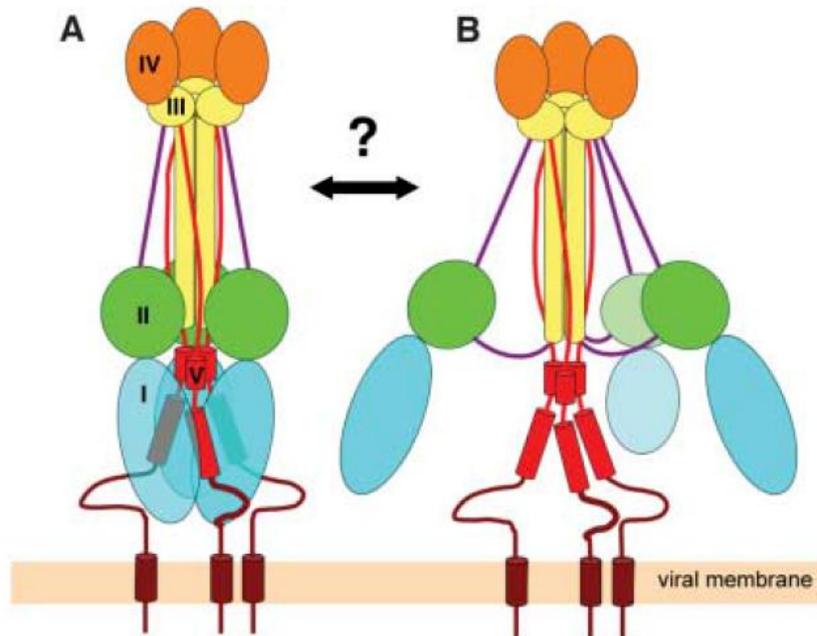


Figure 17

Représentation schématique de la gB du HSV-1 illustrant ses possibles différentes conformations

L'enveloppe virale est représentée en saumon. Le domaine transmembranaire est représenté par des cylindres marron. Le domaine I est représenté en bleu, le domaine II en vert, le domaine III en jaune, le domaine IV en orange et le domaine V en rouge. Les liaisons entre le domaine I et II (en violet) pourraient permettre une large amplitude de rotation. La gB est représentée sous deux formes (A) et (B). Ces deux structures peuvent représenter le point de départ ou le point final de la translocation. Elles peuvent représenter la gB sous forme « pré-fusion » ou « post-fusion » (double flèche). Autrement dit, il n'est pas encore défini qui du modèle (A) et (B) représente la gB sous forme « pré-fusion » et sous forme « post-fusion » (Heldwein et al., 2006).

2.4.2. Récepteurs de la gB

L'entrée du virus dans sa cellule hôte est un processus complexe faisant intervenir un ensemble d'interactions protéiques. De plus, le CMV peut infecter un large panel de cellules et n'est pas spécifique d'un seul récepteur. La gB n'est, elle non plus, pas spécifique d'un récepteur. En effet, elle peut interagir avec :

- l'annexin II (Pietropaolo and Compton, 1997),
- les HSPG (Boyle and Compton, 1998),
- DC-SIGN (Halary et al., 2002),
- TLR-2 (Boehme et al., 2006),
- le PDGFRa (Soroceanu et al., 2008).

Ceux-ci peuvent être soit exprimés par de nombreux types cellulaires ou soit être spécifiques d'un seul type de cellule.

2.4.3. Sites de N-glycosylations

La gB est produite et assemblée au sein de la cellule infectée par le CMV. Elle va alors « profiter » de la machinerie cellulaire pour être synthétisée. Elle va aussi tirer profit des modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation. On distingue différents types de glycosylation:

- les liaisons N-glycosidiques,
- les liaisons O-glycosidiques,
- les liaisons C-glycosidiques,
- les liaisons P-glycosidiques.

Les principaux types de glycosylation restent la N- et la O-glycosylation. Une même protéine peut porter à la fois des structures N- et O-glycaniques. La glycosylation s'effectue en des positions déterminées de la séquence d'acides aminés, en nombres et en structures très variables d'une protéine à l'autre. Ainsi, une même protéine peut exister sous plusieurs isoformes, aussi appelées "glycoformes". De plus, les structures des glycanes à la surface des protéines sont très variées car elles sont spécifiques de chaque espèce et, pour une espèce donnée, de chaque type cellulaire.

Au cours de cette thèse, les N-glycanes de la gB ont été le type de glycane principalement étudié et seront alors abordés avec plus de détails.

Le précurseur de la gB est formé dans le réticulum endoplasmique. C'est dans cet organelle que la N-glycosylation débute par le transfert d'un tétradécasaccharidique tri-antenné (de structure Glc3Man9GlcNAc2) sur un résidu asparagine de la gB en cours de synthèse, comme sur toutes les glycoprotéines cellulaires, par l'action d'un complexe enzymatique appelé oligosaccharyltransférase (OST) (Hubbard and Ivatt, 1981). Le site de N-glycosylation correspond au résidu asparagine (Asn) qui est situé dans une séquence consensus constituée du tripeptide Asn-X-Ser/Thr, où X peut être n'importe quel acide aminé excepté la proline (Gavel and von Heijne, 1990). Dès que l'oligosaccharide a été transféré sur le résidu asparagine de la protéine en cours de synthèse dans le réticulum endoplasmique, les trois résidus glucose en bout de chaîne et un résidu mannose sont éliminés par l'action des glycosides hydrolases correspondantes. La structure Glc3 se comporte comme un signal indiquant que le précurseur est prêt pour le transfert. Son hydrolyse avertit ensuite de la fin du transfert et déclenche le début de la migration vers l'appareil de Golgi. C'est dans cet appareil que la gB va subir un processus de maturation des N-glycanes (modifications de la structure oligosaccharidique) qui diffère selon le compartiment du Golgi et qui aboutit à une glycosylation terminale (par opposition à la glycosylation primaire ayant lieu dans le réticulum endoplasmique). Parmi ces modifications, on trouve l'hydrolyse de résidus mannose, l'addition d'autres monosaccharides (N-acétylglucosamine, galactose, fucose) et l'addition d'acides sialiques en dernier s'il y a lieu. Cette maturation est complexe et met en jeu une batterie d'au moins 8 à 10 enzymes (glycosyltransférases et glycosides hydrolases) (figure 18). Chez les mammifères, la maturation des N-glycoprotéines dans l'appareil de Golgi conduit à la synthèse de trois principaux types d'oligosaccharides (figure 19):

- les N-glycanes de type oligomannosidique,
- les N-glycanes de type hybride,
- les N-glycanes de type complexe.

Les N-glycanes de type oligomannosidique contiennent presque uniquement des résidus mannoses. Les N-glycanes de type hybride possèdent généralement les caractéristiques des N-glycanes de type oligomannosidique sur la branche Man(α 1-6) et des N-glycanes de type complexe sur la branche Man(α 1-3). Les N-glycanes de type complexe contiennent, en plus du noyau pentasaccharidique commun à toutes les N-glycoprotéines, des résidus galactose et N-acétylglucosamine et peuvent posséder à leurs extrémités des N-acétylgalactosamines, fucose et/ou des acides sialiques toujours en positions terminales. Ces N-glycanes peuvent exister sous la forme de structures bi-, tri-, tetra- ou penta-antennées.

C'est lors de son passage dans le Golgi que le précurseur de la gB de 160 kDa sera clivé par des endoprotéases au site furine (AA 460-461) en un produit de 116 kDa et un produit de 58 kDa pour donner un hétérodimère lié par un pont disulfure (Britt and Vugler, 1989; Vey et al., 1995). La gB sera ensuite assemblée au sein de l'enveloppe virale.

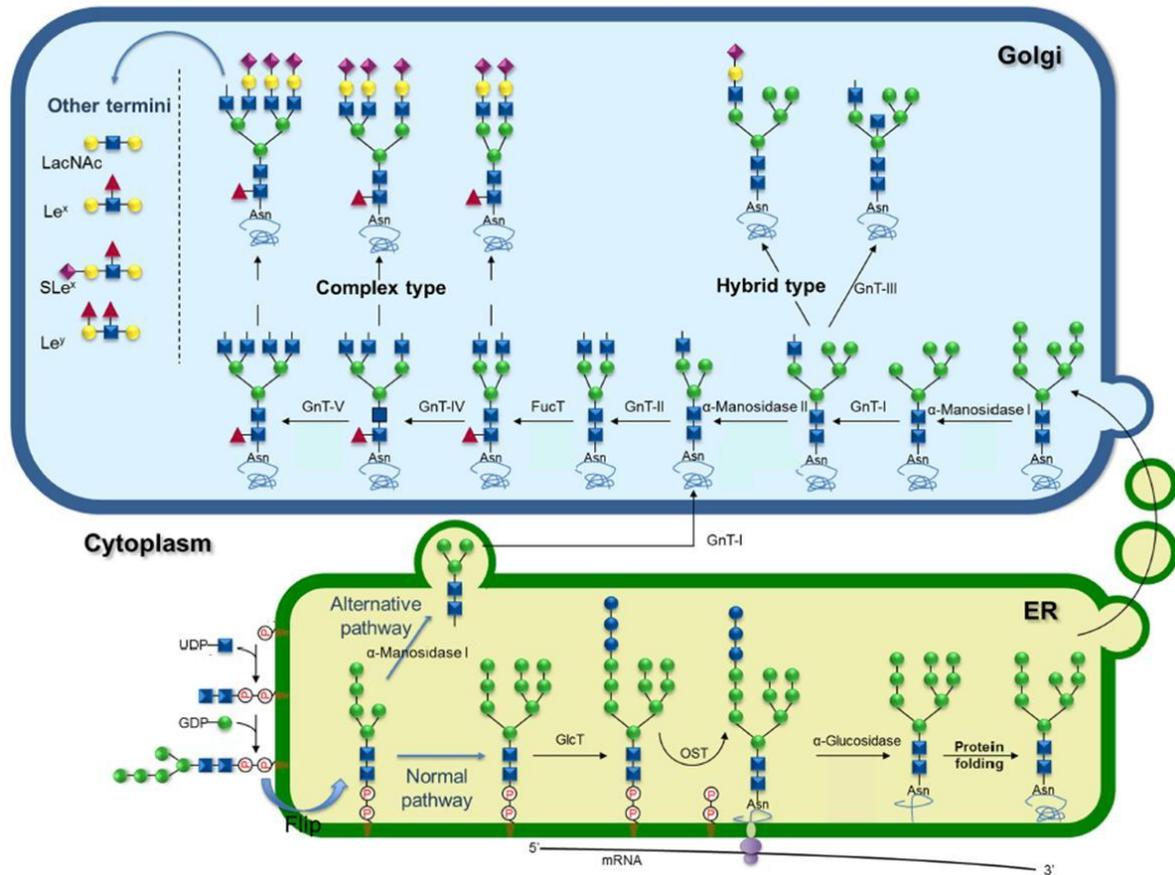


Figure 18

La biosynthèse des N-glycanes

La N-glycosylation débute dans le réticulum endoplasmique (ER) et se poursuit dans l'appareil de Golgi. Les N-glycanes sont tout d'abord synthétisés sous la forme d'un précurseur oligosaccharidique lié par un groupement pyrophosphate (noté P) à un lipide particulier, le dolichol. Ce précurseur va être modifié en tétradéca-saccharidique tri-antenné de structure Glc3Man9GlcNAc2 qui va être transféré d'un bloc sur un résidu asparagine (noté Asn) d'une protéine en cours de synthèse. Suite au transfert, trois résidus glucoses (rond bleu) en bout de chaîne et un résidu mannose (rond vert) sont éliminés. La protéine est alors prête pour son transfert vers l'appareil de Golgi où elle va subir un processus de maturation des N-glycanes (modifications de la structure oligosaccharidique) qui diffère selon le compartiment du Golgi et qui aboutit à une glycosylation terminale. La protéine pourra ensuite quitter le Golgi pour être sécrétée ou rejoindre la membrane cellulaire. Les carrés bleus représentent les N-acétylglucosamines, les ronds verts représentent les mannoses, les ronds bleus représentent les glucoses, les triangles rouges représentent les fucoses, les ronds jaunes représentent les galactoses et les losanges violets représentent les acides sialiques (d'après Vasconcelos-Dos-Santos et al., 2015).

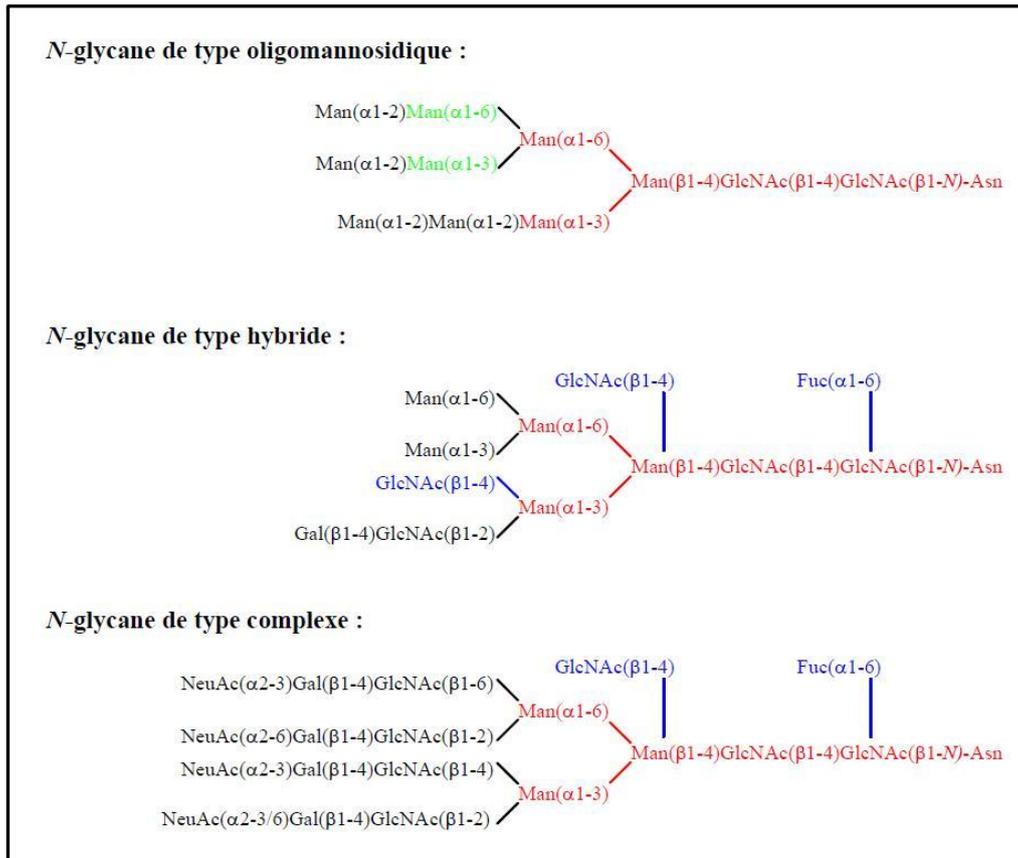


Figure 19

Les structures des trois types de N-glycanes synthétisés chez les mammifères

Trois types de N-glycanes sont synthétisés par les cellules de mammifères : des N-glycanes de type oligomannosidique, de type hybride et de type complexe. Est représenté en rouge, le noyau pentasaccharidique; en vert, les résidus retrouvés dans tous les N-glycanes de type oligomannosidique et en bleu, les résidus plus ou moins présents selon les N-glycanes (tiré de la thèse de Blanchard S., 2005).

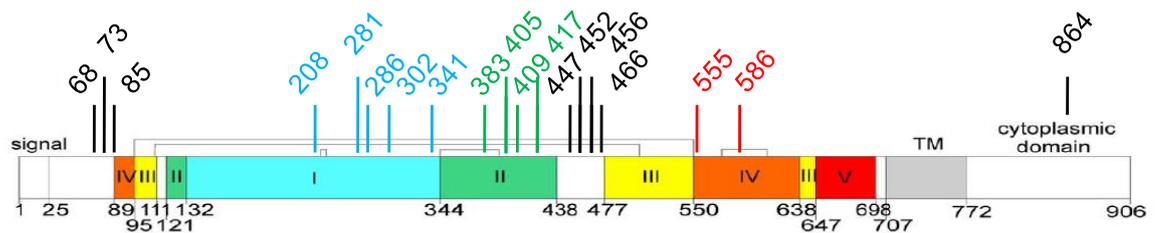
Les sites de glycosylation de la gB sont dit « potentiels » car ils ne sont pas nécessairement glycosylés. En effet, la structure primaire de la séquence d'acides aminés de la gB n'est pas le seul facteur déterminant de la glycosylation de la glycoprotéine. La conformation de la protéine peut influencer sur les différentes étapes réticulaires et golgiennes de la glycosylation en favorisant ou non l'accessibilité du substrat aux différentes glycosyltransférases, enzymes responsables de l'addition de groupements osidiques sur les chaînes existantes. Plusieurs sites de glycosylation sur la même protéine peuvent être glycosylés de manières différentes (les "glycoformes") (Rademacher et al., 1988). De plus, le type de cellule ainsi que l'état physiologique de la cellule ont une influence sur la glycosylation (Goochee and Monica, 1990).

Il a été démontré que le poids moléculaire de la sous-unité gp116 de la gB peut varier entre 93kDa et 116kDa selon les glycanes qu'elle porte, suggérant que cette glycoprotéine contient un certain nombre de glycanes et que ceux-ci varient (Britt and Auger, 1986). De plus, le nombre de sites potentiels de N-glycosylation de la gB et la position de ces sites peuvent varier en fonction de la souche de CMV étudiée (figure 20A). La gB contient entre 18 et 19 sites potentiels de N-glycosylation (figure 20A, B et C). Trois d'entre eux ont une forte probabilité d'être glycosylés : les sites 302, 417 et 456 (figure 20D) (prévision NetNGlyc). La gB contient aussi des sites de O-glycosylation mais aucun O-glycane n'est retrouvé à sa surface (Reschke et al., 1995; Tugizov et al., 1998).

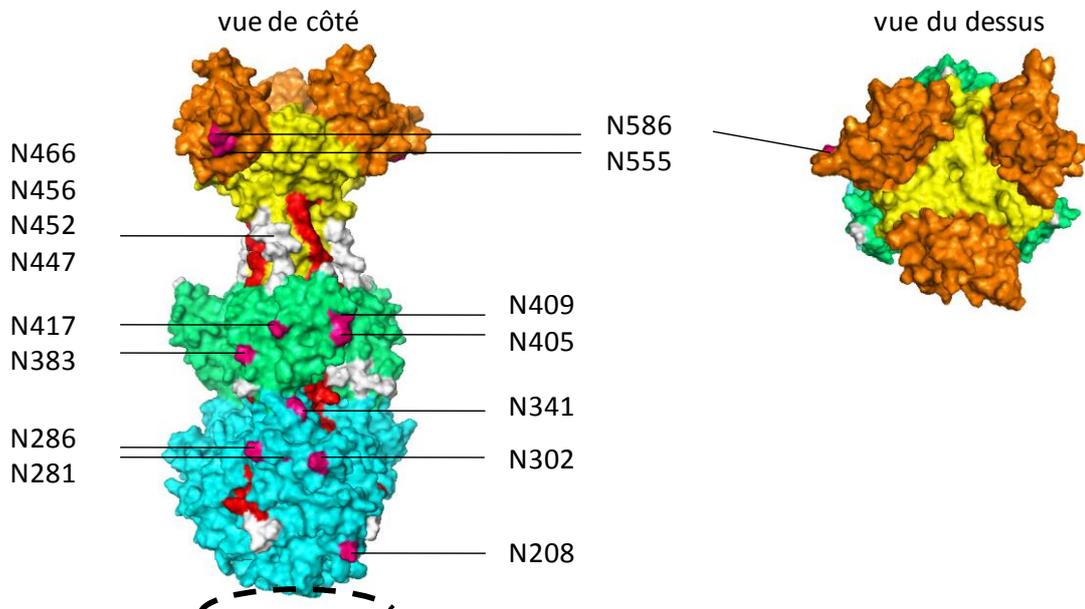
A

	antigenic domain	AD-2			AD-5					AD-4									AD-1			
souche	AD169	37	68	73	85	208	281	286	302	341	383	405	409	417	447	452	/	464	465	554	585	863
	TB40	/	68	73	85	208	281	286	302	341	383	405	409	417	447	452	456	/	466	555	586	864

B



C



D

(Threshold=0.5)

SeqName	Position	Potential	Jury	N-Glyc	agreement result
UL55_TB40_E	68 NETI	0.6257	(9/9)	++	
UL55_TB40_E	73 NTTL	0.6419	(8/9)	+	
UL55_TB40_E	85 NTK	0.6683	(9/9)	++	
UL55_TB40_E	208 NKIM	0.7087	(9/9)	++	
UL55_TB40_E	281 NGTN	0.6599	(9/9)	++	
UL55_TB40_E	286 NASY	0.4513	(6/9)	-	
UL55_TB40_E	302 NYTI	0.7509	(9/9)	+++	
UL55_TB40_E	341 NVTC	0.5863	(7/9)	+	
UL55_TB40_E	383 NMSD	0.6529	(9/9)	++	
UL55_TB40_E	405 NTSY	0.4877	(4/9)	-	
UL55_TB40_E	409 NQTY	0.5630	(8/9)	+	
UL55_TB40_E	417 NVSV	0.7960	(9/9)	+++	
UL55_TB40_E	447 NRSS	0.5794	(7/9)	+	
UL55_TB40_E	452 NLTH	0.6332	(9/9)	++	
UL55_TB40_E	456 NRTK	0.7732	(9/9)	+++	
UL55_TB40_E	466 NATH	0.4193	(8/9)	-	
UL55_TB40_E	524 NPSA	0.5116	(4/9)	+	WARNING: PRO-X1.
UL55_TB40_E	555 NQTS	0.5619	(7/9)	+	
UL55_TB40_E	586 NSSY	0.3711	(7/9)	-	
UL55_TB40_E	864 NGTD	0.5133	(4/9)	+	

Figure 20

Les sites potentiels de N-glycosylation de la gB de la souche TB40

(A) Comparaison des sites de N-glycosylation de la souche AD169 et TB40. Seule la position des asparagines est indiquée (B) Représentation de la séquence d'acides aminés de la gB du CMV. La position des sites de N-glycosylation est indiquée au dessus de la séquence. (C) La gB est représentée sous sa forme trimérique. Les séquences ont été colorées en accord avec (B). Les sites de N-glycosylation (résidu asparagine) ont été colorés en rose. (D) La séquence de la gB (UL55) de la souche TB40/E-BAC4 a été analysée pour son nombre de sites potentiels de N-glycosylations. Le site de N-glycosylation correspond au résidu asparagine qui est situé dans une séquence consensus constituée du tripeptide Asn-X-Ser/Thr, où X peut être n'importe quel acide aminé excepté la proline (Gavel and von Heijne, 1990). La probabilité de retrouver un N-glycane sur un site donné est montré à droite (noté « N-Glyc ») et les sites ayant une forte probabilité d'être N-glycosylé sont en rouge (NetNGlyc 1.0 Server : <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

Les glycanes peuvent avoir des rôles variés et difficiles à prédire. Pour la plupart, les glycanes servent à la conformation de la protéine, à la stabilité protéique, de signaux pour le trafic des protéines, de molécules permettant la reconnaissance et l'interaction cellule-cellule ou cellule-pathogène ou encore à la régulation de l'activité de certaines protéines.

Peu d'études portent sur le rôle des glycanes portés par les glycoprotéines d'enveloppe du CMV. Pourtant, il a été démontré que les glycanes peuvent jouer un rôle crucial dans la fonction des glycoprotéines de plusieurs virus tels que le VIH-1, le virus d'Ebola ou encore le LCMV (Bonhomme et al., 2013; Martinez et al., 2013; Ogert et al., 2001; Tsuchiya et al., 2013; Wood et al., 2013). Ils peuvent intervenir dans leur interaction avec des ligands, leur tropisme ou encore influencer sur leur reconnaissance par le système immunitaire.

Un des points de cette étude a été de déterminer le rôle des N-glycanes de la gB du CMV. Et plus particulièrement leurs impacts sur l'interaction de cette glycoprotéine avec DC-SIGN ainsi que sur l'infectiosité du CMV.

3. Les lectines de type C

Les lectines sont des protéines exprimées aussi bien par les plantes que les bactéries et les animaux. Ces protéines reconnaissent des oligosaccharides ou polysaccharides. Les lectines ont divers rôles physiologiques. Chez les animaux, il existe plusieurs familles de lectines identifiées. Cette étude est plus particulièrement orientée sur les lectines de type C qui sont des lectines extracellulaires ou transmembranaires pouvant participer à l'adhésion cellulaire, la signalisation ou encore à la reconnaissance de pathogènes (Weis et al., 1998). Les lectines de type C transmembranaires peuvent être divisées en deux types selon l'orientation de la protéine :

- le type I comprenant les lectines dont la partie C-terminale se situe dans le cytoplasme,
- le type II comprenant les lectines dont la partie N-terminale se situe dans le cytoplasme.

Parmi les lectines de type II, on retrouve des récepteurs exprimés à la surface des cellules dendritiques tels que DC-SIGN et la langérine.

3.1.DC-SIGN

3.1.1. Structure

DC-SIGN est aussi connue sous l'appellation CD209. Le gène codant pour cette protéine se situe sur le chromosome 19p13.2-3 et a une longueur de 13kb. Il est localisé à proximité du gène codant pour DC-SIGNR, un homologue de DC-SIGN résultant probablement d'une duplication d'un gène ancestral (Bashirova et al., 2003; Curtis et al., 1992; Mummidi et al., 2001; Soilleux et al., 2000). Cette lectine membranaire est composée de 404 acides aminés et a un poids moléculaire d'environ 44kDa.

Elle fait partie des lectines de type C (et de type II). Ces lectines possèdent une organisation structurale similaire. Elles sont composées d'un domaine cytoplasmique, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine extracellulaire divisé en un domaine « neck » et un domaine de reconnaissance aux glycanes ou CRD (pour Carbohydrate Recognition domain) (figure 21).

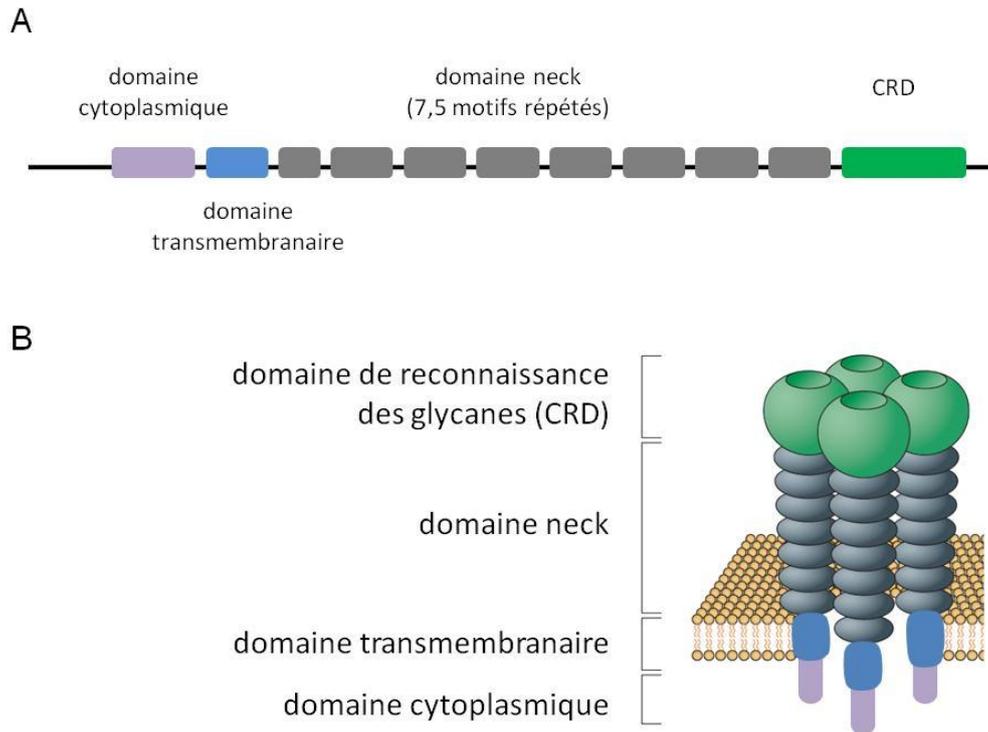


Figure 21

Représentation schématique de l'organisation des différents domaines de DC-SIGN

(A) Représentation schématique des acides aminés et (B) de la structure 3D de DC-SIGN sous forme de tétramère. DC-SIGN dispose d'un domaine cytoplasmique (violet), d'un domaine transmembranaire (bleu), d'une région neck disposant de 7,5 motifs répétés (gris) et d'un domaine de reconnaissance aux glycanes (CRD) (vert) (d'après Liu et al., 2012).

Le domaine cytoplasmique de DC-SIGN est composé de la partie N-terminale de la protéine. Il comporte divers motifs : le motif di-leucine (LL) participant à l'internalisation des antigènes, le motif tri-acidique (EEE) jouant un rôle dans l'adressage vers l'endosome tardif et le lysosome ainsi qu'un motif YXXL permettant l'interaction avec des adaptateurs à ITAM (« immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif ») (van Gisbergen et al., 2005b; van Kooyk and Geijtenbeek, 2003).

Le domaine transmembranaire est majoritairement composé de résidus hydrophobes ce qui lui permettent de traverser la membrane plasmique.

Son domaine neck forme une structure de type coiled-coil formée d'hélices alpha qui s'enroulent les unes sur les autres. Il est composé de 7,5 séquences Ig-like répétées (sept complètes et une huitième incomplète). Chaque séquence comportant 23 acides aminés. La première moitié de chacun de ces motifs répétés contient des résidus hydrophobes, espacés par intervalles réguliers. Cette région neck est essentielle pour la tétramérisation de la lectine (Feinberg et al., 2005; Mitchell et al., 2001; Serrano-Gomez et al., 2008).

Le CRD est une partie très conservée. Le CRD de DC-SIGN dispose d'une structure globulaire incluant 2 hélices α , 12 feuillets β et 3 ponts disulfures. Une boucle dépasse de la surface de la protéine et participe à la formation des deux sites de fixation au Ca^{2+} . Le premier site (site 1) est responsable du maintien de la structure du CRD. Le second (site 2), composé des acides aminés : Glu347, Asn349, Glu354 et Asn365, est responsable de l'interaction avec les ligands ou structures glycosylées (figure 22) (Feinberg et al., 2001). De plus, il a été démontré que, DC-SIGN étant sous forme de tétramère, la distance entre deux sites voisins de liaisons au ligand est d'environ 40 Å (figure 23A) (Tabarani et al., 2009; Varga et al., 2014).

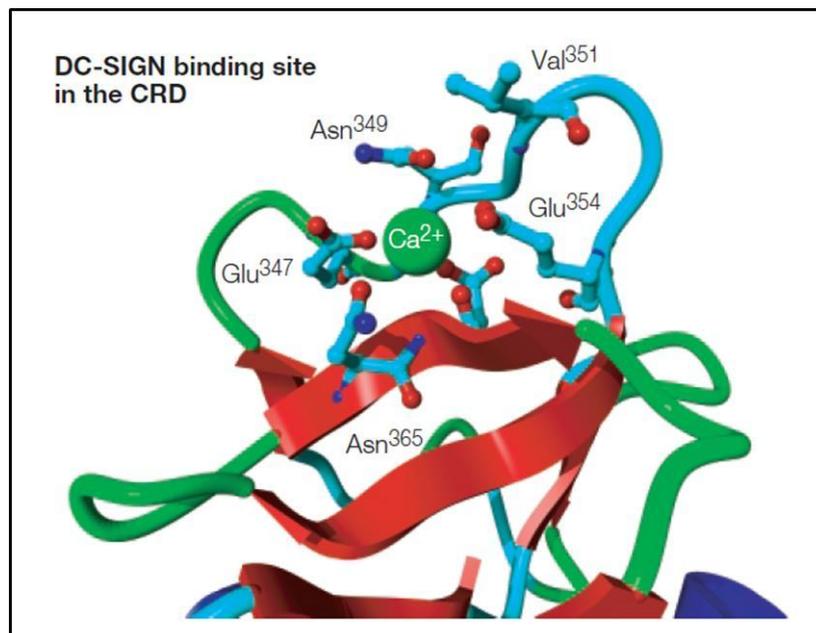


Figure 22

Site de fixation au Ca^{2+} au sein du CRD

Le CRD est une structure globulaire. Une boucle dépasse de la surface de la protéine et participe à la formation des 2 sites de fixation au Ca^{2+} . Le site 2 est composé des acides aminés : Glu347, Asn349, Glu354 et Asn365, tous interagissant avec le Ca^{2+} (en vert). Ce site est responsable de l'interaction du CRD avec les ligands ou structures glycosylées (van Kooyk and Geijtenbeek, 2003).

DC-SIGN aurait une longueur de 320Å (+/- 20Å) ce qui lui permettrait de dépasser le glycocalyx (qui est la couche polysaccharidique liée à la membrane cellulaire et servant de protection à la cellule). Sa longueur est due au grand nombre de répétitions du neck (230Å) qui permet d'éloigner le CRD de la membrane cellulaire (figure 23B) (Feinberg et al., 2005). Cette caractéristique donne un avantage à cette lectine. En effet, étant au-dessus de nombreux autres récepteurs, elle peut sonder l'environnement extracellulaire et détecter des antigènes.

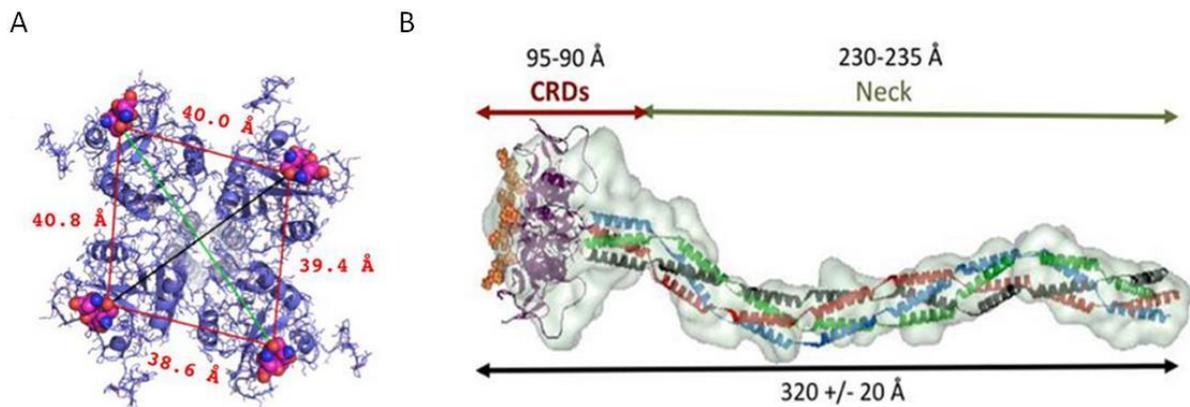


Figure 23

Modèle du domaine extracellulaire de DC-SIGN

La protéine est montrée sous forme de tétramère. (A) Une vue du dessus de DC-SIGN permet d'observer les quatre CRD de la protéine. La distance entre les sites voisins de liaisons aux saccharides est indiquée en rouge. (B) Le tétramère a une longueur de 320Å (+/- 20 Å), son « neck » a une longueur de 230-235Å et son CRD a une longueur de 90-95Å (Tabarani et al., 2009).

3.1.2. Tétramérisation

Certaines lectines de type C ont la capacité de se multimériser. L'arrangement des CRD en multimères permet de projeter les sites de reconnaissance dans une direction et d'augmenter l'avidité pour le ligand. Ainsi, individuellement, un CRD possèdera une faible affinité alors que plusieurs CRD regroupés vont atteindre une grande avidité, cette dernière étant la somme des affinités. L'assemblage des molécules ayant une faible affinité pourra alors former une macromolécule de forte avidité.

Dans le cas de DC-SIGN, l'avidité est le résultat de deux facteurs. Tout d'abord, DC-SIGN s'organise en tétramère, disposant ainsi de quatre CRD, suffisant pour réaliser une interaction multivalente et de haute affinité avec ses ligands. Ensuite les tétramères de DC-SIGN se regroupent en patch au niveau des rafts lipidiques de la surface des cellules dendritiques. Au cours de la maturation des DC, la distribution de DC-SIGN passe d'une localisation aléatoire et homogène sur toute la surface cellulaire à une organisation en micro-domaines cellulaires (Liu et al., 2014). Ces micro-domaines ont un diamètre de 100 à 200nm (Cambi et al., 2004). Cette organisation en micro-domaines est importante pour l'interaction, la prise en charge et l'internalisation des particules virales, suggérant ainsi que cet assemblage multimoléculaire de DC-SIGN à la surface cellulaire agit comme une plate-forme de fixation privilégié des pathogènes (figure 24).

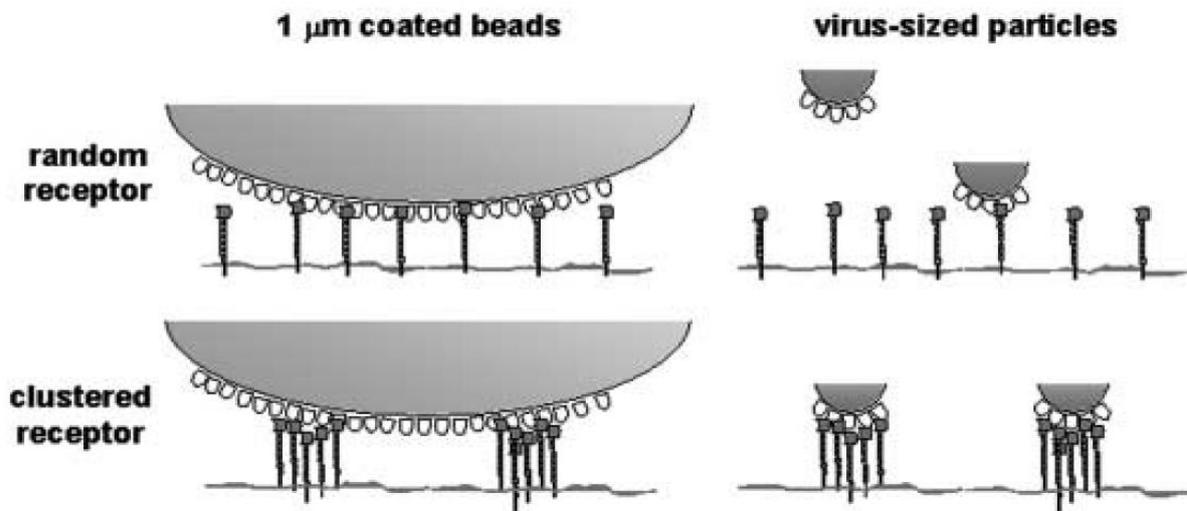


Figure 24

Impact de la multimérisation

Représentation schématique de l'impact de l'interaction d'une bille ou d'un virus avec des récepteurs distribués soit d'une façon homogène ou regroupés en patch sur la surface cellulaire. L'interaction d'une bille de 1 μm ou d'un virus avec des récepteurs non regroupés est faible. Le regroupement des récepteurs, en l'occurrence DC-SIGN, sur la surface cellulaire augmentera le nombre de récepteurs interagissant avec le même ligand induisant ainsi une interaction multivalente de forte affinité (Cambi et al., 2004).

3.1.3. Expression cellulaire

DC-SIGN est principalement exprimée par des cellules dendritiques myéloïdes (Bleijs et al., 2001). Ces cellules exprimant DC-SIGN vont être majoritairement présentes dans la *lamina propria* des muqueuses du rectum et de l'utérus ainsi que dans le derme de la peau (figure 25). Elles vont pouvoir aussi être retrouvées au sein de différents organes tels que les tissus lymphoïdes (ganglions lymphatiques et rate) ou la moelle osseuse (Geijtenbeek et al., 2000c). DC-SIGN peut être exprimée à la surface des macrophages alvéolaires (poumons) et du tissu fœtal (Soilleux et al., 2000; Tailleux et al., 2005). Cependant, elle n'est pas exprimée par les monocytes, les lymphocytes T, les thymocytes et les cellules de la moelle osseuse CD34⁺. De plus, DC-SIGN n'est pas exclusivement une lectine membranaire, elle peut aussi être sécrétée sous forme soluble (Mummidi et al., 2001; Plazolles et al., 2011).

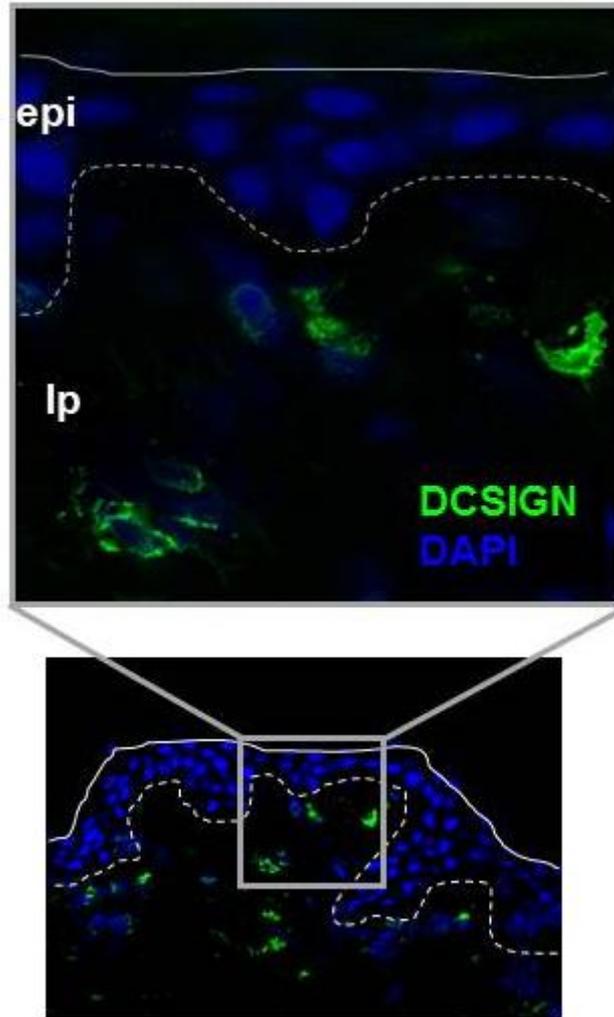


Figure 25

Marquage des cellules DC-SIGN⁺ dans une muqueuse génitale mâle humaine

Le noyau des cellules a été marqué par le DAPI (bleu) et la lectine DC-SIGN par un anticorps spécifique (clone DCN-46; vert). Les cellules DC-SIGN⁺ se trouvent uniquement dans le tissu conjonctif ou *lamina propria* (lp) de la muqueuse. L'épithélium (ep), compris entre un trait continu blanc (milieu extérieur) et un trait pointillé blanc (lame basale) ne contient pas de cellules DC-SIGN⁺ (Halary, U1064, SFR Bonamy, Nantes).

3.1.4. Fonctions et ligands

Etant une lectine, DC-SIGN est spécifique de résidus osidiques présents sur des glycoprotéines entre autres. Elle est à la fois responsable de l'adhésion cellulaire et de la reconnaissance des pathogènes. En tant que récepteur d'adhésion, DC-SIGN va pouvoir interagir avec ICAM-2 retrouvé chez les cellules endothéliales et ICAM-3 exprimé par les LT. À cela, s'ajoute son rôle en tant que récepteur des pathogènes. En effet, DC-SIGN reconnaît des pathogènes tels que des virus, des parasites ou encore des levures (van Kooyk and Geijtenbeek, 2003).

3.1.4.1. Les N-glycanes

Une des caractéristiques principales des lectines est leur spécificité pour les glycanes. Ces glycanes reconnus par les lectines sont retrouvés sur des glycoprotéines qui peuvent être d'origine cellulaire ou virale par exemple. Contrairement aux interactions de type CMH/TCR qui sont très spécifiques, les lectines vont pouvoir interagir avec plusieurs glycanes ayant des structures différentes et/ou des compositions en saccharides différentes. Il ne s'agit donc pas ici d'une interaction « clef/serrure ».

C'est *via* son CRD que DC-SIGN va reconnaître les glycanes (figure 26). Il a été démontré que cette lectine reconnaissait avec une haute affinité des structures hautement mannosylées. Elle peut aussi reconnaître des résidus fucose retrouvés sur des dérivés d'antigènes Lewis. De plus, elle reconnaît les deux séquences non sialylées de Lewis-X et de Lewis-A ainsi que la séquence Lewis-A sulfaté (Appelmek et al., 2003; Feinberg et al., 2001; Guo et al., 2004).

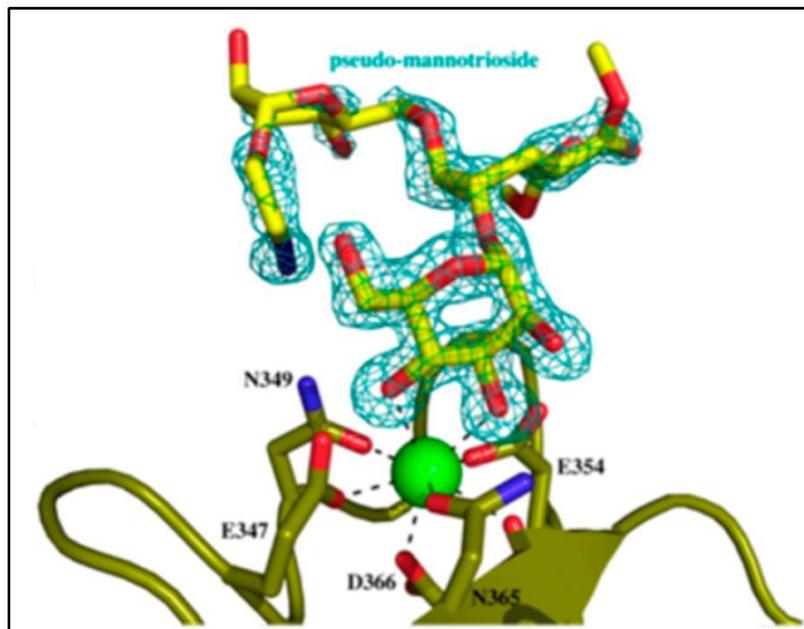


Figure 26

Interaction entre le CRD et un pseudomannotriose

Le modèle a été réalisé à partir de la structure obtenue par rayon X du CRD et du pseudomannotriose. La structure protéique du CRD est représentée en vert olive et ses acides aminés participant à l'interaction sont en forme de barres. Le pseudomannotriose est représenté en jaune (Sutkeviciute et al., 2014).

3.1.4.2. Ligands du soi

La protéine ICAM-2 est fortement exprimée à la surface des cellules endothéliales. L'interaction ICAM-2/DC-SIGN va participer à la migration *trans*-endothéliale des DC. En effet, cette interaction initie l'adhésion des DC à l'endothélium vasculaire. Bien qu'elle soit courte et réversible, par la suite, d'autres interactions telles que l'interaction ICAM-1/LFA-1 vont permettre aux DC de poursuivre le processus de migration *trans*-endothéliale (figure 27) (Geijtenbeek et al., 2000a).

Lorsque les DC vont reconnaître un signal de danger, elles vont s'activer et vont migrer jusqu'aux ganglions lymphatiques dans la but d'induire une réponse immunitaire adaptative. Les DC vont alors présenter l'antigène *via* le complexe CMH/peptide aux TCR des LT naïfs pour les activer. L'organisation d'un site de contact, ou synapse immunologique, entre ces deux types cellulaires joue un rôle crucial dans la régulation de la réponse immunitaire. Cette synapse immunologique comprend le complexe CMH/TCR ainsi que des molécules de co-stimulation (Bleijs et al., 2001; Dustin et al., 1998; Dustin and Springer, 1989). Au sein de cette synapse, DC-SIGN va interagir avec ICAM-3 exprimé par les LT (Geijtenbeek et al., 2000c; van Gisbergen et al., 2005a). Bien que décrite, la position de DC-SIGN au sein de la synapse immunologique n'est pas encore bien déterminée (figure 27).

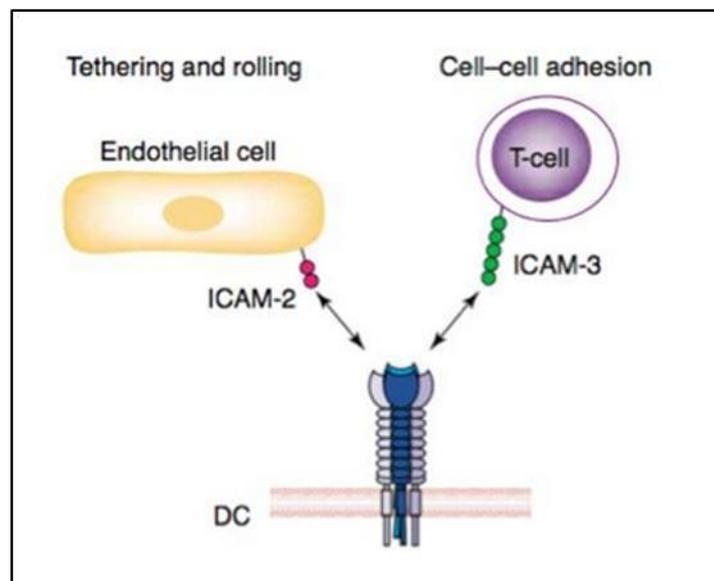


Figure 27

Interaction de DC-SIGN avec ICAM-2 et ICAM-3

La lectine DC-SIGN interagit avec ICAM-2 exprimé par les cellules endothéliales, permettant aux DC de migrer en travers l'endothélium vasculaire. Cette lectine peut aussi interagir, au sein de la synapse immunologique, avec ICAM-3 exprimé par les LT (Ludwig et al., 2006).

Il a été démontré que DC-SIGN est impliquée dans le mécanisme de tolérance tumorale. Une étude a démontré que les DC peuvent reconnaître et se lier aux cellules tumorales colorectales *via* DC-SIGN et participer à une réponse immunitaire anti-tumorale (van Gisbergen et al., 2005a). DC-SIGN a aussi un rôle tolérogène dans le cadre de la transplantation (Conde et al., 2015). Ce domaine étant hors du champ d'étude de cette thèse, le rôle tolérogène de DC-SIGN ne sera pas plus développé.

3.1.4.3. Ligands du non soi

Les DC perçoivent et alertent de l'intrusion dans l'organisme d'agents pathogènes. Ces pathogènes peuvent être reconnus par DC-SIGN. Dans ce cas, le pathogène sera internalisé dans des endosomes précoces puis sera ensuite conduit aux endosomes tardifs pour être dégradé et adressé au CMH dans le but d'initier la réponse immunitaire adaptative (Engering et al., 2002). Néanmoins, certains pathogènes échappent à la surveillance du système immunitaire en tirant profit de la présence de DC-SIGN à la surface des DC.

DC-SIGN a été initialement décrite comme récepteur de la gp120 du VIH-1. Depuis, de nombreux pathogènes ont été ajoutés à la liste tels que le CMV, le virus de l'hépatite C, Ebola, le virus de la Dengue, l'HHV-8, *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus pneumoniae*, ainsi que certains types de parasites et de champignons (tableau 3) (de Witte et al., 2006; Geijtenbeek et al., 2000b; Geijtenbeek et al., 2002b; Halary et al., 2002; Koppel et al., 2005; Pohlmann et al., 2003; Rappocciolo et al., 2006).

Table 2 | **DC-SIGN-binding pathogens**

Pathogen	Antigen	Carbohydrate structure	Other C-type lectin receptors
Viruses			
HIV-1	gp120	High mannose	Mannose receptor and Langerin
HIV-2	gp120	?	
SIV-1	gp120	?	
Ebola virus	GP	High mannose	
Cytomegalovirus	gB	?	
Hepatitis C virus	E1/E2	?	
Dengue virus	gE	?	
Bacteria			
<i>Helicobacter pylori</i>	LPS	Lewis-x	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	LPS	Mannose	
<i>Mycobacteria tuberculosis</i>	ManLAM	Di-mannose, tri-mannose	Mannose receptor
Yeast			
<i>Candida albicans</i>	?	?	Mannose receptor
Parasites			
<i>Leishmania pifanoi</i>	LPG	High mannose	
<i>Schistosoma mansoni</i>	SEA	Lewis-x	

gB, glycoprotein B; gE, glycoprotein E; GP, glycoprotein; Langerin, Langerhans-cell-specific C-type lectin; LPG, lipophosphoglycan; LPS, lipopolysaccharide; ManLAM, mannose-capped lipoarabinomannan; SEA, soluble egg antigen; SIV, simian immunodeficiency virus;

Tableau 3

Les pathogènes reconnus par DC-SIGN

(van Kooyk and Geijtenbeek, 2003).

De nombreuses glycoprotéines d'enveloppe virale sont reconnues par DC-SIGN. C'est une étude de Geijtenbeek et *al.* qui a décrit DC-SIGN comme étant un récepteur de la gp120 du VIH-1. Par la suite, il a été confirmé par Biacore que cette glycoprotéine virale a une forte affinité pour DC-SIGN (Geijtenbeek et al., 2000b).

C'est *via* l'interaction DC-SIGN/gp120 que les DC vont capturer le VIH-1 au site d'entrée pour le transporter jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires. Les particules virales vont alors être transmises aux LT CD4⁺. L'interaction entre DC-SIGN et le VIH-1 permet de concentrer les particules virales à la surface des DC. Cette concentration des virus induit une augmentation de la probabilité de sa transmission aux cellules cibles, en l'occurrence les LT (Geijtenbeek et al., 2000a; Geijtenbeek et al., 2000b). Plusieurs mécanismes ont été proposés concernant le processus de préservation de l'activité du virus lors de son transport par les DC jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires.

Le mécanisme proposé par Geijtenbeek et *al.* implique l'internalisation du virus par la DC sans infection de cette cellule (Geijtenbeek et al., 2002a). L'interaction de DC-SIGN avec le virus, serait suivie de l'internalisation du complexe DC-SIGN/VIH-1 dans l'endosome précoce (Engering et al., 2002; Kwon et al., 2002). À ce niveau, le virus est protégé de la protéolyse cellulaire. Il sera transféré

à travers la synapse immunologique au LT CD4⁺ (Arrighi et al., 2004). Ce premier mécanisme de transmission est défini comme une *trans*-infection puisque le virus, pris en charge par la DC, est transmis au LT sans un mécanisme d'infection proprement dit de la DC (de Witte et al., 2008).

Une autre étude démontre que la DC est d'abord infectée par le VIH-1 (*cis*-infection) et que le virus infectera par la suite le LT (Burleigh et al., 2006; Kwon et al., 2002; Turville et al., 2004). Le virus est d'abord pris en charge par la DC, se réplique au sein de cette cellule et infectera par la suite le LT.

Ainsi, DC-SIGN aurait un rôle dans la *cis*- et la *trans*-infection des LT (figure 28). En effet, cette lectine ne jouerait pas un rôle dans la dégradation des particules du VIH-1 en peptide « antigène » au sein des DC, mais semble jouer un rôle dans la protection de ces particules virales contre la dégradation intracellulaire.

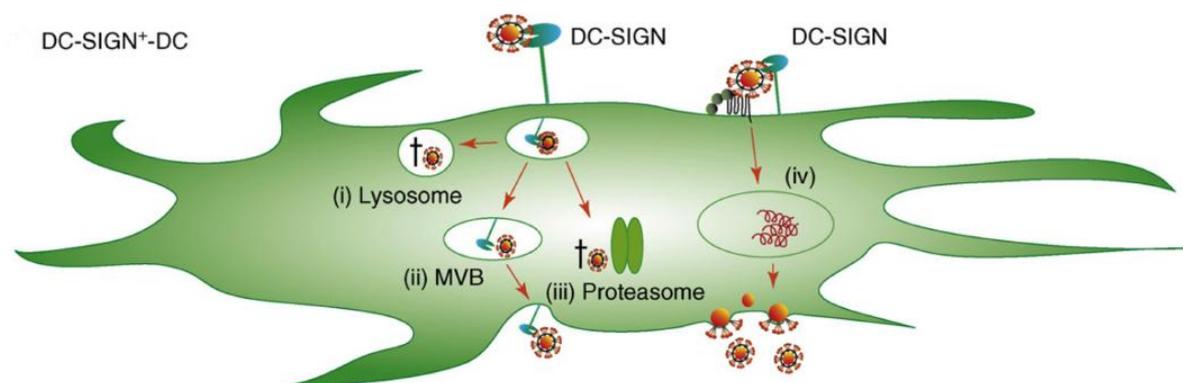


Figure 28

Interaction des DC dermiques avec le VIH-1

Interaction du VIH-1 avec les DC dermiques *via* DC-SIGN. (i) internalisation et dégradation du virus dans le lysosome. (ii) internalisation du virus dans des corps multivésiculaires conduisant à la présentation du virus intact à la surface cellulaire (*trans*-infection). (iii) dégradation du virus par le protéasome. (iv) infection directe des DC par le virus (*cis*-infection) (de Witte et al., 2008).

C'est deux ans après la description de l'interaction DC-SIGN/gp120 que la glycoprotéine B du CMV a été, à son tour, décrite comme un ligand de DC-SIGN. En effet, il a été démontré que la gB recombinante fixe les MDDC et que cette interaction est DC-SIGN dépendante puisqu'elle est inhibée lorsque DC-SIGN est bloquée (par des anticorps anti-DC-SIGN). *In vitro*, cette interaction DC-SIGN/gB permet au virus d'être transmis, *via* les MDDC, à des cellules permissives (Halary et al., 2002). Après interaction du CMV avec les DC *via* DC-SIGN, la particule virale pourra être présentée au CMH-II. Une étude réalisée par notre équipe suggère fortement que le CMV utilise les DC à leur profit. Après

entrée du CMV dans les MDDC, le virus est protégé de la dégradation pendant plusieurs heures (figure 29). En comparaison, contrairement au MDDC, les macrophages M1 ne permettent pas au virus de persister et le détruisent probablement (Haspot et al., 2012). Il est possible que le CMV suive un scénario similaire à celui du VIH-1 en utilisant les DC comme un cheval de Troie pour rejoindre les organes lymphoïdes secondaires.

De plus, DC-SIGN sous sa forme soluble se comporte comme sa contrepartie membranaire, c'est-à-dire qu'elle potentialise l'infection des DC par le CMV. La molécule agirait comme une opsonine suggérant la présence d'un récepteur pour ces formes solubles de DC-SIGN sur les DC (Plazolles et al., 2011).

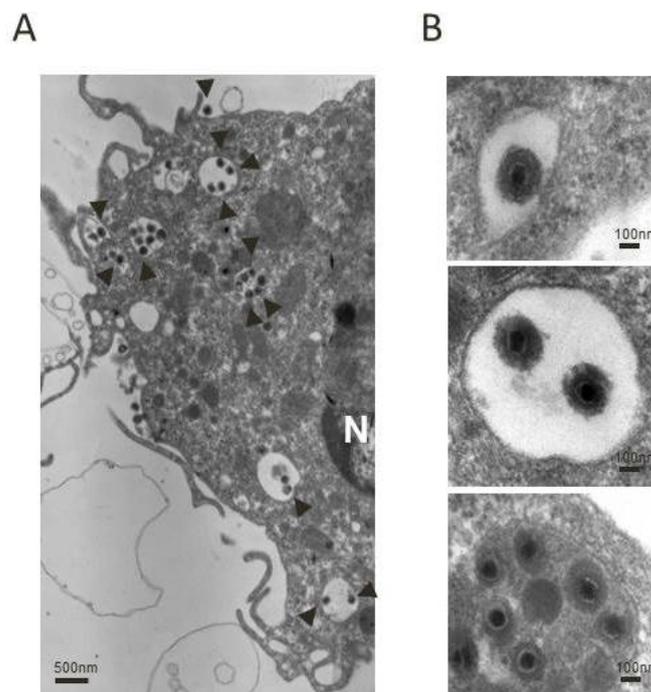


Figure 29

MDDC incubées avec du CMV

Image prise par microscopie électronique à transmission (MET) de MDDC incubées avec le CMV durant deux heures (souche VHL/E, MOI = 10). (A) Vue générale d'une MDDC présentant des particules immobilisées à la membrane mais également dans des vésicules endosomales larges ou macropinosomes. Les flèches noires indiquent les particules virales. N=noyau. (B) Agrandissement de vésicules macropinocytiques contenant des particules de CMV. Les barres d'échelle sont indiquées pour chaque image (Haspot et al., 2012).

Peu d'informations sont disponibles sur l'interaction entre DC-SIGN et la gB qui semble pourtant cruciale pour l'infection des mDC par le CMV. Un des objectifs de cette thèse a été de caractériser avec précision l'interaction DC-SIGN/gB ainsi que de déterminer l'importance de DC-SIGN pour la transmission du CMV.

3.2.DC-SIGNR

La lectine DC-SIGNR est aussi connue sous le nom de L-SIGN ou CD209L. Elle dispose de 77% d'homologies de séquence avec DC-SIGN et partage la même organisation des domaines (Liu et al., 2003; Snyder et al., 2005; Soilleux et al., 2000). L'expression de DC-SIGNR est restreinte aux cellules endothéliales du sinus hépatiques (LSEC).

Tout comme DC-SIGN, DC-SIGNR est spécifique d'oligosaccharides (Feinberg et al., 2001) et peut interagir avec des particules virales. Il a été démontré que cette lectine est un récepteur pour le VIH-1 et qu'elle promeut son infection (Bashirova et al., 2001; Pohlmann et al., 2001; Snyder et al., 2005). DC-SIGNR peut aussi fixer la gB du CMV (Halary et al., 2002).

Peu d'études ont permis de décrire les propriétés fonctionnelles de cette lectine DC-SIGNR. Néanmoins, elles semblent être différentes de celles de DC-SIGN. En effet, DC-SIGNR n'est pas capable d'endocytose (Guo et al., 2004).

3.3.Langérine

3.3.1.Structure

La Langérine est une lectine de type C, de type II, aussi connue sous l'appellation CD207. Elle est spécifique aux cellules de Langerhans, chez l'homme. Cette lectine est composée des trois principaux domaines des lectines de type II:

- un domaine cytoplasmique,
- un domaine transmembranaire, permettant à la lectine de traverser la membrane plasmique,
- un domaine extracellulaire, composé d'une partie « neck » et d'une partie CRD.

Le « neck » permet la trimérisation de la protéine. Le domaine CRD joue un rôle central dans la reconnaissance des ligands ainsi que dans l'établissement des granules de Birbeck (Thepaut et al., 2009). Contrairement à d'autres lectines de type C telles que DC-SIGN, le CRD de la langérine ne possède qu'un seul site de liaison au calcium.

3.3.2. Fonctions et ligands

La langérine étant une lectine, elle est spécifique de glycanes. Elle a été définie comme reconnaissant les mannoses, les N-acétyl-glucosamines (GlcNAc) et le fucose (de Jong et al., 2010; Stambach and Taylor, 2003).

Les LC sont situées au niveau de l'épiderme de la peau et de l'épithélium des muqueuses ce qui leur confère une position stratégique pour capturer les antigènes. La langérine a principalement un rôle dans la reconnaissance des pathogènes tels que des virus (VIH-1 ou HSV), des mycobactéries (*M. tuberculosis*) et des champignons (*C. albicans*) (de Jong et al., 2010). Il a été démontré que cette lectine peut interagir avec la gp120 du VIH-1 (Turville et al., 2002). Cette reconnaissance est due à la faculté de la langérine à reconnaître des motifs saccharidiques portés par la gp120 à la surface du virus. Suite à la fixation de la gp120 à la langérine, les LC vont internaliser le virus dans les granules de Birbeck au sein desquelles il pourra être détruit (figure 11 et 30). Ces cellules possèdent donc un rôle protecteur vis-à-vis de l'infection par le VIH-1 (de Witte et al., 2007).

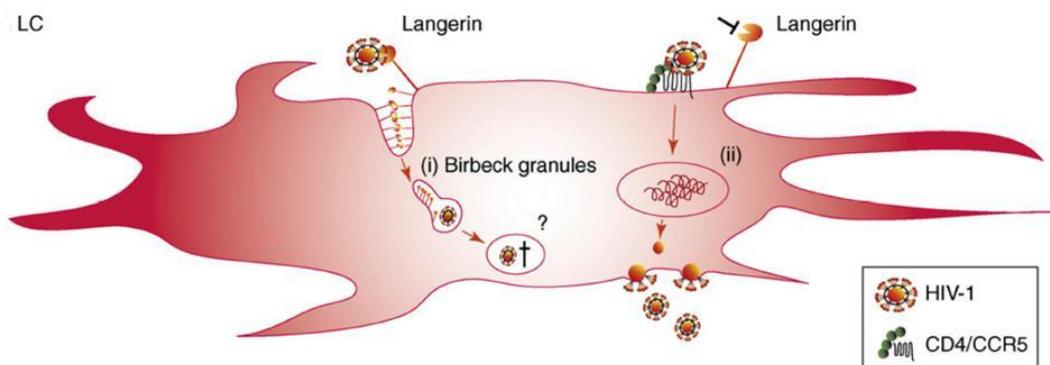


Figure 30

Interaction des cellules de Langerhans avec le VIH-1

(i) l'internalisation du virus dans les granules de birbeck permettrait de protéger les LC de l'infection. (ii) L'inhibition de la langérine (ou la saturation de la langérine) conduit à l'infection des cellules de Langerhans qui permettrait, par le virion nouvellement formé, d'infecter les LT (de Witte et al., 2008).

Les LC reconnaissent aussi le CMV (Hertel, 2014; Hertel et al., 2003; Lauron et al., 2014). Il a été démontré que les LC matures, contrairement aux LC immatures, sont susceptibles à l'infection par le CMV. Pour le moment, aucune interaction récepteur/ligand n'a été décrite pour la fixation du CMV aux LC.

Peu d'études ont été menées sur ce sujet. Dû à la similarité de la langérine avec DC-SIGN tant au niveau structurel qu'au niveau du type cellulaire qui les exprime, un des objectifs de cette thèse a été de déterminer le rôle que peut avoir la langérine dans l'interaction avec le CMV.

3.4. Inhibiteurs de DC-SIGN

Depuis que DC-SIGN a été décrite comme ayant un rôle important dans la réponse immunitaire et qu'elle permet la transmission de certains virus, cette lectine est devenue une cible pour le développement de nouveaux inhibiteurs. Ces molécules se fixant à DC-SIGN pourraient ainsi agir comme des agents anti-infectieux (Bernardi et al., 2013).

Plusieurs paramètres sont à prendre en compte avant de générer ces molécules. Tout d'abord, la nature des saccharides reconnus par le récepteur, la nature oligomérique ou non du récepteur et sa présentation ou non au sein de micro-domaines membranaires. Ensuite, l'inhibiteur doit répondre à certains critères tels qu'une bonne affinité et spécificité pour le récepteur ainsi qu'une bonne solubilité et stabilité chimique. En effet, il doit pouvoir être stable dans des liquides physiologiques comme le sang.

DC-SIGN reconnaît principalement des mannoses et fucoses présents sur ces ligands. Cette lectine étant sous forme de tétramère, elle présente quatre CRD à son ligand. L'affinité d'un CRD pour une unité monosaccharidique est généralement faible. Ainsi, les mannoses et les fucoses sous forme de monosaccharides ont une affinité faible pour DC-SIGN (Mitchell et al., 2001). Seuls les ligands polyvalents pourront fixer DC-SIGN efficacement. En effet, il a été démontré que l'affinité des mannoses et des fucoses pour DC-SIGN est plus forte lorsqu'ils sont sous forme de structures hautement mannosylées et sous forme d'oligosaccharides fucosylés (Appelmelk et al., 2003; Guo et al., 2004; Rojo and Delgado, 2004). Un inhibiteur de DC-SIGN sera alors efficace s'il est composé de mannoses et/ou de fucoses sous forme multivalent.

Différents travaux utilisant des inhibiteurs composés de saccharides pour inhiber l'interaction entre DC-SIGN et divers virus tels que le VIH-1 et Ebola ont été rapportés jusqu'à ce jour. Le premier antagoniste polyvalent de DC-SIGN a été synthétisé par Rojo et Delgado. Ce glycodendrimère composé de 32 mannoses inhibe la *trans*-infection du virus Ebola médiée par des cellules exprimant DC-SIGN (Lasala et al., 2003). L'interaction entre DC-SIGN et la gp120 du VIH-1 peut elle aussi être inhibée par des glycopolymères. Une étude de Becer et *al.* démontre que parmi des glycopolymères composés de différents ratios mannoses/galactoses, le glycopolymère composé de 100% de mannoses est le plus efficace pour bloquer l'interaction DC-SIGN/gp120 (Becer et al., 2010). Ces résultats confirment l'importance du choix du saccharide utilisé.

De plus, des études *in vitro* ont démontré qu'un inhibiteur tétravalent composé de mannoses peut bloquer la transmission du VIH-1 et du virus Ebola *via* DC-SIGN à des cellules permissives (Luczkowiak et al., 2011; Sattin et al., 2010). Ce même composé, utilisé dans un modèle de biopsie de cervix humain (muqueuse utérine), permet de diminuer l'infection de la biopsie par la HIV-1 (Berzi et al., 2012). En comparaison avec des tests cellulaires *in vitro*, ce modèle d'entrée des virus dans les

muqueuses, proche des conditions physiologiques, donne des perspectives intéressantes pour le développement d'inhibiteurs agissant sur la surface des muqueuses.

Le CMV est un virus pouvant entrer par les muqueuses et pouvant utiliser DC-SIGN exprimée par les mDC pour *trans*-infecter des cellules permissives. Néanmoins, aucun de ces inhibiteurs saccharidiques n'a encore été testé pour bloquer l'interaction entre DC-SIGN et le CMV. Au cours de cette thèse, j'ai pu tester l'effet de différents inhibiteurs saccharidiques sur l'interaction entre DC-SIGN et la gB.

4. Hypothèses de travail

Cette thèse s'articule autour de deux axes principaux. Le premier consiste à mieux définir l'interaction de la gB, une glycoprotéine d'enveloppe du CMV, avec DC-SIGN, une lectine exprimée par un sous types de cellules dendritiques. Le second consiste en la détermination du rôle des N-glycosylations dans le tropisme du CMV.

4.1. L'interaction gB/DC-SIGN

Lors d'une infection naturelle, le virus entre en contact avec des muqueuses. Au sein de ces muqueuses, les DC myéloïdes *via* leurs dendrites armées de PRR peuvent détecter et capturer la particule virale. Le rôle de ces mDC est d'alerter de l'intrusion dans l'organisme d'agents pathogènes tels que des virus en initiant la réponse immunitaire adaptative. Mais il est possible que le CMV utilise les mDC pour se disséminer dans l'organisme et atteindre différents organes. La gB du CMV peut interagir avec DC-SIGN exprimée par les mDC. Cette interaction, bien que semblant être cruciale pour la dissémination du virus, n'a été que très peu étudiée. Au cours de mon travail de thèse, j'ai voulu mieux caractériser cette interaction au niveau moléculaire. Pour cela, j'ai cherché à déterminer la zone d'interaction au sein de DC-SIGN pour plusieurs glycoprotéines d'origines virales. Les lectines étant spécifiques de glycanes et la gB portant des glycanes, j'ai cherché à déterminer leur rôle dans la fixation de la gB à DC-SIGN. Cette interaction pouvant être bénéfique au CMV, deux stratégies différentes ont été testées dans le but de la bloquer. La première a été d'utiliser des anticorps dirigés contre divers épitopes de la gB et de DC-SIGN, la seconde a été d'utiliser de petites molécules composées de glycanes.

De plus, DC-SIGNR, un homologue de DC-SIGN est aussi capable d'interagir avec la gB. J'ai alors testé l'effet des anticorps anti-DC-SIGN sur cette protéine dans le but de déterminer s'ils peuvent être utilisés sur ces deux homologues.

Un autre sous type de mDC retrouvé dans les muqueuses, les cellules de Langerhans, peuvent percevoir et alerter de l'intrusion d'agents pathogènes dans l'organisme. Ces cellules n'expriment pas DC-SIGN mais la langérine. Etant donné qu'aucun récepteur au CMV n'a été décrit pour ce type cellulaire, j'ai cherché à déterminer si la langérine pouvait interagir avec la gB du CMV.

4.2. Tropisme et glycosylations

Les souches fibroblastotropes du CMV infectent préférentiellement les fibroblastes alors que les souches endothéliotropes du CMV infectent préférentiellement les cellules endothéliales et épithéliales. Le tropisme différentiel du CMV pour les cellules endothéliales et épithéliales (ou des leucocytes du lignage myéloïde) a été récemment imputé à un groupe de gènes viraux, UL128-UL131A. Néanmoins, pour le moment, aucun récepteur n'a été décrit pour ces glycoprotéines d'enveloppe. De plus, il a été observé que les souches de CMV amplifiées en laboratoire présentent un tropisme directement dépendant du type de cellule ayant servi à générer le stock viral (Dargan et al., 2010; Towler et al., 2012). Autrement dit, si des fibroblastes sont utilisés pour produire du virus, celui-ci aura tendance à être fibroblastotrope et si des cellules endothéliales ou épithéliales sont utilisées, le virus aura tendance à être endothéliotrope. L'hypothèse avancée dans cette thèse est que le tropisme du CMV pourrait être en partie dû à des modifications post-traductionnelles et principalement à des glycosylations différentielles. J'ai alors comparé l'affinité relative d'une même souche de CMV, produite sur des types cellulaires différents, à interagir avec différentes lectines. Pour cela, j'ai utilisé un système de puces à lectines permettant de déterminer des profils de glycosylation distincts. Par la suite, l'infectiosité du CMV produit sur les deux types cellulaires a été testée.

RESULTATS

1. Caractérisation de l'interaction gB/DC-SIGN

1.1. Introduction

Le CMV peut infecter de nombreux types cellulaires. Parmi eux, les DC représentent une population clef infectée par le CMV. Du fait de leur localisation dans la *lamina propria* des muqueuses ou dans le derme de la peau, elles vont être l'une des premières cibles du virus. De plus, il est probable que le CMV utilise ces cellules comme un cheval de Troie pour s'y dissimuler et s'en servir comme transporteurs pour rejoindre d'autres organes (Haspot et al., 2012). Cette stratégie de détournement des DC est notamment employée par le VIH-1 (Geijtenbeek et al., 2000b). Ce virus utilise entre autres DC-SIGN, une lectine exprimée par les DC, pour interagir avec la cellule. Le CMV peut aussi interagir avec DC-SIGN *via* sa glycoprotéine B d'enveloppe (Halary et al., 2002).

Dans cette première partie, j'ai cherché à mieux caractériser cette interaction en déterminant les domaines impliqués ainsi que l'importance des glycanes portés par la gB. Par la suite, j'ai testé le potentiel d'anticorps anti-gB et anti-DC-SIGN sur l'interaction gB/DC-SIGN ainsi que sur la transmission du virus.

1.2. Matériels et méthodes

Protéines recombinantes

La glycoprotéine B recombinante du CMV, produite en CHO, a été fournie par SANOFI Pasteur (Marcy l'Etoile, France). La gB a été dialysée dans du PBS à l'aide d'une membrane de 6kDa (Cellu Sep, Interchim). La gp120 recombinante du VIH-1 IIIB, produite en CHO, (ImmunoDx, MA, USA) a été réhydratée avec de l'H₂O. Les deux glycoprotéines ont été couplées à la biotine (biotin-XX Microscaleprotein labelling kit, Life Technologies).

Génération de Monoctytes Dérivés de Cellules Dendritiques (MDDC)

Les cellules ont été générées selon le protocole de Sallusto et *al.* (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). En résumé, des monocytes provenant de sang adulte ont été isolés par sélection négative (MiltenyiBiotec, BergischGladbach, Allemagne) ou par élutriation (plateforme DTC, Nantes Université Hopitale/Biogen Ouest, Nantes, France). Les cellules ont été différenciées en MDDC en présence de 20ng/mL de rhIL-4 (Cellgenix, Freiburg, Allemagne), 100ng/mL de rhGM-CSF (Gentaur, Paris, France) et de 2mM de glutamine RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies) supplémentés avec 2% d'albumine humaine (HSA, Vialbex, LFB, France).

Transfection cellulaire

Des HEK 293 T ont été transfectées avec de la lipofectamine 2000 (Invitrogen). Les plasmides codant pour DC-SIGN muté au CRD en position N311A, E347, N349A, V351A, S360A et D367A ont été fournis par Frank Jenkins (Université de Pittsburgh, USA). Des lignées cellulaires stables ont été générées à l'aide de généticine (G-418 disulfate salt, Sigma-Aldrich) à partir des cellules transfectées avec les plasmides codant pour DC-SIGN WT, les mutants Δ CRD et Δ neck et le plasmide contrôle pEGFP. Ces plasmides ont été fournis par Kenneth Jacobson (Université de Caroline du nord, USA). L'expression des plasmides à la membrane cellulaire a été vérifiée par cytométrie de flux à l'aide d'anticorps anti-neck (clone H200) et anti-CRD (clone AZN-D1).

Test d'interaction

Des MDDC ou des transfectants U937 DC-SIGN⁺ ont été resuspendus dans une solution de TBS contenant 1mM de CaCl₂, 2mM de MgCl₂ et 0,1% d'albumine de sérum bovin (BSA) puis mis en plaque 96 puits à 1.10⁵ cellules/puit. Dans le cas des tests d'inhibition de DC-SIGN, les cellules ont été incubées avec les anticorps anti-DC-SIGN purifiés de chez Dendritics (Lyon, France), les anticorps MR1, 1B10, H200 (Santa Cruz Biotechnology INC, CA, USA), AZND1 (Beckman Coulter, CA, USA), l'isotype contrôle (purified NA/LE mouse IgG2a,k, BD phamingen) à 20µg/mL et avec les anticorps anti-DC-SIGN provenant de surnageants (Dendritics) utilisés purs. Les différents bloquants ont été mis à incuber durant 20 min à 4°C puis la gB recombinante couplée à la biotine a été ajoutée à 2µg/mL, sans lavage, durant 20 min à 4°C. Dans le cas des tests d'inhibition de la gB, la glycoprotéine a été utilisée à 2µg/mL et incubée avec les anticorps anti-gB purifiés (Dendritics), l'anticorps polyclonale contrôle (Sino Biological Inc), les anticorps 1G2 et SM5-1 fournis par M. Mach (Spindler et al., 2014), l'isotype contrôle à 20µg/mL et avec les anticorps anti-gB provenant de surnageants (Dendritics) utilisés purs. Les différents bloquants ont été mis à incuber durant 20 min à 4°C puis la gB recombinante et les bloquants ont été ajoutés aux cellules, sans lavage, durant 20 min à 4°C. Après avoir ajouté la streptavidine couplée à l'APC (BD phamingen), la fluorescence a été évaluée par cytométrie en flux (LSR II flow cytometer, BD Biosciences) et analysée avec le logiciel FlowJo (Tree Star).

Tests de *trans*-infection

La partie de blocage de DC-SIGN ou de la gB avec les différents anticorps a été réalisée de la même manière qu'expliquée dans la partie « test d'interaction » en remplaçant la gB recombinante par du CMV. Les souches TB40/E, Toledo, VHL/E et l'isolat clinique TRI ont été utilisés à une MOI de 2. Après la phase de blocage, les cellules et les virus ont été incubés ensemble durant deux heures à 37°C. Les particules virales n'ayant pas interagi avec les cellules ont été enlevées après trois lavages de 1min à

2500 rpm. Ensuite, les cellules ont été mises en coculture sur un tapis de MRC-5 subconfluentes (RD-Biotech, Besançon, France) en plaques 24 puits. Après 72 heures, les MRC-5 ont été lavées puis fixées avec de l'acétone 90% + H₂O 10% et marquées avec un anticorps anti-IE (clone 8B1.2, Millipore, MA, USA). Le pourcentage de MRC-5 infectées a été déterminé en comparant le nombre de cellules totales (DAPI⁺) et les nombres de cellules infectées (IE⁺). Les images ont été acquises par microscopie à fluorescence inversée et analysées avec le logiciel Fiji.

Analyse de glycoprofil

Les plaques sur lesquelles ont été adsorbées avec sept lectines (DC-SIGN, ConA, WGA, MPA, SNA, DSA et UEA-II) ont été réalisées par GLYcoDiag (Lyon, France). Elles ont été saturées durant 30 min à température ambiante avec une solution de TBS contenant 0,05% de Tween, 0,5% de BSA, 1mM de CaCl₂ et 2mM de MgCl₂. Après trois lavages, la gB ou la gp120 recombinantes couplées à la biotine ont été ajoutées à 10µg/mL, 2µg/mL et 0,4µg/mL en triplicatas durant 1 heure à 4°C sous agitation douce. Après 3 lavages, la streptavidine couplée à l'Alexa488® a été ajoutée durant 30 min à 4°C. La fluorescence a été acquise avec le lecteur VICTOR X-series et analysée avec le logiciel PerKinElmer 2030 Manager.

Résonance des plasmoniques de surface

L'expérience de résonance des plasmoniques de surface a été réalisée sur un Biacore T200 avec une puce CM3 fonctionnalisée à 5 µl/mL. La streptactine (société IBA) puis la lectine ont été immobilisées sur une surface (Flow cells : Fc) en utilisant la méthode de couplage des amines. Les surfaces Fc1 et Fc3 ont été préparées comme surface de référence. Fc 1 à 4 ont été activées avec 50 µl d'un mélange de 0,2 M d'ECD / 0,05 M NHS. Après cette étape, Fc1, Fc2, Fc3 et Fc4 ont été fonctionnalisées avec 170 µg / mL de streptactine, puis les groupes activés étant encore activés ont été bloqués avec 80 µl de 1 M d'éthanolamine. Après le blocage, les quatre Fc ont été traitées avec 5 µl de 10 mM HCl pour éliminer les protéines non spécifiquement liées et 5 µl de 50 mM NaOH / 1M NaCl pour préparer la surface à la phase de régénération. Enfin, une moyenne de 2300 RU de streptactine a été immobilisée sur chaque surface. Cette procédure a été répétée pour la fonctionnalisation de DC-SIGN ECD (2421 RU) sur Fc2 et Fc4 respectivement. Pour les études d'interaction directe, des concentrations croissantes de la glycoprotéine B ont été préparées dans un tampon de migration constitué de Tris 25 mM pH 8, NaCl 150 mM, 4 mM de CaCl₂, 0,05% d'agent tensio-actif P20 et 85 µl de chaque échantillon a été injecté sur les surfaces à 30 µl / débit min. Les sensorgrammes résultants ont été corrigés par rapport à la surface de référence. L'affinité apparente de la glycoprotéine B pour l'ECD de DC-SIGN a été déterminée par ajustement du modèle de Langmuir. Dans cette approche de modélisation simplifiée, la surface est considérée comme étant le ligand. Ainsi, le K_d obtenu reflète

l'affinité du ligand pour la surface et non pas pour une lectine individuelle. Toutefois, ce mode d'interaction multi-site sur une surface est plus proche du mode d'interaction réelle à la surface des cellules que de considérer une interaction stoechiométrique avec une seule lectine. Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec V. Porkolab et le docteur F. Fieschi (IBS, Grenoble, France).

Traitement enzymatique

La gB, utilisée à 8µg par condition, a été déglycosylée soit par la PNGaseF à 3000U, par la $\alpha(2-3,6)$ -neuraminidase à 600U (New EnglandBioLabsInc) ou par la $\alpha(1-2,3,6)$ -mannosidase à 2U (Prozyme) durant minimum 18 heures dans une étuve à 37°C. Les enzymes ont été diluées dans leur propre buffer et du PBS. Dans le but de conserver la gB dans sa structure 3D native, les conditions dénaturantes n'ont pas été appliquées. Les enzymes ont été enlevées de l'échantillon par dialyse (Amicon Ultra 0,5mL, Ultracel 50k, Merck Millipore, Cork IRL) contre du PBS.

Western Blot

La gB a été déposée en quantité égale dans un gel à gradient de 4-20% (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Après électrophorèse, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose. La membrane a été incubée avec un anticorps polyclonale anti-gB (Sino Biological Inc) à 0,1µg/mL durant 18 heures à 4°C. L'anticorps primaire a été détecté à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à la peroxidase (Jackson ImmunoResearch). La membrane a été révélée par chimioluminescence (SuperSignal West Pico, Thermo Scientific) (lecteur Fujifilm Life Science, LAS-4000).

Mutagenèse BAC CMV et reconstitution des virus

Les virus mutés ont été générés à partir du BAC TB40-BAC4 GFP, un chromosome artificiel bactérien (BAC) dérivé du CMV-TB40/E, en utilisant la technique de mutagenèse « en passant », tirée du protocole de Tischer et *al.* (Tischer et al., 2010). Le BAC a été fourni par Martin Messerle et Eva Borst (Hannover Medical School, Allemagne). Brièvement, un fragment recombinant a été amplifié à partir du plasmide pEP-S_aphal en utilisant des oligonucléotides contenant la mutation voulue dans la séquence de la gB. Le fragment recombinant a été introduit dans la bactérie E.coli GS1783 et inséré dans le TB40-BAC4 par recombinaison homologue. Toutes les séquences n'étant pas de l'ADN du CMV ont été extraites du BAC par digestion intracellulaire au site I-SceI puis par la «Red recombination ». Le BAC, muté pour trois sites simultanément, a été généré à partir du TB40-BAC4 GFP en insérant un fragment recombinant amplifié à partir du plasmide ori6k-AraC-ccdb-Kan et des oligonucléotides contenant les séquences entourant le site de mutation au sein de la gB. Le fragment recombinant a été introduit dans la bactérie SW102 et inséré dans le TB40-BAC4 par recombinaison homologue. Un produit de PCR contenant les 3 mutations a été inséré dans le TB40-BAC4 par

recombinaison homologue. Dans le but de confirmer l'introduction de la/les mutation(s), chaque mutant a été séquencé. Les virus ont été reconstitués en transfectant des MRC-5 en plaque 6 puits. Les cellules ont été transfectées avec 2µg d'ADN de BAC CMV par un agent de transfection (Jet PEI, Polyplus transfection). Après que 80% des cellules aient été infectées (GFP⁺), elles ont été transférées dans un disque de 10 cm² contenant un tapis de MRC-5 pour promouvoir le transfert du virus de cellules à cellules. Lorsque 100% des cellules ont été infectées, le surnageant a été récupéré et clarifié par centrifugation à 3500 rpm durant 20 min à 4°C.

Test de cinétique de génération des mutants BAC CMV

Les BAC CMV ont été titrés sur MRC-5 par immunofluorescence. Des MRC-5 mises en plaque 24 puits ont été infectées avec les BAC CMV à une MOI de 0,01. Après avoir été lavées avec du PBS, du milieu frais a été ajouté aux MRC-5 18 heures après infection. Le surnageant de culture a été récolté et congelé à -80°C à j+2, j+8, j+13 et j+16 post-infection. Dans le but de déterminer le titre infectieux des surnageants, des MRC-5ensemencées en plaques 24 puits ont été infectées en duplicatas par le surnageant dilué au 1/3. Après 48h, les cellules infectées (GFP⁺) sont comptées sous le microscope à fluorescence. Le titre infectieux est donné en unités par mL (IU/mL).

Analyses statistiques

Les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPadPrism 5.0 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). La comparaison d'échantillons non appariés a été réalisée en utilisant le t test en appliquant la correction de Welch. Les valeurs de *p* inférieures ou égales à 0,05 ont été considérées comme significatives.

1.3. Résultats

Certains acides aminés du CRD sont essentiels pour l'interaction de DC-SIGN avec la gB et la gp120

L'interaction de la gB pour DC-SIGN a été testée sur des lignées cellulaires stablement transfectées qui expriment à leur membrane DC-SIGN et ces mutants Δ -CRD et Δ -neck (figure 31A). La gB n'interagit pas avec les cellules exprimant le plasmide codant pour Δ -CRD. En effet, la fixation de la glycoprotéine pour ce mutant de DC-SIGN est similaire au contrôle négatif (pEGFP). Ces résultats suggèrent que la gB interagit uniquement avec la partie CRD de DC-SIGN. Le mutant Δ -neck diminue légèrement la fixation de la gB (mais de manière non significative) en comparaison avec la forme entière de DC-SIGN. Le neck étant responsable de l'oligomérisation de DC-SIGN, sa délétion peut entraîner la perturbation des micro-domaines de DC-SIGN à la surface de la cellule et ainsi une baisse de l'affinité du récepteur pour son ligand (figure 31B) (Feinberg et al., 2005; Liu et al., 2012).

Certains acides aminés du CRD ont été précédemment décrits comme participant à la fixation du calcium au sein du CRD ainsi qu'à la fixation d'ICAM-2, d'ICAM-3, de la gp120 du VIH-1 et la gB du HHV-8 (Geijtenbeek et al., 2002a; Hensler et al., 2014; Su et al., 2004). Dans le but de déterminer avec plus de précision la zone d'interaction entre DC-SIGN et la gB et de définir si la zone d'interaction du CRD est similaire pour différentes glycoprotéines, j'ai utilisé six mutants ponctuels du CRD : E311A, E347A, N349A, V351A, S360A et D367A (figure 31C).

Les mutations aux positions E347A et N349A diminuent drastiquement la fixation de la gB suggérant que ces acides aminés jouent un rôle crucial dans l'interaction de la gB avec le CRD. Cette baisse d'interaction peut aussi être due à une perturbation du site de fixation au calcium. En effet, quatre acides aminés du CRD forment le site 2 de fixation au Ca^{2+} : E347, N349, E354 et N365 (Feinberg et al., 2001). Le Ca^{2+} ne va pas seulement interagir avec le CRD mais aussi avec le ligand. La perte de la fixation du Ca^{2+} au CRD va donc aussi entraîner la diminution de la fixation du ligand au CRD. Les mutations aux positions V351A et D367A augmentent la fixation de la gB suggérant que ces deux acides aminés jouent aussi un rôle important dans l'interaction du CRD avec la gB. Les mutations E311A et S360A ne semblent pas avoir d'impact sur cette interaction (figure 31D). De plus, ces six mutations ne semblant pas abroger la reconnaissance d'un anticorps anti-CRD (MR1), démontrant que leur structure 3D doit être conservée (figure 31C).

Le profil d'interaction de la gp120 recombinante du VIH-1 pour les six mutants ponctuels du CRD est similaire à celui de la gB du CMV (figure 31E). Ces résultats reproduisent ceux d'études précédentes en démontrant que les acides aminés E347 et N349 du CRD sont importants pour l'interaction de la gp120 (Geijtenbeek et al., 2002a). De plus, ils renforcent aussi l'idée d'un site d'interaction, au sein du CRD, commun pour différents pathogènes. En effet, plusieurs études ont démontré que DC-SIGN interagit avec des ligands du soi (ICAM-2/-3) et des ligands de pathogènes (gp120 VIH-1 et gB HHV-8) sur des sites séparés mais pouvant se chevaucher (Hensler et al., 2014; Su et al., 2004).

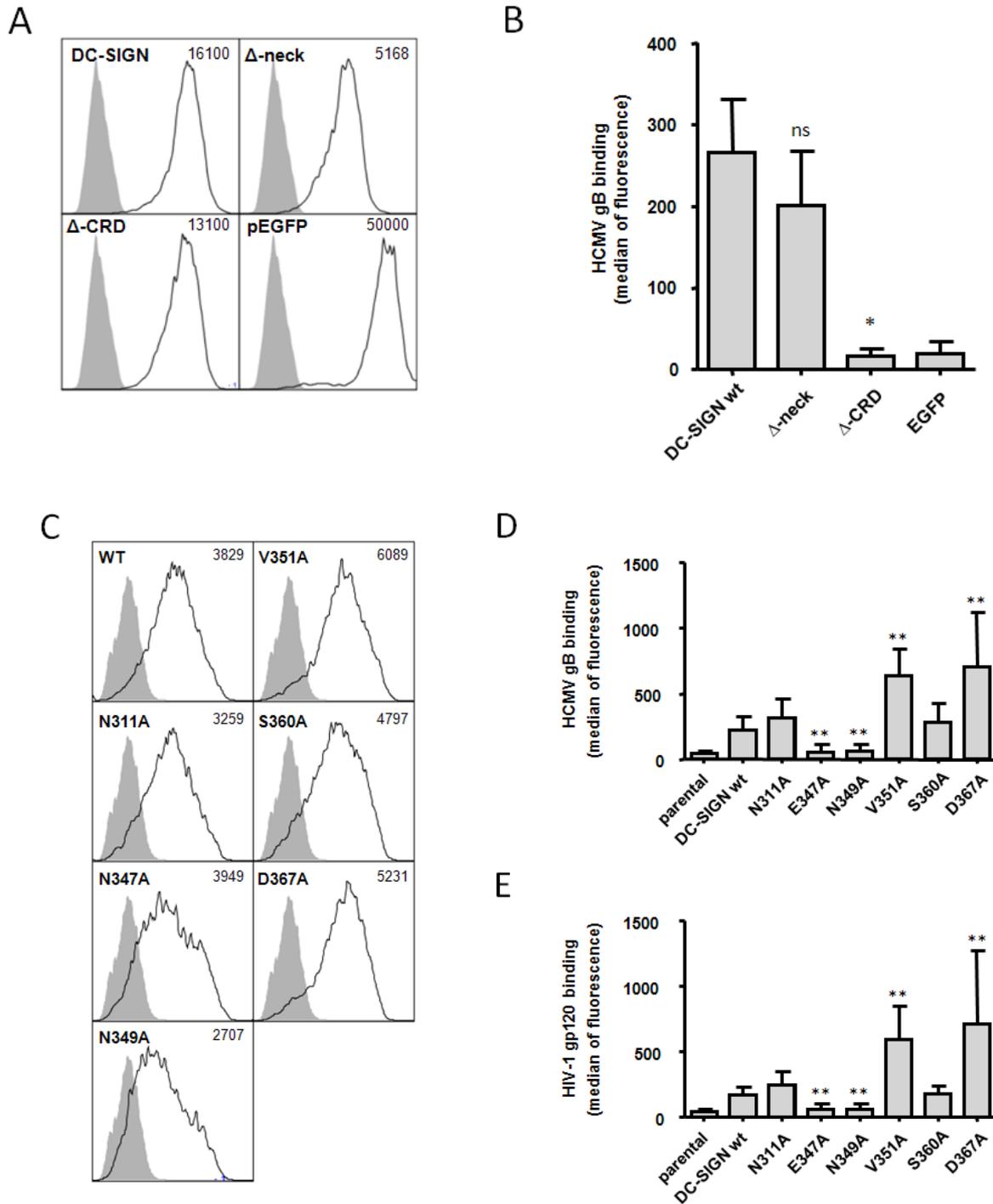


Figure 31

Les acides aminés E347A, N349A, V351A et D367A du CRD sont essentiels pour l'interaction de DC-SIGN avec la gB et la gp120

(A) Les plasmides codant pour DC-SIGN WT, Δ -CRD, Δ -neck et l'EGFP ont été transfectés dans des HEK 293T. L'expression de chaque plasmide a été vérifiée *via* l'intensité du signal GFP (protéine de fusion). (C) Les plasmides codant pour les mutants du CRD N311A, E347, N349A, V351A, S360A et D367A ont été transfectés dans des HEK 293T. L'expression de chaque plasmide a été vérifiée par marquage anti-CRD. (B, D et E) Les cellules transfectées ont été incubées durant 20 min à 4°C avec la gB ou la gp120 recombinante couplées à la biotine à 3 μ g/mL. Après avoir ajouté la streptavidine couplée à l'APC, les résultats ont été analysés par cytométrie en flux.

L'affinité de la gB pour DC-SIGN dépend en partie des glycanes présents à sa surface

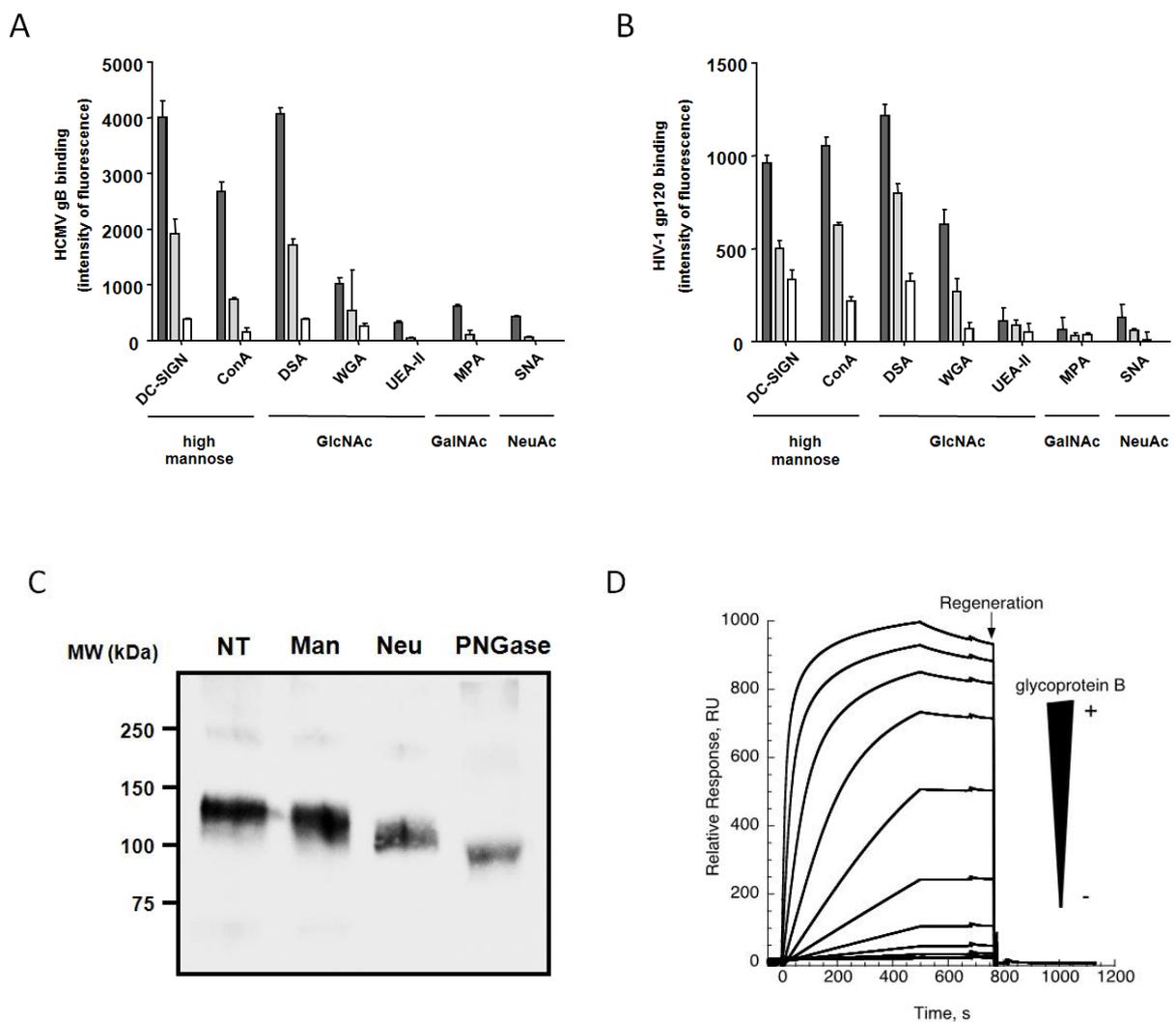
Bien que la gB du CMV et la gp120 du VIH-1 diffèrent au niveau de leur séquence protéique et de leur structure 3D, elles interagissent de manière similaire avec le CRD de DC-SIGN. Il est possible que ces deux glycoprotéines d'enveloppe virale portent des motifs similaires reconnus par DC-SIGN.

Les lectines reconnaissent des sucres portés par leurs ligands. DC-SIGN a été décrite pour être spécifique des structures hautement mannosylées (Feinberg et al., 2001). Les glycoprotéines d'enveloppe virale peuvent être glycosylées par la cellule infectée. Les glycoprotéines virales recombinantes peuvent aussi être glycosylées par la cellule productrice (ici la CHO). Dans le but de déterminer s'il y a un lien entre la similarité des profils d'interaction de la gB et de la gp120, pour le CRD de DC-SIGN et des motifs sucrés portés par ces deux glycoprotéines, le glycoprofil de ces deux protéines virales a été analysé à l'aide d'un panel de sept lectines : DC-SIGN, ConA, DSA, WGA, UEA-II, MPA et SNA. Parmi ces sept lectines, DC-SIGN est une lectine humaine et les six autres sont des lectines de plantes. Chacune d'entre elles est spécifique d'oligosaccharides ce qui a permis de déterminer que la gB et gp120 ont un glycoprofil similaire, bien qu'elles aient un nombre différent de sites potentiels de N-glycosylations (19 pour la gB et 25 pour la gp120) (Mathys et al., 2014).

Les glycanes présentés à la surface de ces deux glycoprotéines sont hétérogènes, ce qui est fréquemment observé sur des protéines produites en CHO. Elles semblent toutes deux porter des structures hautement mannosylées et des N-acétylglucosamines (GlcNAc). En effet, les lectines DC-SIGN et ConA reconnaissent principalement des structures hautement mannosylées. Les lectines DSA et WGA reconnaissent des GlcNAc et plus particulièrement de type $(\text{GlcNAc}\beta 1-4)_3\text{GlcNAc}$ et $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ pour la DSA et de type $\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ pour la WGA (Chabrol et al., 2012; Paessens et al., 2007). En revanche, la gB et la gp120 ne doivent pas ou peu présenter un certain type de GlcNAc, ni des N-acétylglucosamines (GalNAc), ni des fucoses ou des acides sialiques. En effet, ces glycoprotéines ne sont que très peu reconnues par la UEA-II (spécifique de fucose), la MPA (spécifique de $\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}$ et $\text{GalNAc}\alpha 1-6\text{Gal}$), la SNA (spécifique d'acides sialiques en $\alpha 2-3$) (figure 32A et B) (Huang, 2011; Loris, 2000).

Les ligands du soi ICAM-2 et -3 n'ont pas exactement la même zone d'interaction pour le CRD que la gp120. De plus, ces deux récepteurs du soi ont été décrits pour avoir un profil de glycosylation différent de celui de la gp120 (Su et al., 2004). Ceci suggère fortement que les sucres présentés par les glycoprotéines jouent un rôle important dans leur interaction avec une zone précise du CRD de DC-SIGN.

Dans le but de déterminer si les glycanes présents sur la gB ont un rôle dans son interaction avec DC-SIGN, la gB a été déglycosylée par trois enzymes différentes. Le traitement à la PNGase, qui enlève tous les N-glycanes, démontre que la gB recombinante est fortement glycosylée. Elle porte environ 20 kDa de N-glycanes (figure 32C). Après avoir enlevé ces 20 kDa de N-glycanes à la gB, son affinité pour DC-SIGN est diminuée d'un facteur 16, avec un $_{app}Kd$ de 234 μ M pour la gB traitée à la PNGase et un $_{app}Kd$ de 14 μ M pour la forme non traitée. La suppression des mannoses à la surface de la gB semble avoir un impact plus marqué sur l'affinité de la gB pour DC-SIGN que la suppression des acides sialiques. En effet, le traitement à la $\alpha(1-2,3,6)$ -mannosidase, qui enlève les mannoses en position terminale, diminue l'affinité d'un facteur 10 ($_{app}Kd$ de 149 μ M) alors que le traitement à la $\alpha(2-3,6)$ -neuraminidase, qui enlève les acides sialiques en position terminale, diminue l'affinité d'un facteur 2 ($_{app}Kd$ de 25 μ M) (figure 32D et E). L'interaction de DC-SIGN avec la gB est donc dépendante des sucres qu'elle présente à sa surface.



E

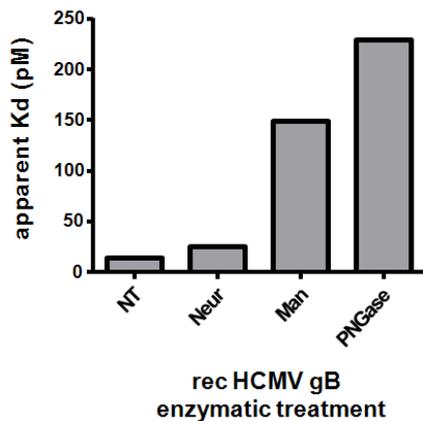


Figure 32

L'affinité de la gB pour DC-SIGN est dépendante des glycanes qu'elle présente

(A) La gB recombinante et (B) la gp120 recombinante couplées à la biotine ont été déposées en trois concentrations différentes : 10µg/mL (barre noire), 2µg/mL (barre grise) et 0,4µg/mL (barre blanche) en triplicatas dans des plaques sur lesquelles ont été adsorbées sept lectines (DC-SIGN, ConA, WGA, MPA, SNA, DSA et UEA-II) durant 1 heure à 4°C sous agitation douce. Après trois lavages, la streptavidine couplée à l'Alexa488® a été ajoutée durant 30 min à 4°C et l'intensité du signal fluorescent a été acquies avec le lecteur VICTOR X-series. (C) La gB non traitée (NT), traitée par une mannosidase (Man), par une neuraminidase (Neu) ou par une PNGase, a été déposée sur un gel à gradient 4-20%. Après transfert sur membrane de nitrocellulose, la gB a été marquée par un anticorps polyclonale anti-gB. (D) L'affinité de la gB pour le domaine extracellulaire de DC-SIGN a été déterminée par Biacore. Différentes dose de gB allant de 0,01 nM à 100 nM ont été testées. (E) Le graphique représente les données obtenues pour l'affinité de la gB traitée par une neuraminidase, une mannosidase et une PNGase avec le domaine extracellulaire de DC-SIGN.

Certains sites de N-glycosylation influent sur l'attachement et l'infectiosité du CMV

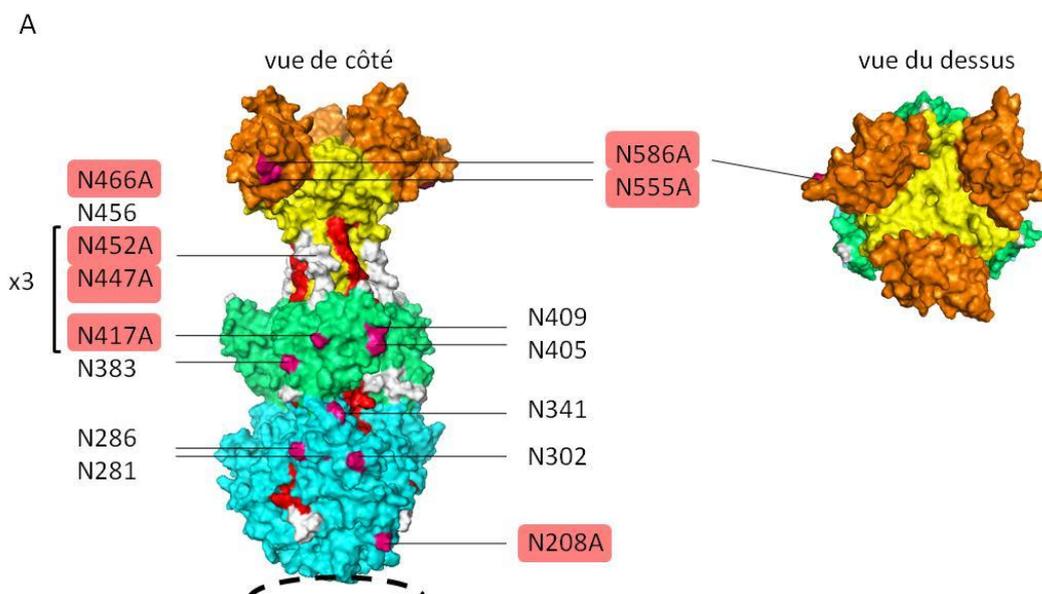
Les glycanes présentés par la gB jouent un rôle important pour son interaction avec DC-SIGN. La gB contient 19 sites de N-glycosylations qui peuvent chacun potentiellement porter un N-glycane. Dans le but de déterminer quels sites de N-glycosylation sont importants pour l'attachement et l'infectiosité du virus, le BAC CMV TB40-BAC4 a été muté dans sa séquence d'acides aminés codant pour la gB (gpUL55).

Les prévisions de glycosylation de certains sites (NetNGlyc) (figure 20 D) ainsi que des expériences préliminaires d'interaction entre la gB mutés ponctuellement pour chacun des 19 sites de N-glycosylation (lysats protéiques) et DC-SIGN sous forme recombinante analysée en dot blot (données non montrées), nous ont permis de sélectionner six mutants ponctuels: N208, N417, N447, N452, N466 et N586 ainsi qu'un triple mutant : N417, N447 et N452 (figure 33A).

La mutation au site N452 permet au virus d'être plus rapidement relargué par les MRC-5 dans le surnageant. En effet, huit jours après l'infection, la quantité de virus titrés dans le surnageant, est augmentée de quatre fois comparé au virus non muté (WT). Au contraire, la mutation au site N208 ralentie la production de virus par les MRC-5. En effet, huit jours après l'infection, la quantité de virus titrés est diminuée de 74 fois comparée au WT. Néanmoins, 16 jours après l'infection, tous les virus atteignent le maximum d'infectiosité (figure 33B et C). À quantité égale de virus déposé sur les MRC-5, les particules virales ne sont pas relarguées à la même vitesse selon les mutants. La mutation au site N452 semble conférer au virus un avantage alors que la mutation au site N208 semble conférer au virus un désavantage pour sa production.

Dans le but de déterminer si les mêmes mutants altèrent la fixation du virus aux MDDC puis sa transmission à des cellules permissives, une expérience de *trans*-infection a été réalisée. Seul le mutant N208A diminue la transmission du virus *via* les MDDC aux MRC-5 (figure 33D). Les N-glycanes portés par l'asparagine N208 de la gB pourraient avoir un rôle dans la fixation du virus à la cellule cible. Les N-glycanes portés par l'asparagine N452 semblent uniquement avoir un rôle dans l'interaction avec les MRC-5 et non pas avec les MDDC.

De plus, lorsque le site N555 est muté, il n'est pas possible de produire du virus en grande quantité. Il est possible que cet acide aminé soit nécessaire pour la production de l'enveloppe du CMV.



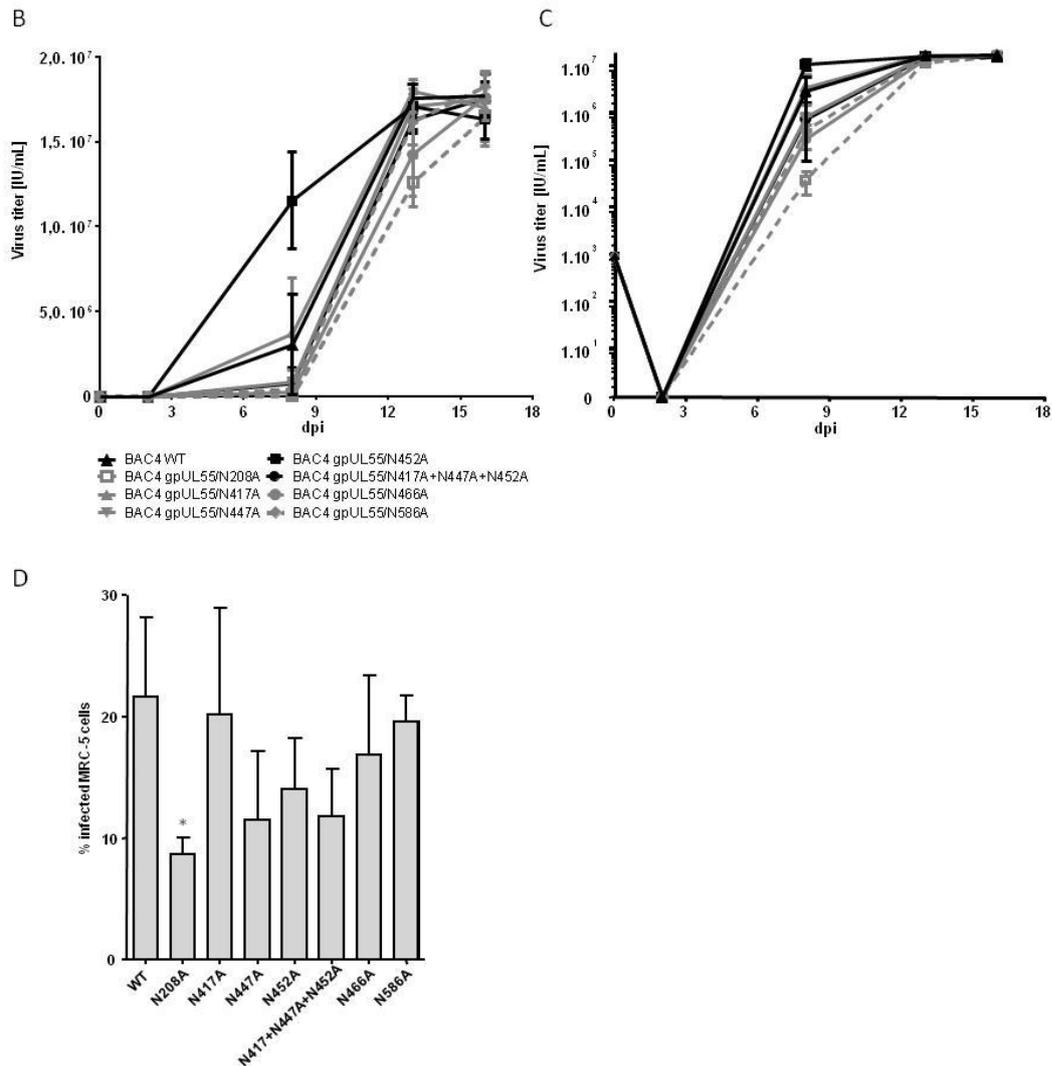


Figure 33

Les sites de N-glycosylation N208 et N452 jouent un rôle important dans l'attachement et l'infectiosité du CMV dépendamment du type cellulaire ciblé

(A) La gB est représentée sous sa forme trimérique. Les sites de N-glycosylation (résidu asparagine) ont été colorés en rose et les sites de N-glycosylation mutés (asparagine en alanine) ont été encadrés en rouge. Au total, il a été généré sept mutants ponctuels (N208A, N417A, N447A, N452A, N466A, N555A et N586A) et un mutant triple (N417A, N447A et N452A). (B et C) Des MRC-5 ont été infectées avec les BAC CMV à une MOI de 0,01. Après avoir été lavées avec du PBS, du milieu frais a été ajouté aux MRC-5 18 heures après infection. Le surnageant de culture a été récolté et congelé à -80°C à j+2, j+8, j+13 et j+16 post-infection. Dans le but de déterminer le titre infectieux des surnageants, des MRC-5 ont été infectées en duplicata par le surnageant dilué au 1/3. Après 48h, les cellules infectées (GFP^+) ont été comptées. Le titre infectieux est donné en unités par mL (IU/mL) (B) en échelle linéaire et (C) en échelle logarithmique. (D) Des MDDC ont été infectés avec les BAC CMV à une MOI de 10 durant deux heures à 37°C . Les particules virales n'ayant pas interagi avec les cellules ont été enlevées par lavages répétés du surnageant. Ensuite, les cellules ont été mises en coculture sur un tapis de MRC-5 subconfluentes. Après 72 heures, les MRC-5 ont été lavées puis fixées. Le pourcentage de MRC-5 infectées a été déterminé en comparant le nombre de cellules totales (DAPI^+) et les nombres de cellules infectées (GFP^+). Les images ont été acquises par microscopie à fluorescence inversée et analysées avec le logiciel Fiji.

Cibler le domaine AD-4 de la gB permet de bloquer la transmission du CMV

Les anticorps anti-gB peuvent constituer une stratégie de premier choix pour bloquer la transmission du CMV. Un panel de 18 anticorps anti-gB a été testé pour sa capacité à bloquer l'interaction entre la gB recombinante et des U937 DC-SIGN⁺. Parmi eux, seuls les épitopes des anticorps 1G2 et SM5-1 sont déterminés, 1G2 est spécifique du domaine AD-5 (domI) et SM5-1 du domaine AD-4 (domII) (Spindler et al., 2014; Spindler et al., 2013). Seul l'anticorps polyclonale contrôle (pAb) est en mesure de bloquer l'interaction gB/DC-SIGN avec un pourcentage d'inhibition similaire au contrôle négatif (U937 parentales). Les anticorps 14, 15, 1G2 et SM5-1 peuvent diminuer la fixation de la gB à son récepteur mais avec un effet moins prononcé (pas plus de 48% d'inhibition) (figure 34A). Des résultats comparables ont été obtenus avec des MDDC, suggérant que DC-SIGN est le récepteur fixé par la gB sur les MDDC (figure 34B).

Les anticorps anti-gB ont été testés pour leur capacité à bloquer, non pas la gB sous sa forme recombinante et soluble, mais une particule entière de CMV. L'anticorps polyclonale contrôle conserve son potentiel bloquant. Néanmoins, l'anticorps SM5-1 bloque la *trans*-infection du CMV avec un potentiel inhibiteur allant de 96,2% à 99,9% et ce indépendamment de la souche utilisée (figure 34C et D). Le domaine AD-4 est le domaine ciblé qui inhibe totalement la transmission du virus. L'anticorps SM5-1 est neutralisant et a été décrit comme reconnaissant la gB sous forme post-fusion (Wiegers et al., 2015). Il est possible que la gB sous forme recombinante et au sein de l'enveloppe, n'ait pas exactement la même conformation 3D. De plus, les autres anticorps testés ne sont pas ou peu bloquants, renforçant l'idée que l'épitope ciblé est crucial.

J'ai démontré précédemment que les glycanes portés par la gB jouent un rôle important dans son interaction avec DC-SIGN. Néanmoins, la fixation des anticorps 14, 15 et du pAb à la gB traitée par la mannosidase ou la neuraminidase ne semble pas être modifiée par l'absence de mannoses ou d'acides sialiques. Ces résultats suggèrent que les anticorps anti-gB testés ne reconnaissent pas les mannoses ni les acides sialiques en position terminale portés par la gB (figure 34E). Il est fort probable que l'épitope reconnu soit de nature protéique et non pas osidique.

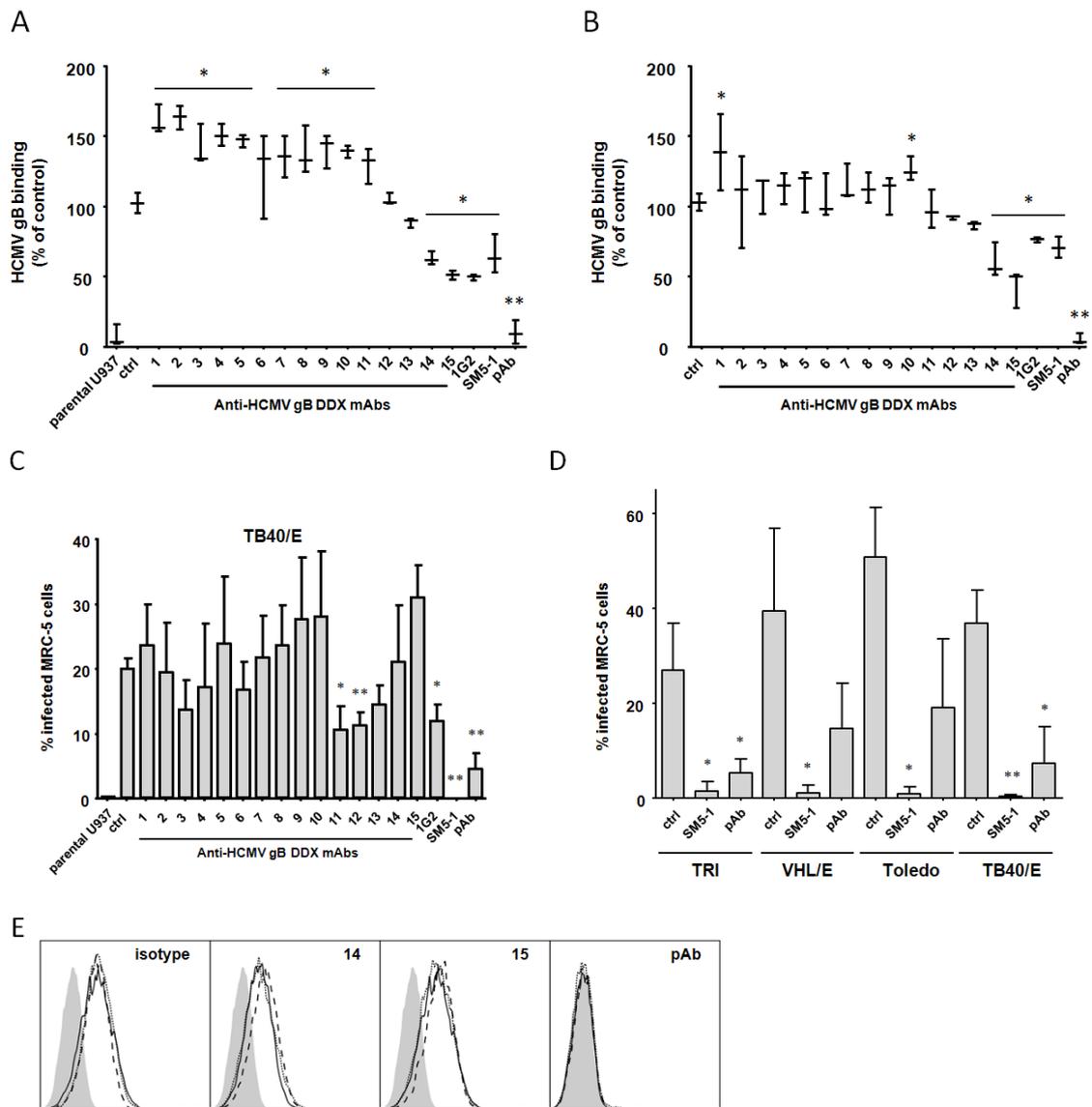


Figure 34

Cibler le domaine AD-4 permet de bloquer la transmission du CMV

La gB a été utilisée à 2µg/mL et incubée avec les anticorps anti-gB purifiés (Dendritics), l'anticorps polyclonale contrôle, les anticorps 1G2 et SM5-1 et l'isotype contrôle à 20µg/mL ainsi qu'avec les anticorps anti-gB provenant de surnageants (Dendritics) utilisés purs durant 20 min à 4°C. La gB et les bloquants ont ensuite été incubés avec (A) des transfectants U937 DC-SIGN⁺ et (B) des MDDC durant 20 min à 4°C. Après avoir ajouté la streptavidine couplée à l'APC, la fluorescence a été acquise par cytométrie en flux. Des expériences de *trans*-infection ont été réalisées avec les anticorps anti-gB. À la place de la gB, (C) la souche TB40/E a été incubée avec des transfectants U937 DC-SIGN⁺ et (D) les souches TB40/E, Toledo, VHL/E et l'isolat clinique TRI ont été incubés avec des MDDC à une MOI de 2 durant deux heures à 37°C. Les cellules ont été mises en coculture sur un tapis de MRC-5 subconfluentes. Après 72 heures, les MRC-5 ont été lavées puis fixées avec de l'acétone 90% et marquées avec un anticorps anti-IE. Le pourcentage de MRC-5 infectées a été déterminé en comparant le nombre de cellules totales (DAPI⁺) et le nombre de cellules infectées (IE⁺). Les images ont été acquises par microscopie à fluorescence inversée. (E) la gB non traitée (ligne pleine), traitée par une mannosidase (ligne en pointillé) ou par une neuraminidase (ligne coupée) ont été utilisées à 2µg/mL et incubées avec l'anticorps polyclonale contrôle et l'isotype contrôle à 20µg/mL et avec les anticorps anti-gB 14 et 15 provenant de surnageants (Dendritics) utilisés purs durant 20 min à 4°C. Les gB et les bloquants ont ensuite été incubés avec des transfectants U937 DC-SIGN⁺ durant 20 min à 4°C. Après avoir ajouté la streptavidine couplée à l'APC, la fluorescence a été acquise par cytométrie en flux.

Les anticorps anti-CRD bloquent l'interaction DC-SIGN/gB

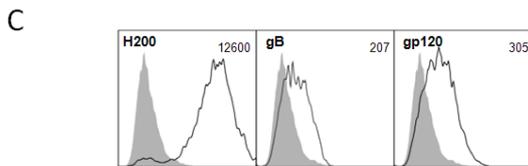
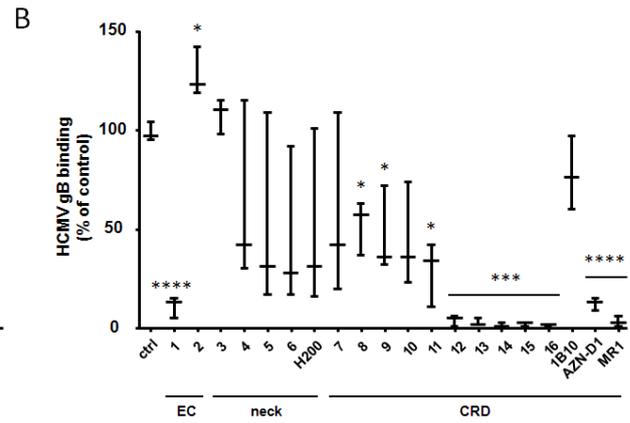
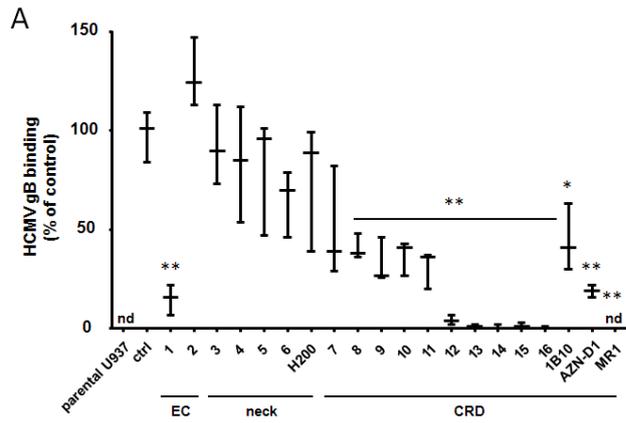
Les anticorps anti-gB peuvent bloquer la transmission du CMV *via* les MDDC à des cellules permissives. Néanmoins, DC-SIGN est une lectine ciblée par divers pathogènes. J'ai démontré que la gp120 du VIH-1 interagit de façon similaire à la gB avec le CRD de DC-SIGN. Bloquer le CRD *via* des anticorps permettrait de limiter la capture de pathogènes par les DC.

Les anticorps anti-DC-SIGN ont été testés pour leur capacité à bloquer l'interaction entre la gB recombinante et des U937 DC-SIGN⁺. Parmi eux, les anticorps anti-CRD sont les plus efficaces pour inhiber la fixation de la gB. Les anti-CRD 12 à 16 montrent un potentiel bloquant entre 93% et 100%. Ils sont plus efficaces que les anticorps commerciaux 1B10 et AZN-D1 et aussi efficaces que l'anticorps MR1. Les anti-CRD 7 à 11 ont un potentiel bloquant plus faible suggérant qu'ils sont moins affins pour DC-SIGN ou que l'épitope fixé est différent. En ciblant la zone extracellulaire proximale (EC), située entre la membrane cellulaire et le neck, la fixation de la gB est diminuée jusqu'à 93% (anticorps 1). Globalement, les anticorps anti-neck ne sont pas ou peu capables de bloquer l'interaction entre la gB et DC-SIGN (figure 35A). Des résultats similaires ont été obtenus avec des MDDC. En bloquant DC-SIGN sur les MDDC, la gB ne peut plus interagir avec ces cellules, confirmant que cette lectine est le seul récepteur de la gB sur les MDDC (figure 35B).

De plus, des études précédentes ont démontré que ces anticorps anti-CRD inhibent la fixation de la gp120 du VIH-1 à des transfectants DC-SIGN⁺ (Canard et al., 2011). Ces résultats renforcent l'idée d'un site de fixation, au sein du CRD, commun à la gB du CMV et la gp120 du VIH-1.

L-SIGN ou DC-SIGNR partage 77% d'homologies avec DC-SIGN et peut elle aussi interagir avec des pathogènes. Tout comme DC-SIGN, cette lectine peut fixer la gB du CMV ainsi que la gp120 du VIH-1 (figure 35C) (Halary et al., 2002). L'interaction entre la gB et L-SIGN peut être inhibée par des anticorps anti-DC-SIGN. De manière similaire à DC-SIGN, les anticorps anti-CRD 12, 14, 15 et 16 bloquent fortement l'interaction gB/L-SIGN (figure 35D). Ces résultats sont cohérents avec la grande homologie existant entre les deux lectines qui laisse supposer l'existence d'épitopes conservés.

Dans le but de déterminer si ces anticorps anti-DC-SIGN peuvent, non pas bloquer uniquement la fixation de la gB, mais aussi la transmission d'une particule entière de CMV, ces anticorps ont été utilisés dans un test de *trans*-infection. En utilisant des U937 DC-SIGN⁺, les particules de CMV ne sont pas capables de *trans*-infecter les MRC-5 en présence d'anticorps anti-CRD. L'anticorps anti-EC conserve son potentiel bloquant. Contrairement à leur effet sur l'interaction de la gB, certains anticorps anti-neck sont capables de bloquer la transmission du virus (figure 35E). L'effet des anticorps anti-DC-SIGN sur les MDDC n'est pas aussi varié. Globalement, seuls les anticorps anti-CRD peuvent inhiber la transmission du virus et ce indépendamment de la souche utilisée (figure 35F, G, H et I).



D

name	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	H200	MR1	AZN-D1	1B10
specificity	EC	EC	neck	neck	neck	neck	CRD	neck	CRD	CRD	CRD									
blocking	+/-	+/-	-	+	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+	+/-	+	+	++	+/-	+/-	-	-

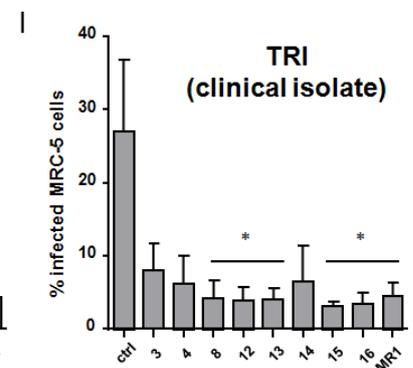
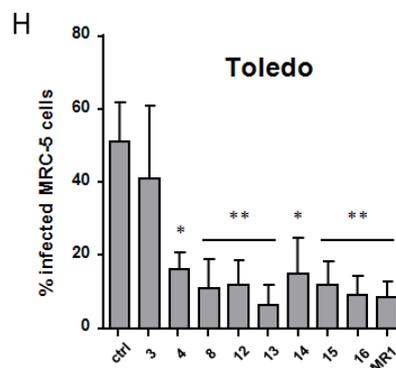
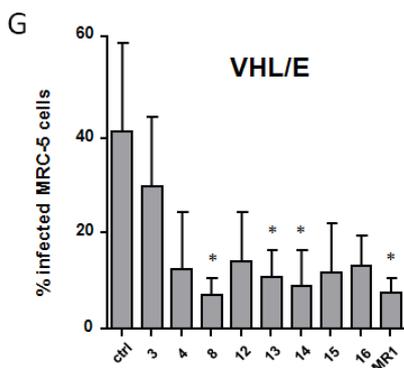
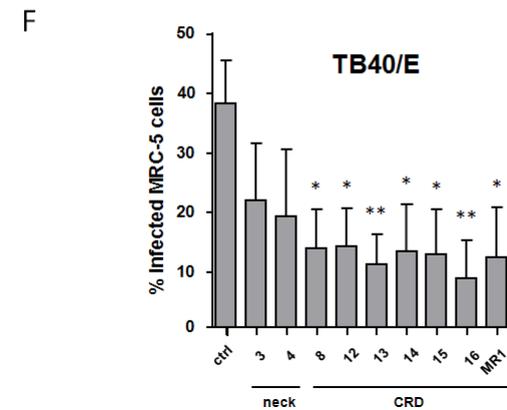
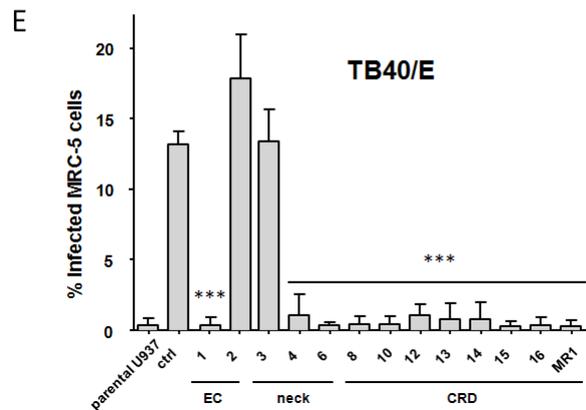


Figure 35

Les anticorps anti-CRD bloquent l'interaction de la gB avec DC-SIGN et L-SIGN ainsi que la transmission du CMV aux cellules permissives

(A) Des transfectants U937 DC-SIGN⁺ ou (B) des MDDC, ont été incubés avec les anticorps anti-DC-SIGN purifiés de chez Dendritics, les anticorps MR1, 1B10, H200, AZND1 et l'isotype contrôle à 20µg/mL, ainsi qu'avec les anticorps anti-DC-SIGN provenant de surnageants (Dendritics) utilisés purses durant 20 min à 4°C. La gB recombinante couplée à la biotine a ensuite été ajoutée à 2µg/mL, sans lavage, durant 20 min à 4°C. Après avoir ajouté la streptavidine couplée à l'APC, la fluorescence a été acquise par cytométrie en flux. (C) Des HEK 293T transfectées avec un plasmide codant pour L-SIGN ont été incubées avec la gB ou la gp120 recombinantes couplées à la biotine. L'expression de L-SIGN à la membrane cellulaire a été vérifiée par marquage du neck avec l'anticorps H200. (D) L'activité des anticorps anti-DC-SIGN a été testée sur les cellules exprimant L-SIGN. Des expériences de *trans*-infection ont été réalisées avec les anticorps anti-DC-SIGN. À la place de la gB, (E) la souche TB40/E a été incubée avec des transfectants U937 DC-SIGN⁺ et (F) les souches TB40/E, (G) VHL/E, (H) Toledo et (I) l'isolat clinique TRI ont été incubés avec des MDDC à une MOI de 2 durant deux heures à 37°C. Les cellules ont été mises en coculture sur un tapis de MRC-5 subconfluentes. Après 72 heures, les MRC-5 ont été lavées puis fixées avec de l'acétone 90% et marquées avec un anticorps anti-IE. Le pourcentage de MRC-5 infectées a été déterminé en comparant le nombre de cellules totales (DAPI⁺) et les nombres de cellules infectées (IE⁺). Les images ont été acquises par microscopie à fluorescence inversée.

1.4. Conclusions et perspectives

L'interaction entre la gB du CMV et la lectine DC-SIGN est essentielle pour l'attachement et le transfert du virus.

J'ai confirmé le rôle du CRD de DC-SIGN dans cette interaction et précisé la zone de fixation de la gB au sein du CRD. Deux acides aminés du CRD, E347 et N349, sont indispensables à la fixation de la gB. En effet, les mutants E347A et N349A abolissent totalement l'interaction. Ces deux acides aminés font parti du site 2 de fixation au calcium qui est composé des acides aminés E347, N349, E354 et N365. Le calcium interagit alors avec le CRD mais aussi le ligand du CRD. Lorsque le calcium ne peut pas venir se fixer dans sa poche, l'interaction du ligand avec son récepteur est diminuée. De manière surprenante, la mutation des sites V351 et D367, qui sont distants d'un acide aminé du site 2 de fixation au calcium, augmente significativement l'interaction du ligand à DC-SIGN. Il est possible que ces mutations favorisent l'accès du ligand à son site de fixation.

J'ai démontré que la gB et la gp120 interagissent de manière identique avec les mutants du CRD et ce malgré leurs différences de structure 3D. Ces données suggèrent fortement que les pathogènes d'origine virale interagissent avec le CRD sur la même zone. De plus, ces deux glycoprotéines ont un profil de glycosylation similaire laissant supposer que ce sont ces glycanes qui vont interagir avec le CRD de manière prépondérante sinon exclusive. Cela reste à être démontré pour la gB du CMV. Cette similarité de glycoprofil semble indépendante du nombre de sites de N-glycosylation. En effet, la gB en contient 19 et la gp120 en contient 25. Le type cellulaire utilisé pour produire les glycoprotéines doit alors avoir une influence majeure sur leur composition en résidus sucrés.

Des études ont démontré que les ICAM-2 et -3 interagissent avec le CRD de DC-SIGN de manière distincte de la gp120 du VIH-1 (Geijtenbeek et al., 2002a). De plus, les glycanes portés par ICAM-2 et -3 seraient différents de ceux retrouvés sur la gp120. Ces données suggèrent l'importance des glycanes pour la fixation au CRD. Il est possible que les glycanes retrouvés sur les pathogènes aient une composition ou une conformation différente des ceux retrouvés sur les glycoprotéines du soi, induisant une interaction sur des zones distinctes de la lectine avec une affinité différente.

J'ai démontré que les glycanes présentés à la surface de la gB et de la gp120 sont hétérogènes. Ces glycoprotéines présentent principalement des structures hautement mannosylées (reconnues par DC-SIGN et la ConA) ainsi que des GlcNAc de type $(\text{GlcNAc}\beta 1-4)_3\text{GlcNAc}$ et $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ (reconnus par la DSA) et de type $\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ (reconnus par la WGA). En revanche, elles ne doivent pas, ou peu, présenter des GalNAc de type $\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}$ et $\text{GalNAc}\alpha 1-6\text{Gal}$ (reconnus par la MPA), ni des fucoses (reconnus par UEA-II) ou des acides sialiques $\alpha 2-3$ (reconnus par la SNA).

De plus, des anticorps anti-LeX et -LeY ne se sont pas montrés efficaces pour bloquer la fixation de la gB à DC-SIGN supposant que ces antigènes de types Lewis ne sont pas directement impliqués dans cette interaction (données non présentées).

J'ai souligné l'importance des glycanes de la gB en lui enlevant certains sucres. L'action de la PNGase, qui enlève tous les N-glycanes, a permis de déterminer que la gB est fortement glycosylée. Elle porte environ 20 kDa de N-glycanes. Après lui avoir enlevé ces 20 kDa de N-glycanes, l'affinité de la gB pour DC-SIGN est diminuée d'un facteur 16. Néanmoins l'affinité de la gB traitée pour DC-SIGN reste élevée (de l'ordre du nM). Il est possible que le traitement enzymatique n'ait pas enlevé tous les N-glycanes portés par la gB (Ma et al., 2011). Ceci peut être dû soit à l'épuisement de l'enzyme, soit à un problème d'accessibilité du site de clivage. De plus, cette enzyme ne coupe pas les N-glycanes portant un fucose branché en $\alpha 1-3$ au GlcNAc liant l'asparagine (information fournisseur Biolabs INC). Les mannosés en position terminale semblent jouer un rôle plus important que les acides sialiques dans l'interaction de la gB avec DC-SIGN.

En mutant certains sites de N-glycosylation dans la séquence protéique de la gB, j'ai pu démontrer que les sites N208 et N452 sont importants pour la génération de particules virales par les MRC-5. Le mutant TB40-BAC-4gpUL55N452 induit une augmentation de la vitesse de production de particules virales dans le surnageant, alors que la mutation TB40-BAC-4gpUL55N208 induit une diminution drastique de la génération de particules de CMV dans le surnageant de culture.

La raison précise de ces différences observées *in vitro* n'est pas encore identifiée ; il est possible qu'il s'agisse d'un défaut de fixation et d'entrée du virus dans les MRC-5, de routage de la protéine au sein de la cellule, d'assemblage de l'enveloppe virale ou encore de sortie du virus. La diminution de

transmission du virus par les MDDC lorsque le BAC est muté en position N208, suggère que cette mutation diminue la fixation du virus à ces récepteurs exprimés par les MDDC et/ou par les MRC-5. Il est possible que les N-glycanes portés par le site N452 ne soient impliqués que dans l'entrée du virus dans les MRC-5. De plus, les mutants TB40-BAC-4gpUL55N555 n'ont produit qu'une très faible quantité de particules virales. Il est possible que cet acide aminé soit nécessaire pour la production de la gB ou son insertion dans l'enveloppe virale du CMV. Cela reste à être démontré formellement.

Pour le moment, aucun composé n'a permis de diminuer drastiquement l'infection par le CMV. Etant donné que la réponse humorale anti-CMV est principalement dirigée contre la gB de l'enveloppe virale, j'ai voulu déterminer si des anticorps anti-gB étaient capables d'inhiber l'interaction gB/DC-SIGN. Seul l'anticorps polyclonal commercial « SinoBiological » a montré un effet bloquant de l'interaction gB/DC-SIGN. La plupart des anticorps testés augmentent l'interaction. Il est possible qu'ils permettent l'agrégation de plusieurs gB permettant l'oligomérisation de la glycoprotéine et de fait, augmentant son avidité pour son récepteur. Néanmoins l'anticorps SM5-1 dirigé contre le domaine AD-4 de la gB qui ne bloque pas l'interaction gB/DC-SIGN est capable de bloquer la transmission du virus et ce indépendamment de la souche de CMV utilisée. Cet anticorps neutralisant a été décrit comme reconnaissant la gB sous sa forme post-fusion (Wiegers et al., 2015). Il est fort probable que la gB sous forme recombinante n'ait pas exactement la même conformation que la gB au sein de l'enveloppe virale.

Dans le but de produire une gB recombinante permettant de générer une réponse humorale performante, il serait intéressant de déterminer les différences et similitudes de conformations de la gB sous forme recombinante et au sein de l'enveloppe du CMV. Il serait aussi envisageable de produire la gB sous différentes conformations pour induire une réponse anti-gB bloquant la gB sous différentes conformations (native, post-attachement, post-fusion...). En effet, la gB recombinante utilisée en phase clinique montre une protection satisfaisante (50% de protection) mais pas suffisante pour traiter l'ensemble des patients (Pass et al., 2009).

Les anticorps anti-gB 14, 15 et le polyclonal contrôle ne reconnaissent pas des épitopes glycaniques. En effet, le potentiel bloquant de ces anticorps n'est pas modifié lorsqu'ils sont testés sur la gB traitée par une mannosidase ou une neuraminidase. L'anticorps polyclonale reconnaît aussi la gB traitée par la PNGase (figure 34C) confirmant que l'épitope reconnu doit être de nature protéique.

La gB n'est pas la seule glycoprotéine d'enveloppe virale pouvant interagir avec DC-SIGN. En effet, DC-SIGN peut fixer une multitude de ligands viraux tels que la gp120 du VIH-1, la gB du HSV-1 ou encore la gB du HHV-8. Ces différents virus sont susceptibles d'utiliser les DC et de les détourner à leur profit. En bloquant l'accès des DC, la dissémination des virus serait stoppée. J'ai voulu

déterminer si des anticorps anti-DC-SIGN sont capables d'inhiber l'interaction gB/DC-SIGN. Les anticorps dirigés contre le CRD sont capables d'inhiber l'interaction gB/DC-SIGN ainsi que la transmission du CMV. Parmi ces anticorps, les anti-CRD 12 à 16 montrent un fort potentiel bloquant alors que les anti-CRD 7 à 11 ne sont pas aussi efficaces, suggérant que les épitopes ciblés sont différents. J'ai tenté de déterminer la spécificité des anticorps anti-CRD en utilisant des peptides de 30 acides aminés codant pour six parties différentes et chevauchantes du CRD. Malheureusement, des interactions non-spécifiques trop grandes, entre certains peptides et le support, n'ont pas permis d'interpréter nos résultats. En ciblant la zone extracellulaire proximale (EC-1), la fixation de la gB et la transmission du virus sont diminués. Il est possible qu'en ciblant ce domaine, DC-SIGN ne puisse pas fixer de manière optimale son ligand. De plus, contrairement à leur effet sur l'interaction de la gB avec DC-SIGN, certains anticorps anti-neck sont capables de bloquer la transmission du virus. Le neck étant responsable de l'oligomérisation de DC-SIGN, en ciblant cette zone, les micro-domaines de DC-SIGN à la surface cellulaire peuvent être dissociés.

Des études précédentes ont démontré que ces anticorps anti-CRD inhibent la fixation de la gp120 du VIH-1 à des transfectants DC-SIGN⁺ (Canard et al., 2011). Ces résultats renforcent l'idée d'un site de fixation, au sein du CRD, commun à la gB du CMV et la gp120 du VIH-1. De plus, ces anticorps peuvent aussi être utilisés sur L-SIGN, un homologue de DC-SIGN, pouvant interagir avec des pathogènes et notamment avec la gB du CMV et la gp120 du VIH-1.

Ces anticorps anti-CRD pourraient être utilisés, non pas pour bloquer uniquement la transmission du CMV, mais aussi la fixation du VIH-1 et d'autres virus à DC-SIGN exprimé par les DC, ainsi qu'aux cellules exprimant L-SIGN.

2. Inhibiteurs saccharidiques de l'interaction gB/DC-SIGN

2.1. Introduction

Il est possible de moduler l'interaction entre les glycanes portés par ces pathogènes et les lectines, en utilisant des molécules qui peuvent physiquement interférer avec cette interaction. Les inhibiteurs glycaniques peuvent être utilisés comme thérapie antivirale (Bernardi et al., 2013). Entre autre, il a été démontré que des composés multivalents contenant des mannoses peuvent inhiber l'interaction entre la gp120 du VIH-1 et DC-SIGN (Varga et al., 2014).

J'ai démontré précédemment que la gB a un glycoprofil très similaire à celui de la gp120 (i.e. les deux sont sécrétées par la lignée CHO) et que ces deux glycoprotéines interagissent avec le CRD de DC-SIGN de manière identique. L'utilisation d'inhibiteurs glycaniques semble être une stratégie pouvant être utilisée sur l'interaction entre la gB du CMV et DC-SIGN.

Dans le cadre de cette étude, deux collaborations ont été mises en place. La première avec le Dr Sébastien Guoin dans le cadre du programme ARMINA. Le projet ARMINA (Alliance de Recherche sur les Maladies Infectieuses Nantes Angers), mené par le Département des Maladies Infectieuses (DMI), a pour vocation de promouvoir les collaborations entre différentes équipes autour d'un point commun : les maladies infectieuses. Le but de cette collaboration est de générer puis de tester des inhibiteurs de DC-SIGN permettant de bloquer l'interaction de la gB du CMV à son récepteur. La deuxième collaboration a été mise en place avec le Dr Mohammed Benazza dans le but de tester le potentiel inhibiteur de composés anti-DC-SIGN sur l'interaction DC-SIGN/gB.

2.2. Matériels et méthodes

Inhibiteurs : collaboration avec le Dr Sébastien Guoin

Les inhibiteurs ont été réalisés par le Dr Sébastien Guoin et Sami Brument (CEISAM, UMR CNRS 6230, Nantes, France). Deux types de composés ont été générés :

- des composés linéaires soit mono-, di-, tri- ou hepta-mannosylés (L1, L2, L3 et L7),
- des composés multivalents mannosylés (M1 à M7).

Par soucis de confidentialité, aucune information supplémentaire sur ces composés ne sera détaillée ici.

Inhibiteurs : collaboration avec le Dr Mohammed Benazza

Les inhibiteurs ont été réalisés par le Dr Mohammed Benazza et Marwa Taouai (LG2A, CNRS, Amiens, France). Les composés 1, 3, 4 et 5 contiennent des fucoses en position terminale et le composé 2 contient des mannoses en position terminale. Par soucis de confidentialité, aucune information supplémentaire sur ces composés ne sera détaillée ici.

Tests de *trans*-infection

Des transfectants U937 DC-SIGN⁺ ont été resuspendus dans une solution de TBS contenant 1mM de CaCl₂, 2mM de MgCl₂ et 0,1% d'albumine de sérum bovin (BSA) puis mis en plaque 96 puits à 1.10⁵ cellules/puit. Les cellules ont été incubées avec les inhibiteurs à 1 mM durant 20 min à 4°C puis le CMV a été ajouté à une MOI de 2, sans lavage, durant deux heures à 37°C. Les particules virales n'ayant pas interagi avec les cellules ont été enlevées après trois lavages de 1 min à 2500 rpm. Ensuite, les cellules ont été mises en coculture sur un tapis de MRC-5 subconfluentes (RD-Biotech, Besançon, France) en plaques 24 puits. Après 48 heures, les MRC-5 ont été lavées puis fixées avec de la PFA 3,7%. Le pourcentage de MRC-5 infectées a été déterminé en comparant le nombre de cellules totales (DAPI⁺) et les nombres de cellules infectées (CMV codant pour la GFP). Les images ont été acquises par microscopie à fluorescence inversée.

Détermination de l'IC50

Des MDDC ont été incubés durant 20 min à 4°C avec les 5 composés ainsi que du mannane (contrôle positif) à différentes concentrations molaires allant de 0,01 μM à 50 μM. La gB recombinante couplée à la biotine a été ajoutée à 3 μg/mL durant 20 min à 4°C. Après avoir ajouté la streptavidine couplée à l'APC (BD phamingen), la fluorescence a été acquise par cytométrie en flux (LSR II flow cytometer, BD Biosciences) et analysée avec le logiciel FlowJo (Tree Star). Les données ont été traitées avec le logiciel Prism.

2.3. Résultats : collaboration avec le Dr Sébastien Gouin

L'effet des ces différents inhibiteurs a d'abord été testé sur l'interaction entre la gB recombinante et des transfectants de DC-SIGN. Seuls les composés linéaires mannosylés ont permis de diminuer la fixation de la gB recombinante aux cellules DC-SIGN⁺. Parmi eux, les composés tri- et heptamannosylés ont montré une forte activité inhibitrice (environ 70%), similaire à celle du contrôle positif, le mannane (résultats non présentés). Le potentiel inhibiteur des composés linéaires et multivalents a ensuite été testé dans une expérience de *trans*-infection. Les composés multivalents (M1 à M7) ne permettent pas de diminuer la *trans*-infection des MRC-5 *via* les cellules DC-SIGN⁺ par le CMV. En effet, le taux de *trans*-infection des MRC-5 en présence de ces composés est similaire au contrôle positif (NT pour Non Traité). Parmi les composé linéaires mannosylés, seuls les composés L3 et L7 sont capables de diminuer notablement la transmission du virus, de manière comparable au contrôle positif (mannane) (figure 36).

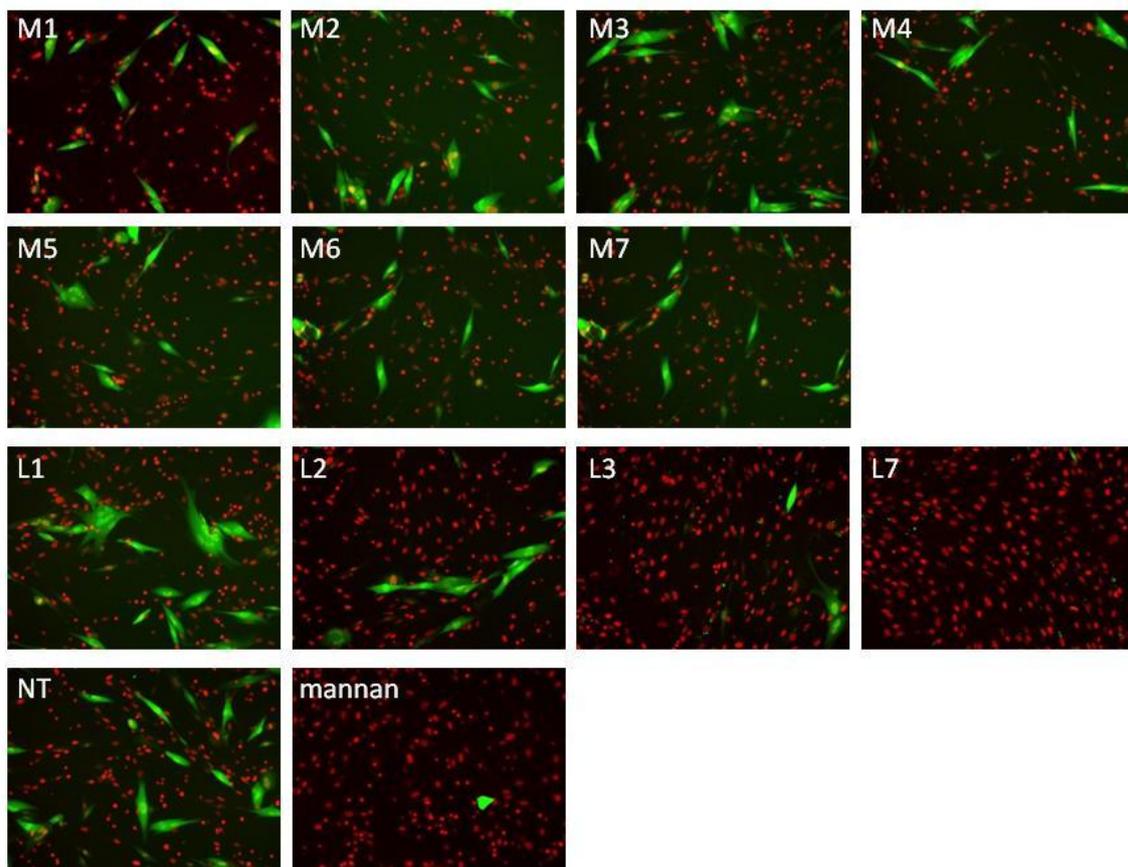


Figure 36

Les composés linéaire tri- et hepta-mannosylés diminuent la transmission du CMV

Des transfectants U937 DC-SIGN⁺ ont été incubés avec les inhibiteurs à 1 mM durant 20 min à 4°C puis le CMV a été ajouté à une MOI de 2, sans lavage, durant deux heures à 37°C. Après lavages, les cellules ont été mises en coculture sur un tapis de MRC-5 subconfluentes. Après 48 heures, les MRC-5 ont été lavées puis fixées avec de la PFA 3,7%. Le pourcentage de MRC-5 infectées a été déterminé en comparant le nombre de cellules totales (DAPI⁺ en rouge) et les nombres de cellules infectées (CMV codant pour la GFP en vert). Les images ont été acquises par microscopie à fluorescence inversée (réalisée une fois).

2.4. Résultats : collaboration avec le Dr Mohammed Benazza

Les composés n'ont pas tous la même capacité pour bloquer l'interaction entre la gB recombinante et DC-SIGN exprimé par les MDDC. Néanmoins, ils peuvent tous inhiber cette interaction lorsqu'ils sont utilisés à la plus forte concentration (50 µM) (figure 37A). Les composés 1, 2 et 5 ont la meilleure activité dans ce test. En effet, leur IC50 est de 188 nM, 156,6 nM et 34,4 nM respectivement (figure 37B, C, F et G). Les composés 3 et 4 ont une activité moindre. En effet, la concentration molaire à utiliser pour obtenir 50% d'inhibition est plus élevée que pour les composés précédents : 777,3 nM pour le composé 3 et 1000,6 nM pour le composé 4 (figure 37D, E et G).

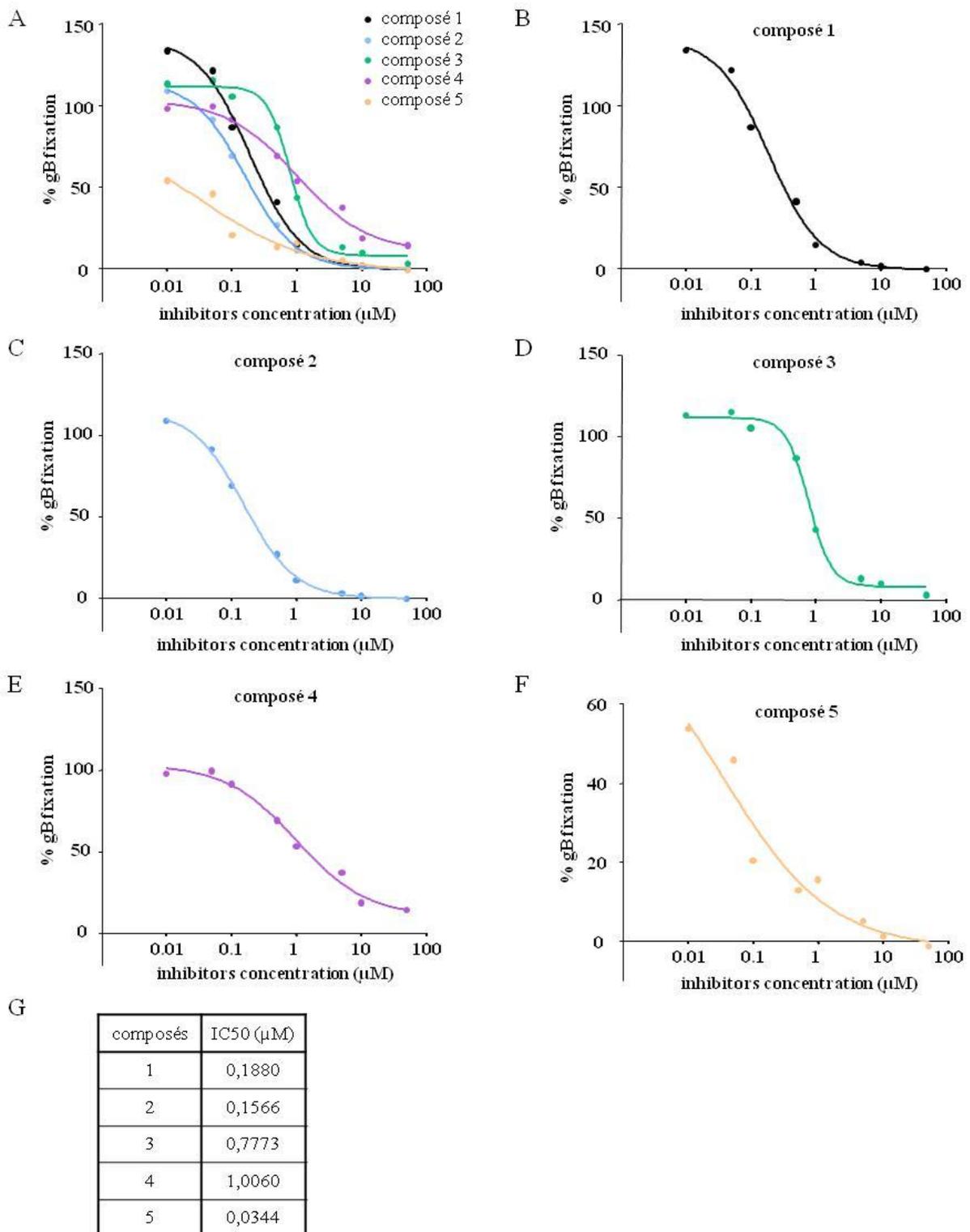


Figure 37

L'interaction entre la gB et des MDDC DC-SIGN⁺ peut être bloquée par des inhibiteurs sucrés

(A-F) Des MDDC DC-SIGN⁺ ont été incubés durant 20 min à 4°C avec 5 inhibiteurs sucrés ainsi que du mannane (contrôle positif, non représenté) à différentes concentrations molaires allant de 0,01 μM à 50 μM . La gB recombinante a été ajoutée à 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durant 20 min à 4°C. Les résultats ont été analysés par cytométrie en flux. (G) Les données ont été traitées avec le logiciel Prism. Les graphiques sont représentatifs d'une expérience (répétée deux fois).

2.5. Conclusions et perspectives

J'ai démontré précédemment que l'interaction entre la gB et DC-SIGN est cruciale pour la liaison du CMV aux MDDC ainsi que pour la transmission du virus *via* les MDDC à des cellules plus permissives. Il est possible d'utiliser des anticorps dirigés contre DC-SIGN pour bloquer cette interaction mais ils doivent être utilisés à de fortes concentrations pour être efficaces. En effet, l'affinité de la gB pour DC-SIGN est très forte avec un_{app}Kd de 14 pM. Pour pouvoir être utilisé à de faibles quantités, le bloquant doit lui aussi avoir une affinité élevée pour DC-SIGN.

Parmi les premiers inhibiteurs testés, provenant de la collaboration avec le Dr Sébastien Gouin, seuls les composés linéaires ont montré un effet bloquant. En effet, les composés linéaires tri- et heptamannosylés se sont montrés efficaces pour inhiber l'interaction de la gB avec des cellules DC-SIGN⁺, ainsi que la transmission du CMV *via* des cellules DC-SIGN⁺. Il est possible qu'en augmentant le nombre de mannoses sur ces composés linéaires, les sites de liaisons de DC-SIGN soient occupés, ne permettant pas au ligand viral de se fixer. Néanmoins, ces composés doivent être utilisés à de fortes concentrations, de l'ordre du micromolaire, pour pouvoir bloquer l'interaction. Les composés multivalents mannosylés n'ont pas montré d'effet inhibiteur. Ces composés ont été réalisés pour pouvoir bloquer les quatre sites de reconnaissances des motifs mannoses de DC-SIGN. La distance vicinale entre deux sites de liaison au ligand est de 40Å (Varga et al., 2014) (Tabarani et al., 2009). Le choix de la taille et de la nature de l'espaceur est ici primordial car elles ont un impact sur l'affinité du composé pour son récepteur. Il est possible que les composés générés n'aient pas la conformation prévue, ne leur permettant pas d'interagir avec DC-SIGN d'une manière optimale.

Les seconds inhibiteurs testés, provenant de la collaboration avec le Dr Mohammed Benazza, ont montré un effet bloquant intéressant. En effet, ces inhibiteurs sucrés testés sont utilisés à de faibles quantités, de l'ordre du nanomolaire, pour bloquer l'interaction gB/DC-SIGN. Les inhibiteurs contenant des fucoses (composés 1 et 5) et celui contenant des mannoses (composé 2) en position terminale ont tous une IC50 d'une faible valeur. Dans ce test, le sucre en position terminale ne semble pas être le facteur le plus important, il est possible que la conformation de l'inhibiteur ainsi que sa structure et sa longueur de chaîne jouent un rôle crucial.

La poursuite de ce travail collaboratif avec le Dr Benazza consistera, pour ma part, en la détermination du potentiel inhibiteur de ces molécules dans un test de blocage de la *trans*-infection du CMV à des cellules permissives, en chargeant des MDDC et des transfectants DC-SIGN⁺ tels que les U937 qui ont déjà été utilisées précédemment. Côté synthèse, les meilleurs composés pourront servir de base de synthèse pour des composés modifiés qui seront testés à leur tour dans les deux types de tests mis en œuvre durant ce travail de thèse.

3. Caractérisation de l'interaction gB/langérine

3.1. Introduction

La langérine a été décrite comme pouvant interagir avec la gp120 du VIH-1. Cette interaction permettant ainsi la capture du virus puis sa dégradation dans les granules de Birbeck (de Witte et al., 2007). Contrairement aux DC DC-SIGN⁺ qui permettent la dissémination du VIH-1, les LC empêcheraient cette dissémination. En ce qui concerne le CMV, les travaux de Hertel et *al.* ont démontré que les LC matures, contrairement aux LC immatures, sont susceptibles à l'infection par CMV (Hertel et al., 2003). Néanmoins, aucune interaction ligand/récepteur n'a été décrite pour l'infection des LC par le CMV.

La langérine étant exprimée par un sous-type de DC et faisant parti des lectines de type C (comme DC-SIGN), j'ai cherché à déterminer si la langérine peut interagir avec la glycoprotéine B du CMV.

3.2. Matériels et méthodes

Test d'interaction

Le plasmide codant pour la langérine (pCEV4-M-langerine) a été transfecté dans des HEK 293T en utilisant 1 μ L d'agent de transfection (TurboFect, Life Technologies). Des doses croissantes de ce plasmide : 0,1 μ g, 0,2 μ g, 0,3 μ g et 0,4 μ g ont été testées, ainsi qu'un plasmide contrôle pRcCMV, en conservant la même quantité d'agent de transfection. Les cellules ont été utilisées à j+3. L'expression de la langérine à la membrane cellulaire a été déterminée par un anticorps anti-langérine (clone 817G7, Dendritics, Lyon, France). La fixation de la gB à ces cellules a été déterminée en incubant au préalable les cellules durant 20 min à 4°C avec un isotype ou un anticorps anti-langérine (clone 817G7) à une concentration de 20 μ g/mL. La gB recombinante (SANOFI Pasteur, Paris, France) couplée à la biotine a été ajoutée par la suite à une concentration de 3 μ g/ μ L durant 20 min à 4°C. Après avoir ajouté la streptavidine couplée à l'APC (BD phamingen), la fluorescence a été acquise par cytométrie en flux (LSR II flow cytometer, BD Biosciences) et analysée avec le logiciel FlowJo (Tree Star).

Extraction de LC de la peau humaine

Les LC de la peau ont été extraites selon le protocole décrit par Navarro et *al.* (Peguet-Navarro et al., 1994). Brièvement, la peau de patients sains a été obtenue suite à une chirurgie plastique. Après avoir enlevé le tissu adipeux, la peau a été découpée en plusieurs morceaux et incubée pendant 18h à 4°C avec de la trypsine. L'épiderme a été séparé du derme à l'aide de pinces fines puis dissocié par pipetages successifs. Après filtration, et selon les applications, les LC sont utilisées telles quelles ou

isolées par tri magnétique avec des microbilles paramagnétiques (kit Miltenyi microbilles CD1a, Miltenyi Biotech GmbH).

Test de blocage de la langérine

Les Langerhans de la peau ont été incubées durant 20 min à 4°C avec un isotype, des anticorps anti-langérine (clone DCGM4, Beckman Coulter) (clone 817G7), de la gB recombinante non marquée ou du mannane (Sigma-aldrich) à 20 µg/mL. La gB recombinante couplée à la biotine a été ajoutée à 3 µg/mL durant 20 min à 4°C. Après avoir ajouté la streptavidine couplée à l'APC (BD phamingen), la fluorescence a été acquise par cytométrie en flux (LSR II flow cytometer, BD Biosciences). L'analyse a été réalisée sur les cellules CD1a⁺.

Biacore

Cf. partie « caractérisation de l'interaction gB/DC-SIGN »

3.3. Résultats

Dans un premier temps, j'ai voulu déterminer si la gB pouvait interagir avec la langérine. Pour cela, j'ai transfecté des cellules HEK 293T avec un plasmide codant pour la langérine. Les HEK 293T transfectées avec le plasmide codant pour la langérine, contrairement au plasmide contrôle pRcCMV, vont exprimer la langérine à la membrane cellulaire. De plus, lorsque l'on transfecte le plasmide à des doses croissantes, le niveau d'expression de la langérine à la membrane augmente en fonction de la quantité d'ADN transfecté (figure 38A et B).

De même, plus on augmente l'expression de la langérine à la membrane cellulaire, plus la gB recombinante se fixe aux cellules. Cette interaction est bien dépendante de la langérine car lorsque ce récepteur est bloqué par un anticorps anti-langérine, la gB ne peut plus se fixer aux cellules en comparaison d'un isotype contrôle (figure 38C).

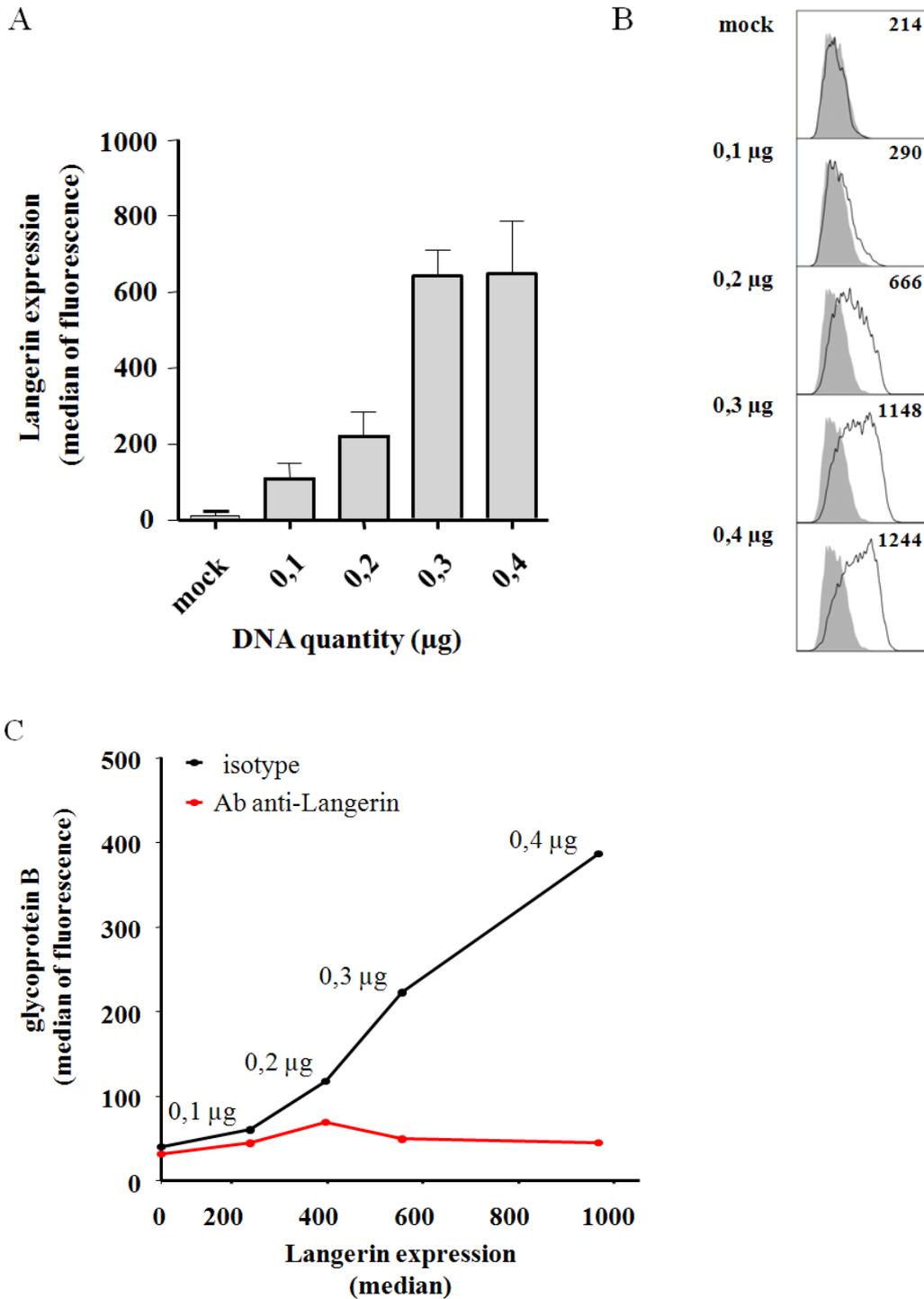


Figure 38

La gB interagit avec la langérine dépendamment de son niveau d'expression

(A et B) Des cellules HEK 293T ont été transfectées avec des quantités croissantes de plasmide codant pour la langérine : 0,1 µg, 0,2 µg, 0,3 µg et 0,4 µg ainsi qu'avec un plasmide contrôle pRcCMV (mock). Ces cellules ont ensuite été marquées avec un anticorps anti-langérine. (C) Les cellules transfectées avec différentes quantités d'ADN codant pour la langérine ont été incubées durant 20min à 4°C soit avec un isotype contrôle (ligne noire) soit avec un anticorps anti-langérine (ligne rouge) à une concentration de 20 µg/mL. La gB recombinante a été ajoutée à 3µg/mL directement après. Le graphique est représentatif de 6 expériences (n=6). Les résultats ont été analysés par cytométrie en flux.

Afin de déterminer si la gB peut interagir, non pas avec des transfectants exprimant la langérine, mais avec des cellules de Langerhans Bona Fide (LC BF), des LC de peau humaine saine ont été extraites. À l'aide de ces cellules, j'ai déterminé que la gB peut fixer les LC BF et de manière dépendante de la langérine. En effet, deux anticorps anti-langérine, les clones DCGM4 et 817G7, inhibent la fixation de la gB aux LC BF (figure 39). Ces deux anticorps étant dirigés contre la partie CRD de la lectine, la gB doit alors interagir avec la langérine *via* son CRD. Le mannane est aussi capable d'inhiber cette interaction, confirmant que la langérine interagit avec des résidus mannosylés. Le mannane peut entrer en compétition avec la gB pour la fixation à la langérine (figure 39). Le site de fixation du mannane au sein du CRD de la langérine doit être proche de celui de la gB.

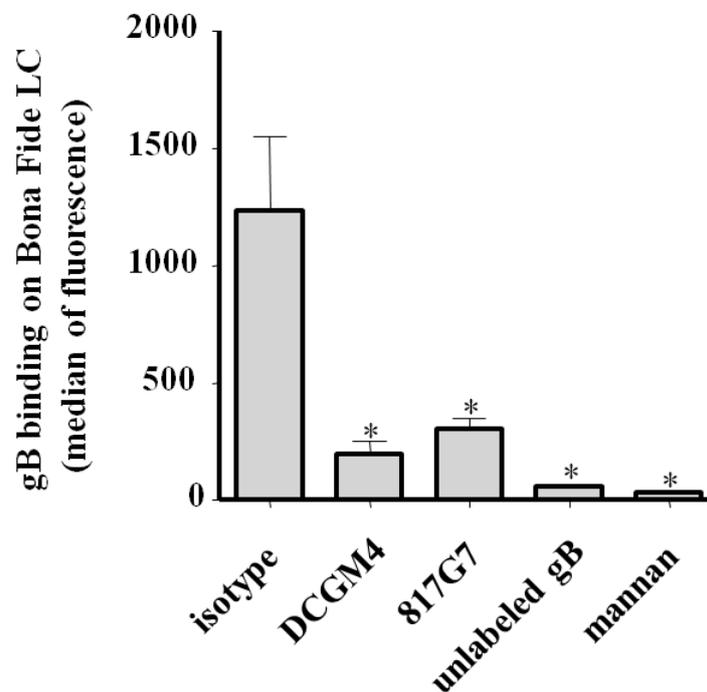


Figure 39

La gB interagit avec les LC Bona Fide *via* la langérine

Les LC ont été extraites à partir de peau humaine saine. L'analyse a été effectuée sur les cellules CD1a⁺. Les cellules ont été incubées durant 20 min à 4°C avec l'isotype, les anticorps anti-langérine (clone DCGM4 et 817G7), de la gB recombinante non marquée ou du mannane à une concentration finale de 20 µg/mL. La gB recombinante a été ajoutée à 3µg/mL. Les résultats ont été analysés par cytométrie en flux.

La langérine est une lectine de type C reconnaissant des oligosaccharides. Elle a été décrite comme reconnaissant spécifiquement des oligosaccharides avec des mannoses ou des GlcNAc en position terminale, ainsi que des oligosaccharides contenant du galactose lié à un fucose en position terminale (Feinberg et al., 2010; Holla and Skerra, 2011). J'ai démontré précédemment que la gB est une glycoprotéine fortement glycosylée (environ 20 kDa de N-glycanes) et qu'elle porte des structures mannosylées. De plus, les glycanes qu'elle contient ont un impact sur son interaction avec DC-SIGN.

Dans le but de déterminer l'affinité de la gB pour la langérine, une expérience de Biacore a été réalisée. Dans ces expériences menées en collaboration avec l'équipe du Pr Franck Fieschi, la gB a un $_{app}Kd$ de 0,356 nM signifiant que son affinité pour la langérine est forte (figure 40A et E). Dans le but de déterminer l'importance des glycanes présentés par la gB dans son interaction avec la langérine, cette glycoprotéine a été traitée enzymatiquement. Le traitement à la PNGase, qui clive les N-glycanes liés à l'Asn, augmente la valeur du $_{app}Kd$ de 10 fois. L'affinité de la gB ne portant plus de N-glycanes pour la langérine est donc fortement diminuée (figure 40B et E). Les mannoses et les acides sialiques semblent tous deux avoir un rôle dans la fixation de la gB à la langérine. En effet, l'affinité de la gB est diminuée après traitement par la mannosidase ou la neuraminidase. Néanmoins, les mannoses portés par la gB semblent avoir un rôle plus important que les acides sialiques pour son interaction avec la langérine. Dans le premier cas, le $_{app}Kd$ est augmenté de plus de trois fois (figure 40C et E) alors que dans le second cas il n'est augmenté que de deux fois (figure 40D et E).

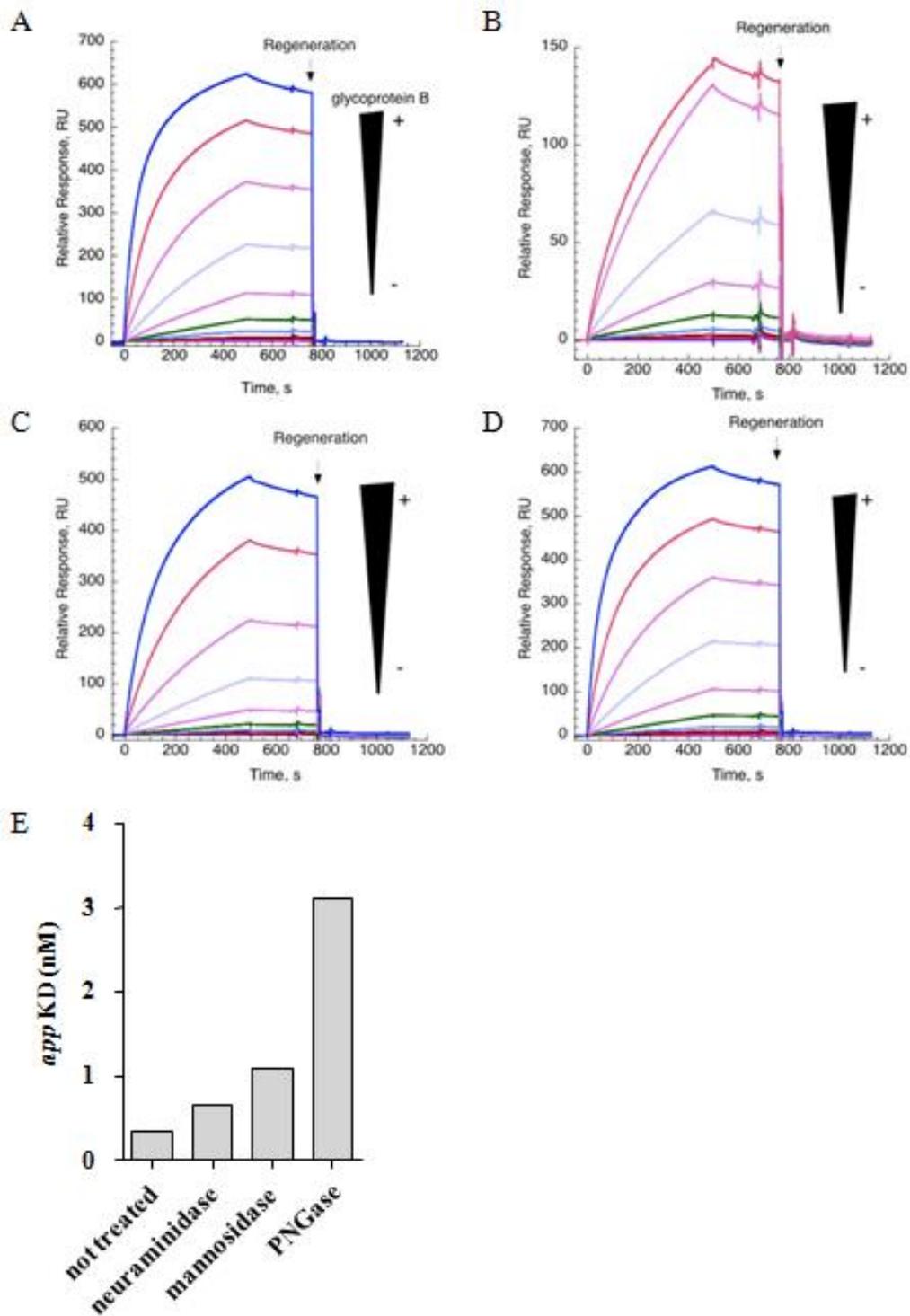


Figure 40

L'affinité de la gB pour la langérine dépend des glycanes qu'elle présente

Les sensorgrammes représentent la titration de la gB sur une surface contenant le domaine extracellulaire (ECD) de la langérine. La gB a été testée à différentes concentrations allant de 0,6 pM à 100 nM. La flèche noire désigne le début de la phase de régénération. La gB a été testée après différents traitements (A) non traitée, (B) traitée par la PNGase, (C) traitée par la mannosidase et (D) traitée par la neuraminidase. (E) L'affinité relative ($app\ K_D$, nM) de la gB pour la langérine a été déterminée en utilisant le modèle cinétique 1:1 interaction (kinetic model 1:1 binding).

3.4. Conclusions et perspectives

Tout comme pour DC-SIGN, la gB du CMV interagit de manière spécifique avec la partie CRD de la langérine. Ce qui confirme la forte similitude structurelle entre ces deux lectines ainsi que leur capacité commune pour interagir avec des glycoprotéines virales. Ces données confirment la conservation de la reconnaissance par la langérine et DC-SIGN, de glycoprotéines d'enveloppe virale comme la gp120 du HIV-1. J'ai pu déterminer cette spécificité en utilisant des transfectants exprimant la langérine mais surtout des cellules de Langerhans extraites de peau humaine saine. De plus, cette interaction peut être bloquée par des anticorps dirigés contre la langérine ainsi qu'en utilisant du mannane. Comme je l'ai démontré pour DC-SIGN, les sucres présents sur la gB ont un rôle crucial pour son interaction avec la langérine. En effet, si les mannoses ou les acides sialiques sont clivés, l'affinité de la gB pour la langérine est diminuée.

Les LC peuvent être infectées par le CMV mais aucune base moléculaire n'avait pour le moment été décrite et notamment le rôle de la langérine. C'est donc une première étape dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la capture du CMV par les LC. Pour aller plus loin dans cette compréhension, il serait intéressant de déterminer si cette interaction est nécessaire pour l'infection des LC par le CMV ainsi que pour sa transmission à des cellules permissives comme cela a déjà été fait avec les MDDC. Des expériences de *cis*-infection de LC et de *trans*-infection de MRC-5 seront réalisées pour répondre à ces questions. Il a été démontré que les LC, contrairement aux DC, ne disséminent pas le VIH-1 mais le dégradent. Il est possible qu'après être entré dans les LC, le CMV soit lui aussi dégradé dans les granules de Birbeck. Pour répondre à cette question je compte réaliser des expériences d'infection analysées par MET. Il est également envisagé de tester les inhibiteurs sucrés décrits précédemment sur l'interaction gB/DC-SIGN sur cette interaction gB/langérine.

4. Tropisme du CMV et glycosylations

4.1. Introduction

Le tropisme d'un virus est sa capacité à infecter et effectuer un cycle répliatif dans un type cellulaire particulier. Le CMV peut être fibroblastotrope ou endothéliotrope (et leucotrope) (Sinzger and Jahn, 1996). Ce tropisme différentiel a été récemment imputé à un groupe de gènes viraux et plus particulièrement à celui codant pour le complexe pentamérique (PC) comprenant les protéines gH, gL, UL128, UL130 et UL131A (Dargan et al., 2010; Hahn et al., 2004; Ryckman et al., 2006; Wang and Shenk, 2005). Ce PC serait nécessaire au virus pour infecter les cellules endothéliales (souche endothéliotrope). De ce fait, les virus n'étant pas pourvus de ce complexe seraient moins efficaces pour infecter les cellules endothéliales (souche fibroblastotrope).

Néanmoins, d'autres hypothèses ne sont pas à exclure. En effet, il a été observé qu'après avoir passé plusieurs fois une souche endothéliotrope sur des fibroblastes, cette souche endothéliotrope perd son tropisme, autrement dit sa capacité à infecter des cellules endothéliales. Il se peut que le génome viral ait muté. Néanmoins, les mutations génétiques stablement établies dans le génome viral et altérant des gènes impliqués dans le tropisme n'apparaissent qu'après environ 10 à 20 passages (Dargan et al., 2010; Sijmons et al., 2014). Alors, une mutation du PC (entre autres) sera stable au sein du génome viral et appliquée à la majorité de l'inoculum viral qu'après plusieurs passages.

Depuis plusieurs années, la notion de glycovirologie est apparue dans la littérature scientifique. Elle a mis en évidence le rôle et l'importance des glycosylations dans les mécanismes d'infection. En effet, les glycosylations de glycoprotéines virales ont été décrites pour jouer un rôle important dans le tropisme de différents virus tels que le VIH-1 (Ogert et al., 2001; Tsuchiya et al., 2013; Wood et al., 2013), Ebola (Martinez et al., 2013), le virus de la dengue (Mondotte et al., 2007) ou encore le LCMV (Bonhomme et al., 2013). La modification de sites de N-glycosylations ou des N-glycanes du virus aurait pour conséquence de modifier l'entrée, la virulence ou le tropisme de ces virus.

L'hypothèse avancée dans cette thèse est que le tropisme du CMV pourrait être en partie dû à des différences de glycosylations lors de la néosynthèse virale, dépendant du type cellulaire infecté et conduisant à la génération de glycotypes distincts de l'enveloppe du CMV.

4.2. Matériels et méthodes

Stock et quantification virale

Les stocks de virus produits sur HEC (Human Endothelial Cells) et HFF (Human Foreskin Fibroblasts) ont été générés de la manière suivante : le BAC CMV TB40-BAC4 a été transfecté dans des HEC ou des HFF. Les particules virales relarguées dans le surnageant de culture ont été purifiées et concentrées par gradient de tartrate (collaboration avec le Pr Christian Sinzger, Ulm, Allemagne). Elles ont ensuite été quantifiées par qPCR (Takara, Clontech) pour éviter les possibles biais de la titration par infection (dû au type cellulaire choisi).

Plaque à lectines

Les virus titrés produits sur HEC ou HFF ont été déposés à une quantité de $8 \cdot 10^6$ copies de génome par puit, dans des plaques sur lesquelles ont été adsorbées un panel de 17 lectines (GLYcoDiag, Lyon, France). Chaque condition a été réalisée en triplicatas. Après deux heures d'incubation, les plaques ont été lavées puis incubées avec une solution contenant du sucrose à 10% pour décrocher les virus ayant interagis avec les lectines. L'ADN viral a été extrait (NucleoSpin 96 Virus, Macherey-Nagel) puis titré en duplicatas par qPCR.

Infection

Des cellules HEC, RPE (Retinal Pigment Epithelium), HFF et MRC-5 (Human Fetal Lung Fibroblast cells) ont été mises en plaque 24 puits et infectées par les virus produits sur HEC ou HFF en 4 quantités: $7 \cdot 10^8$; $3,5 \cdot 10^8$; $7 \cdot 10^7$ et $3,5 \cdot 10^7$ copies de génome. Les cellules ont été fixées avec de l'acétone 90% et marquées avec un anticorps anti IE couplé à l'Alexa488® (clone 8B1.2, MerckMillipore) à 48h post-infection. Le pourcentage de cellules infectées a été calculé en fonction du nombre de cellules infectées et du nombre de cellules totales (Fiji, software).

4.3. Résultats

Les structures des glycanes à la surface des protéines sont très variées. En effet, elles peuvent différer par leur nombre d'antennes ainsi que par leur composition en saccharides (N-glycanes de type oligomannosidique, hybride ou complexe). Dans le but de déterminer si le type cellulaire infecté par le CMV a un impact sur la composition des glycanes de l'enveloppe virale, de l'ADN du CMV (CMV TB40-BAC4) a été transfecté dans des HEC et des HFF. Le glycoprofil des virus relargués a été analysé à l'aide de plaques sur lesquelles ont été adsorbées différentes lectines. Ces plaques contiennent 15 lectines de plantes dont la spécificité glycanique a été bien détaillée dans la littérature, ainsi que deux lectines humaines, DC-SIGN et la langérine, qui sont des lectines étudiées dans l'équipe pour leur interaction avec le CMV et dont la spécificité glycanique est connue. Etant donné que les lectines sont spécifiques d'oligosaccharides, en choisissant 17 lectines reconnaissant des oligosaccharides divers, il est possible d'établir le profil des sucres (ou glycoprofil) présents à la surface d'un ligand en évaluant la fixation différentielle du ligand sur ce panel de lectines.

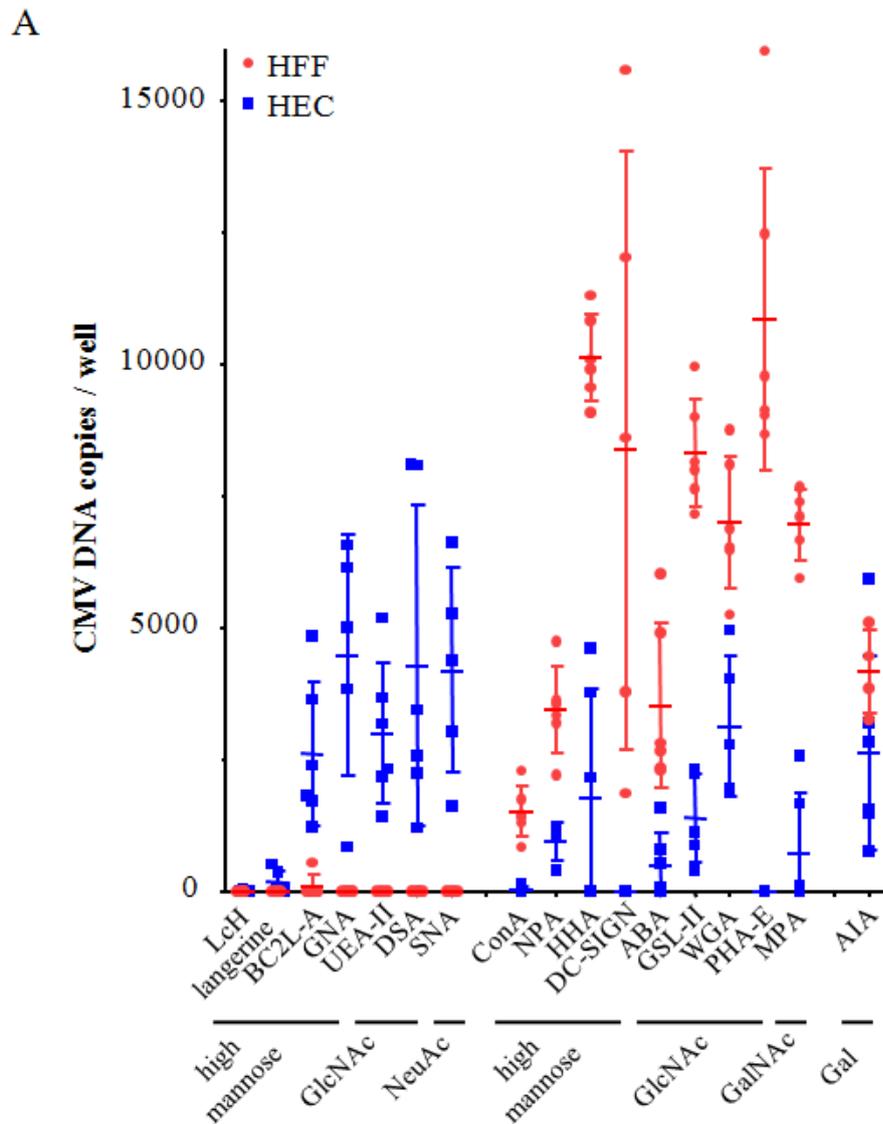
Les particules virales produites sur deux types cellulaires différents (HEC ou HFF) portent à leur enveloppe des glycanes bien distincts. En effet, cinq lectines : BC2L-A, GNA, UEA-II, DSA et SNA fixent uniquement les virus produits sur HEC (bleu) alors que neuf lectines : ConA, NPA, HHA, DC-SIGN, ABA, GSL-II, WGA, PHA-E et MPA reconnaissent avec une plus forte affinité les virus produits sur HFF (rouge) (figure 41A).

Les deux « types de virus » portent des structures hautement mannosylées et des N-acétylglucosamines (GlcNAc) mais ceux-ci ne sont pas similaires dans les deux cas. En effet, les structures hautement mannosylées et les GlcNAc portés par chaque virus ne sont pas reconnus par les mêmes lectines. Les virus produits sur HEC portent des structures hautement mannosylées (reconnues par BC2L-A et la GNA) et des GlcNAc de type $(\text{GlcNAc}\beta 1-4)_3\text{GlcNAc}$ et $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ (reconnus par la DSA) et de type $(\text{GlcNAc}\beta 1-4)_n$ (reconnus par UEA-II). Les virus produits sur HFF portent des structures hautement mannosylées (reconnues par la ConA, la NPA, la HHA et DC-SIGN) et des GlcNAc de type $\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}$ (reconnus par ABA), des GlcNAc en position terminale (reconnus par GSL-II), de type $\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ (reconnus par la WGA) et de type $\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}\beta 1,2\text{Man}\alpha 1,6$ (reconnus par PHA-E).

Une des différences majeures entre les deux glycoprofiles est la présence d'acides sialiques (NeuAc, reconnus par la lectine SNA) uniquement sur les virus produits sur HEC. De plus, les virus produits sur HFF sont plus affins pour la lectine MPA qui reconnaît des N-acétyl galactosamines de type $\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}$ (figure 41B).

La lectine AIA semble reconnaître les deux « types de virus » d'une manière similaire, ils doivent tous les deux porter des galactoses (Gal). Il semble que la langérine reconnaisse avec une faible affinité les virus produits sur HEC et la lectine LcH ne reconnaît aucun des deux « types de virus ».

De plus, les lectines reconnaissant spécifiquement les virus produits sur HEC (BC2L-A, GNA, UEA-II, DSA et SNA) ne fixent pas les virus produits sur HFF alors que, les lectines reconnaissant avec une plus haute affinité les virus produits sur HFF (ConA, NPA, HHA, DC-SIGN, ABA, GSL-II, WGA, PHA-E et MPA) peuvent aussi reconnaître les virus produits sur HEC mais avec une plus faible affinité. Il semblerait que les virus produits sur HEC portent un panel de glycanes plus varié que celui des virus produits sur HFF.



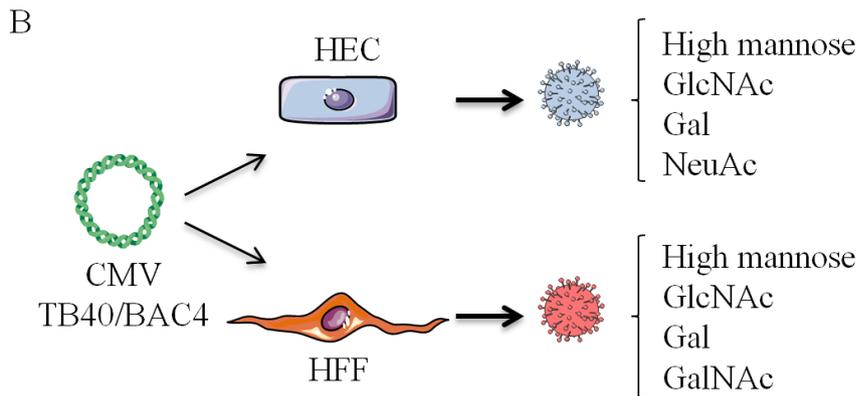


Figure 41

Des particules virales de CMV produites sur HEC ou HFF ont des glycoprofils distincts

(A) Les virus produits sur HEC (bleu) ou HFF (rouge) ont été titrés par qPCR puis déposés à une quantité similaire dans une plaque sur lesquelles ont été adsorbées 17 lectines. Après deux heures d'incubation, la plaque a été lavée puis une solution contenant du sucrose à 10% a été ajoutée pour décrocher les virus qui auraient interagis avec les lectines. L'ADN virale a été extrait puis quantifié par qPCR dans le but de déterminer le nombre de virus présent par puit. Le graphique est représentatif d'une expérience (répétée deux fois). (B) Représentation schématique des résultats.

Etant donné que les glycanes sont reconnus par des lectines, dont certaines sont des récepteurs cellulaires, j'ai cherché à déterminer si ces deux glycoprofils distincts (virus produits sur HEC ou HFF) permettent aux virus d'interagir avec des récepteurs différents sur leurs cellules cibles. Le but étant de déterminer si cette différence de glycoprofil sera aussi liée à une différence d'infectiosité.

Le virus produit sur HFF a une meilleure capacité, que le virus produit sur HEC, pour infecter les MRC-5 et les HFF. Le pourcentage d'infection du virus produit sur HFF varie entre 63% ($3,5 \cdot 10^7$ copies de génome) et 93% ($7 \cdot 10^8$ copies de génome) pour l'infection des MRC-5 et entre 47% et 74% pour l'infection des HFF. Le virus produit sur HEC est moins infectieux, en effet, son pourcentage d'infection varie entre 24% et 80% pour l'infection des MRC-5 et entre 22% et 57% pour l'infection des HFF (figure 42A). Concernant l'infection des HEC et RPE par les deux « types de virus », les résultats sont moins clairs. En effet, le taux d'infection n'atteint pas plus de 6% ce qui rend les résultats difficilement interprétables (figure 42B).

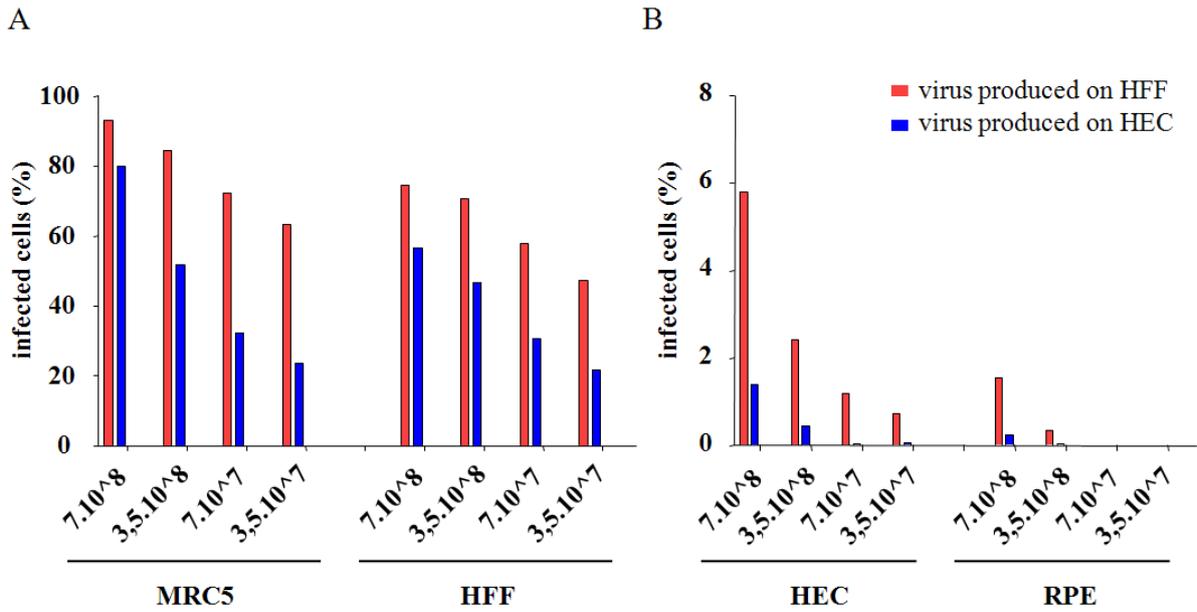


Figure 42

Le virus produit sur HFF semble être plus infectieux que celui produit sur HEC

(A) et (B) Des cellules MRC-5, HFF, HEC et RPE ont été mises en plaque 24 puits et infectées par les virus produits sur HEC (bleu) ou HFF (rouge) en quatre quantités: 7.10^8 ; $3,5.10^8$; 7.10^7 et $3,5.10^7$ copies de génome. Les cellules ont été fixées avec de l'acétone 90% et marquées avec un anticorps anti IE à 48h post-infection. Le pourcentage de cellules infectées a été calculé en fonction du nombre de cellules infectées et du nombre de cellules totales. Les graphiques sont représentatifs d'une expérience (répétée deux fois).

4.4. Conclusions et perspectives

Bien que le tropisme du CMV ait été récemment imputé au complexe pentamérique, celui-ci ne permet pas de répondre à toutes les questions posées sur le tropisme. De nombreux pathogènes, et notamment les virus, voient leur tropisme mis en corrélation avec les glycosylations de leur enveloppe. C'est notamment le cas pour le VIH-1, Ebola, le virus de la dengue ou encore le LCMV. Les glycosylations d'enveloppe seraient, entre autre, impliquées dans l'infectiosité de ces virus. Très peu d'études font le lien entre le CMV et ses glycosylations d'enveloppe. Pourtant, elles peuvent avoir un rôle important dans l'interaction du virus avec ses récepteurs, tels que les lectines.

J'ai démontré que le type cellulaire utilisé pour générer la particule virale influe sur le glycoprofil de l'enveloppe du CMV. De plus, ce glycoprofil d'enveloppe virale est bien distinct entre les virus produits sur HEC et ceux produits sur HFF. Le CMV pouvant infecter un grand nombre de cellules, il est possible que chacune d'entre elles glycosylent différemment l'enveloppe du CMV. Il paraît alors nécessaire de choisir avec précaution le type cellulaire utilisé pour générer les stocks de virus, dans le but d'éviter les biais de glycosylation d'enveloppe. Cette différence de glycoprofil, dépendante du type cellulaire infecté, pourrait rendre le virus plus ou moins immunogène et ainsi modifier sa reconnaissance par le système immunitaire. En effet, si la modification des glycanes de l'enveloppe profite au virus, elle permettrait à celui-ci de ne plus être reconnu par certaines lectines (et donc d'éviter sa détection par le système immunitaire) ou à l'inverse être plus affiné pour d'autres lectines (et d'entrer plus facilement dans la cellule cible pour se répliquer). De plus, les modifications des glycanes pourraient diminuer la reconnaissance de l'enveloppe par des anticorps anti-CMV. En effet, des études réalisées sur l'enveloppe du VIH-1 ont démontré que ce virus peut masquer, *via* des oligosaccharides, des épitopes normalement reconnus par des anticorps neutralisants.

Dans le but de confirmer que cette différence de glycoprofil est due uniquement à une différence de glycosylation, le génome complet du CMV est en cours de séquençage (collaboration avec G. Wilkie et A. Davison, Glasgow, UK). De plus, dans le but de déterminer le type de glycoprofil présent au sein de la population, il serait intéressant de tester les glycoprofils d'isolats cliniques provenant de la souche nantaise.

La diversité des glycanes est due à la complexité du mécanisme de glycosylation cellulaire orchestré par l'action concertée de diverses glycosyl-transférases (ajout de résidus sucrés) ou glycosidases (suppression de résidus sucrés). Les mécanismes de glycosylation cellulaire ne sont pas les mêmes selon le type de cellules analysées. Des recherches récentes ont démontré que des types cellulaires différents au sein du même hôte produisent des glycomes distincts (Haslam et al., 2008). De plus, des événements tels que l'activation cellulaire ou l'infection par un pathogène peuvent avoir un impact

sur le processus de glycosylation (Comelli et al., 2006). Les animaux ne sont pas les seuls à bénéficier du mécanisme de glycosylation (Van Breedam et al., 2014). En effet, les pathogènes peuvent profiter du mécanisme de glycosylation cellulaire mais aussi le perturber. Plusieurs études démontrent que les virus peuvent modifier l'expression d'enzymes cellulaires. Par exemple, le VIH-1 peut induire la diminution de la sialylation des glycoprotéines de membrane des lymphocytes T qu'il infecte (Lanteri et al., 2003). Le HSV-1 peut induire l'augmentation d'une fucosyltransferase (FUT 5) des fibroblastes qu'il infecte (Nystrom et al., 2004). Certains virus peuvent produire leurs propres glycoenzymes dans la cellule infectée. C'est le cas du myxoma virus et du Leporipoxvirus Shope fibroma virus (SFV) qui codent chacun pour une sialyltransferase virale (Jackson et al., 1999; Nash et al., 2000; Sujino et al., 2000; Willer et al., 1999) ou encore du Bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) qui lui code pour une N-acétylglucosaminyletransférase virale (Vanderplasschen et al., 2000). Il a été démontré par Nyström et al. que le CMV peut modifier l'expression de gènes responsables du processus de glycosylation. En effet, ce virus affecte le programme de transcription de 3 enzymes responsables de la formation des sialyl Lewis X (Nystrom et al., 2007). L'infection de fibroblastes par le CMV induit aussi l'activation de la transcription de gènes FUT conduisant à l'expression de LeY par les cellules infectées (Nystrom et al., 2007).

J'ai démontré que deux types cellulaires différents (HEC et HFF) permettent de générer deux glycoprofiles de l'enveloppe du CMV bien distincts. La poursuite de ce travail consistera à analyser l'expression d'enzymes cellulaires responsables de la glycosylation, à déterminer si elle est modifiée durant l'infection par le CMV et si les mêmes modifications ont lieu si on analyse des HEC ou des HFF. L'hypothèse avancée dans cette thèse est que la différence de glycoprofil observée après relargage du virus par des HEC et HFF est due à une différence de glycosylations lors de la néosynthèse virale, dépendant du type cellulaire infecté.

Je n'ai pas pu, pour le moment, déterminer si cette différence de glycoprofil d'enveloppe implique une différence de tropisme du virus. Le BAC TB40-BAC4 n'est pas le génome viral du CMV de choix pour cette expérience. En effet, un article de Murrell et al. démontre que ce BAC contient une mutation au sein du locus UL128 ou UL128L (codant pour les protéines UL128, UL130 et UL131A) (Murrell et al., 2013). Il a été démontré que les virus produits à partir de ce BAC infectent plus rapidement les fibroblastes et moins rapidement les cellules endothéliales en comparaison avec le BAC Merlin qui est une souche endothéliotrope ne portant pas de mutation au locus UL128L. Pour obtenir des résultats plus probants, il serait idéal d'utiliser une souche endothéliotrope non mutée pour le locus UL128L tel que les BAC « Merlin » ou « TR ». Si une différence d'infectiosité est observée, par la suite, des expériences de « rescue » seront entreprises pour rétablir le caractère endothéliotrope d'une souche virale produite dans des fibroblastes en modifiant les enzymes responsables du tropisme endothéliotrope.

DISCUSSION

L'infection par le CMV représente un enjeu majeur en clinique, notamment dans le cadre d'infections congénitales, de transplantations ou de patients immunodéprimés ayant développés un SIDA. Jusqu'à présent, aucun vaccin n'a montré une protection satisfaisante face à ce virus et seuls des traitements permettant de diminuer la charge virale sont proposés. Il est nécessaire de mieux connaître ce virus pour pouvoir être capable de le cibler et l'empêcher de se disséminer dans l'organisme.

Par le biais de cette étude, j'ai pu mettre en valeur le rôle central des glycosylations d'enveloppe du CMV, qui n'avaient jusqu'alors pas été étudié de la sorte.

J'ai mis en évidence l'importance des glycanes portés par la glycoprotéine B d'enveloppe. Cette glycoprotéine porte près de 20 kDa de N-glycanes de composition hétérogène avec une majorité de structures hautement mannosylées et de GlcNAc et une faible proportion de GalNAc et d'acides sialiques.

Il semble compliqué de mettre en parallèle le glycoprofil de la gB recombinante et le glycoprofil de l'enveloppe du CMV. En effet, les techniques d'analyses ne sont pas les mêmes: signal lumineux dans un cas et quantification de matériel génétique dans un autre. De plus, les types cellulaires étudiés sont différents : CHO pour la gB recombinante, HEC et HFF pour les particules virales. Bien que la CHO soit utilisée pour produire des glycoprotéines qui peuvent être appliquées en clinique et qu'elle soit de type animale (hamster), cette cellule n'est pas humaine. De plus, il est possible que la gB sous forme recombinante et au sein de l'enveloppe virale ait des conformations différentes. Les sites de N-glycosylations ne doivent pas être accessibles de la même manière et donc la glycosylation de la gB peut être différente. De plus, le glycoprofil de l'enveloppe du CMV n'est pas uniquement du à l'effet de la glycosylation sur une seule glycoprotéine mais sur diverses glycoprotéines d'enveloppe.

Il serait intéressant de définir le glycoprofil des autres glycoprotéines impliquées dans l'entrée du virus dans sa cellule hôte, tels que le complexe gH/gL et le complexe UL128/129/UL131A. Parmi le complexe gH/gL, il a été démontré que la gH est N-glycosylée et qu'elle contient six sites potentiels de N-glycosylations (Pachl et al., 1989). Depuis peu, le complexe pentamérique a été généré sous forme recombinante (Wussow et al., 2014). Une des perspectives de ce travail est de déterminer le glycoprofil de ce complexe pour pouvoir le comparer avec celui de la gB.

Bien que les anticorps anti-gB ne semblent pas reconnaître des épitopes de nature glycanique, il serait intéressant de les tester sur des virus ayant différents glycoprofiles. En effet, il est possible que certains glycanes masquent des épitopes reconnus par ces anticorps et donc diminuent leur efficacité.

La conformation des glycoprotéines ciblées pour générer des anticorps neutralisants semble être un paramètre primordial. J'ai observé qu'en ciblant le domaine AD-4 de la gB recombinante, l'interaction avec DC-SIGN n'est pas diminuée. Alors qu'en ciblant le domaine AD-4 du virus, la transmission du CMV est totalement bloquée et ce indépendamment de la souche virale utilisée. De plus, parmi les 15 anticorps anti-gB, aucun n'a la capacité de bloquer la gB, ni sous sa forme recombinante ni au sein de l'enveloppe virale. Il est possible que la gB recombinante (en phase II de test clinique) et le gB au sein de l'enveloppe virale aient une conformation légèrement différente. Il serait intéressant de générer des gB recombinantes sous différentes conformations afin de déterminer si elles peuvent induire une protection plus vaste.

Dans une stratégie de blocage de l'infection, l'anticorps anti-AD-4 pourrait être utilisé combiné avec des anti-gH/gL et anti-UL128, UL130 et UL131A dans le but d'induire une protection complète et non pas limitée à une seule glycoprotéine d'enveloppe.

J'ai démontré dans cette étude que la gB du CMV et la gp120 du VIH-1 ont un glycoprofil très similaire. De plus, ces deux glycoprotéines interagissent avec le CRD (et ses mutants) de manière identique (figure 43). Les anticorps anti-CRD peuvent bloquer l'interaction de la gB mais aussi de la gp120 à DC-SIGN. Dans le cas d'infections multiples ou de patients ayant développés le SIDA, ce type d'anticorps pourraient limiter la dissémination de plusieurs virus au sein de l'organisme.

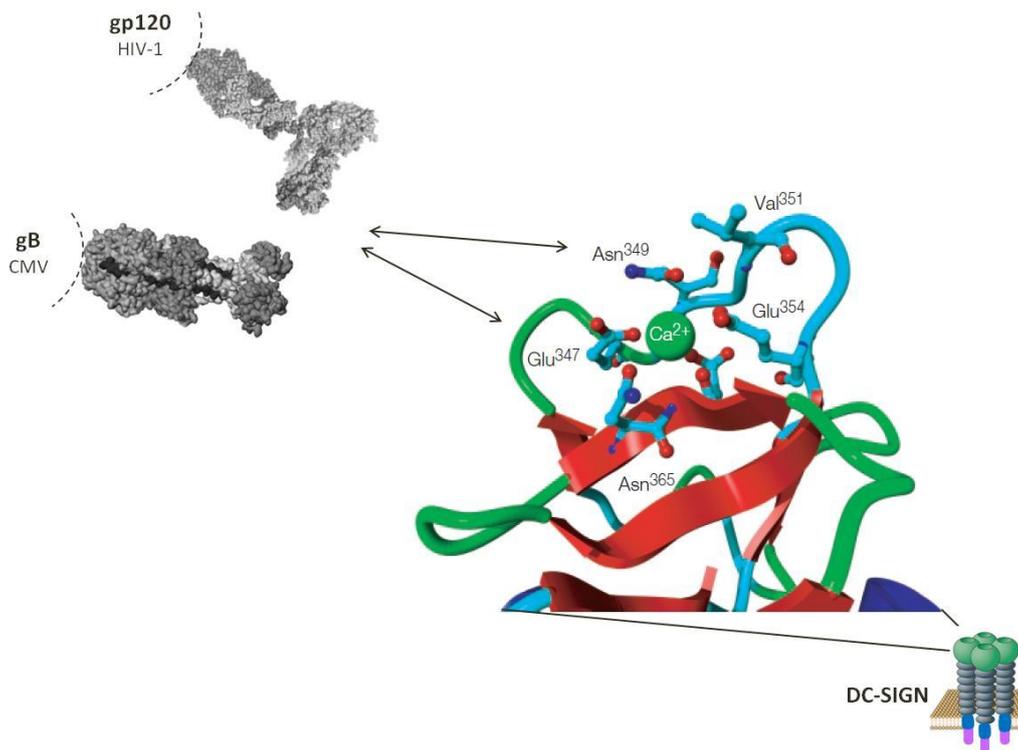


Figure 43

Domaines d'interaction de la gB du CMV et de la gp120 du HIV-1 avec le CRD de DC-SIGN

La gB du CMV et la gp120 du HIV-1 sous forme recombinante interagissent de façon similaire avec le CRD de DC-SIGN. La mutation des sites Glu347 et Asn349 au sein du CRD diminue drastiquement l'interaction des deux protéines virales avec leur ligand suggérant le rôle crucial de ces deux acides aminés (doubles flèches). La gB est représentée selon (Potzsch et al., 2011); la gp120 selon Garrett M. Morris, La Jolla, CA; le CRD selon van Kooyk and Geijtenbeek, 2003 ; et DC-SIGN selon Liu et al., 2012 .

J'ai démontré que la langérine fixe la gB *via* son CRD et que cette interaction peut être bloquée par des anticorps anti-CRD (figure 44). Néanmoins, l'affinité de la langérine pour les saccharides portés par la gB semble différente de celle de DC-SIGN. En effet, le retrait de mannoses et d'acides sialiques portés par la gB n'a pas un effet aussi marqué sur l'interaction de la gB avec la langérine qu'il l'a sur l'interaction de la gB avec DC-SIGN. De plus, dans les expériences de détermination des glycoprofils du CMV, j'ai démontré que DC-SIGN reconnaissait uniquement le virus produit sur HFF alors que la langérine, d'une manière bien moindre, semble reconnaître le virus produit sur HEC. Renforçant le fait que ces lectines ont une spécificité différente pour les glycanes présentés par la gB ou le CMV. DC-SIGN et la langérine ont aussi des rôles différents. DC-SIGN facilite l'infection par le VIH-1 alors que la langérine permet la dégradation du VIH-1 (Turville et al., 2002). Un inhibiteur de choix doit pouvoir interagir spécifiquement avec DC-SIGN et pas avec la langérine. Bien qu'interagissant avec des saccharides similaires, les sites de fixation de ces sucres sur DC-SIGN et la langérine semblent

être différents (Chatwell et al., 2008; Holla and Skerra, 2011). Il a été démontré dans une étude de Berzi et al. qu'un inhibiteur composé de mannoses a un effet plus important pour DC-SIGN que pour la langérine (Berzi et al., 2012). Il serait intéressant de tester le potentiel bloquant des inhibiteurs sucrés sur l'interaction gB/langérine afin de déterminer s'ils peuvent être plus affins pour DC-SIGN que pour la langérine. Ne cibler que DC-SIGN et non pas la langérine pourrait favoriser la dégradation du virus plutôt que son transport.

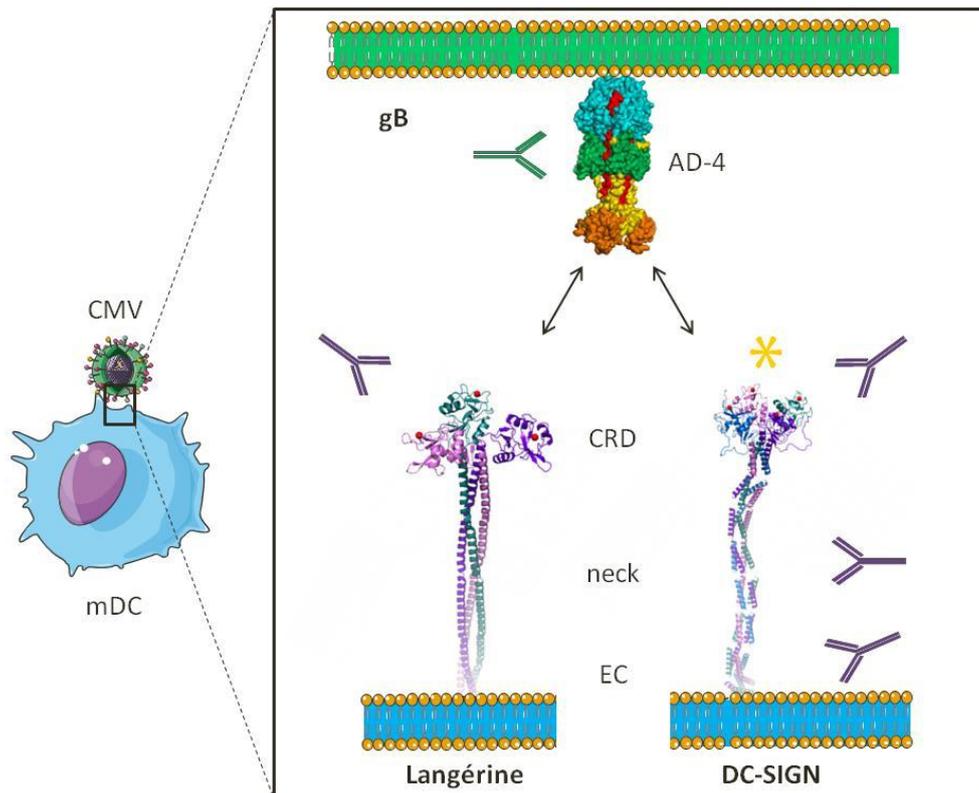


Figure 44

Interaction et inhibition du CMV *via* la gB avec les mDC *via* la langérine ou DC-SIGN

Le CMV interagit avec les mDC. Un grossissement d'une interaction moléculaire entre ce virus et ces cellules est représenté dans le carré noir. La gB du CMV est présentée à la membrane de l'enveloppe virale (vert). La langérine est présentée à la membrane des cellules de Langerhans (bleu) et DC-SIGN est présentée à la membrane des mDC DC-SIGN⁺ (bleu). La gB interagit avec le domaine CRD de la langérine et de DC-SIGN (doubles flèches). L'interaction langérine/gB peut être inhibée par des anticorps dirigés contre le CRD de la langérine et l'interaction DC-SIGN/gB peut être inhibée par des anticorps dirigés contre le CRD de DC-SIGN et des inhibiteurs composés de mannoses ou de fucoses (étoile jaune). La *trans*-infection du CMV *via* les cellules DC-SIGN⁺ peut être inhibée par l'anticorps dirigé contre le domaine AD-4 de la gB, par des anticorps anti-DC-SIGN dirigés contre son CRD, neck ou son domaine extracellulaire (EC) et par des inhibiteurs composés de mannoses ou de fucoses. La gB est représentée d'après Potzsch et al., 2011 ; la langérine et DC-SIGN sont tirés de « ElicityL ».

Dans le but de se rapprocher des conditions physiologiques, il serait possible de tester le potentiel bloquant de ces inhibiteurs sur des biopsies de peau ou de muqueuses humaines en condition d'infection par le CMV. Les biopsies provenant de patients représentent un modèle *ex vivo* mimant les conditions physiologiques au niveau de la composition du tissu. Néanmoins, la durée de vie des biopsies est courte et sa physiologie peut être modifiée suite au stress engendré par l'acte chirurgical.

Depuis les années 2000, les progrès de l'ingénierie tissulaire ont permis de développer de nouveaux modèles d'étude. Des méthodes de culture cellulaire sur 3 dimensions permettent de recréer des tissus *in vitro*, tels que des équivalents de peau ou de muqueuses. Ces modèles sont appelés des modèles organotypiques de peau ou de muqueuses. Des reconstructions d'épiderme ou de muqueuses vaginales sont actuellement disponibles. Ce modèle d'étude humain présente plusieurs avantages, sa structure équivaut à celle d'un tissu sain et il n'a pas été soumis à des conditions de stress physiques. Ces reconstructions sont composées d'une matrice de collagène dans laquelle peuvent être « insérées » des cellules telles que des DC ou des LC. Il serait aussi envisageable de tester le potentiel bloquant des inhibiteurs sur des muqueuses reconstituées, en condition d'infection par le CMV.

Références

Adler, B., and Sinzger, C. (2009). Endothelial cells in human cytomegalovirus infection: one host cell out of many or a crucial target for virus spread? *Thrombosis and haemostasis* 102, 1057-1063.

Adler, S.P., Starr, S.E., Plotkin, S.A., Hempfling, S.H., Buis, J., Manning, M.L., and Best, A.M. (1995). Immunity induced by primary human cytomegalovirus infection protects against secondary infection among women of childbearing age. *The Journal of infectious diseases* 171, 26-32.

Adler, S.P.M.H., SUE H. BS; STARR, STUART E. MD; PLOTKIN, STANLEY A. MD; RIDDELL, STANLEY MD (1998). Safety and immunogenicity of the Towne strain cytomegalovirus vaccine. *Pediatric Infectious Disease Journal* 17, 200-206.

Appelmek, B.J., van Die, I., van Vliet, S.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Geijtenbeek, T.B.H., and van Kooyk, Y. (2003). Cutting Edge: Carbohydrate Profiling Identifies New Pathogens That Interact with Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Nonintegrin on Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* 170, 1635-1639.

Arrighi, J.F., Pion, M., Garcia, E., Escola, J.M., van Kooyk, Y., Geijtenbeek, T.B., and Piguet, V. (2004). DC-SIGN-mediated infectious synapse formation enhances X4 HIV-1 transmission from dendritic cells to T cells. *The Journal of experimental medicine* 200, 1279-1288.

Baldick, C.J., Jr., and Shenk, T. (1996). Proteins associated with purified human cytomegalovirus particles. *Journal of virology* 70, 6097-6105.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology* 18, 767-811.

Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.

Bashirova, A.A., Geijtenbeek, T.B., van Duijnhoven, G.C., van Vliet, S.J., Eilering, J.B., Martin, M.P., Wu, L., Martin, T.D., Viebig, N., Knolle, P.A., *et al.* (2001). A dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)-related protein is highly expressed on human liver sinusoidal endothelial cells and promotes HIV-1 infection. *The Journal of experimental medicine* 193, 671-678.

Bashirova, A.A., Wu, L., Cheng, J., Martin, T.D., Martin, M.P., Benveniste, R.E., Lifson, J.D., KewalRamani, V.N., Hughes, A., and Carrington, M. (2003). Novel Member of the CD209 (DC-SIGN) Gene Family in Primates. *Journal of virology* 77, 217-227.

Becer, C.R., Gibson, M.I., Geng, J., Ilyas, R., Wallis, R., Mitchell, D.A., and Haddleton, D.M. (2010). High-affinity glycopolymer binding to human DC-SIGN and disruption of DC-SIGN interactions with HIV envelope glycoprotein. *Journal of the American Chemical Society* 132, 15130-15132.

Beck, K., Meyer-Konig, U., Weidmann, M., Nern, C., and Hufert, F.T. (2003). Human cytomegalovirus impairs dendritic cell function: a novel mechanism of human cytomegalovirus immune escape. *European journal of immunology* 33, 1528-1538.

- Beck, S., and Barrell, B.G. (1988). Human cytomegalovirus encodes a glycoprotein homologous to MHC class-I antigens. *Nature* 331, 269-272.
- Becke, S., Aue, S., Thomas, D., Schader, S., Podlech, J., Bopp, T., Sedmak, T., Wolfrum, U., Plachter, B., and Reyda, S. (2010). Optimized recombinant dense bodies of human cytomegalovirus efficiently prime virus specific lymphocytes and neutralizing antibodies without the addition of adjuvant. *Vaccine* 28, 6191-6198.
- Beersma, M., Bijlmakers, M., Geelen, J., and Feltkamp, T. (1992). HLA-B27 as a receptor for cytomegalovirus. *curr eye res.*
- Berencsi, K., Gyulai, Z., Gonczol, E., Pincus, S., Cox, W.I., Michelson, S., Kari, L., MERIC, C., Cadoz, M., Zahradnik, J., *et al.* (2001). A canarypox vector-expressing cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 induces long-lasting cytotoxic T cell responses in human CMV-seronegative subjects. *The Journal of infectious diseases* 183, 1171-1179.
- Bernardi, A., Jimenez-Barbero, J., Casnati, A., De Castro, C., Darbre, T., Fieschi, F., Finne, J., Funken, H., Jaeger, K.E., Lahmann, M., *et al.* (2013). Multivalent glycoconjugates as anti-pathogenic agents. *Chemical Society reviews* 42, 4709-4727.
- Bernstein, D.I., Schleiss, M.R., Berencsi, K., Gonczol, E., Dickey, M., Khoury, P., Cadoz, M., MERIC, C., Zahradnik, J., Duliege, A.M., *et al.* (2002). Effect of previous or simultaneous immunization with canarypox expressing cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B (gB) on response to subunit gB vaccine plus MF59 in healthy CMV-seronegative adults. *The Journal of infectious diseases* 185, 686-690.
- Berzi, A., Reina, J.J., Ottria, R., Sutkeviciute, I., Antonazzo, P., Sanchez-Navarro, M., Chabrol, E., Biasin, M., Trabattoni, D., Cetin, I., *et al.* (2012). A glycomimetic compound inhibits DC-SIGN-mediated HIV infection in cellular and cervical explant models. *AIDS* 26, 127-137.
- Biron, C.A., Byron, K.S., and Sullivan, J.L. (1989). Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *The New England journal of medicine* 320, 1731-1735.
- Biron, K.K., Fyfe, J.A., Stanat, S.C., Leslie, L.K., Sorrell, J.B., Lambe, C.U., and Coen, D.M. (1986). A human cytomegalovirus mutant resistant to the nucleoside analog 9-([2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy]methyl)guanine (BW B759U) induces reduced levels of BW B759U triphosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 8769-8773.
- Bleijds, D.A., Geijtenbeek, T.B., Figdor, C.G., and van Kooyk, Y. (2001). DC-SIGN and LFA-1: a battle for ligand. *Trends in immunology* 22, 457-463.
- Boehme, K.W., Guerrero, M., and Compton, T. (2006). Human Cytomegalovirus Envelope Glycoproteins B and H Are Necessary for TLR2 Activation in Permissive Cells. *The Journal of Immunology* 177, 7094-7102.
- Bonhomme, C.J., Knopp, K.A., Bederka, L.H., Angelini, M.M., and Buchmeier, M.J. (2013). LCMV glycosylation modulates viral fitness and cell tropism. *PloS one* 8, e53273.
- Boppana, S.B., Rivera, L.B., Fowler, K.B., Mach, M., and Britt, W.J. (2001). Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptual immunity. *The New England journal of medicine* 344, 1366-1371.

Borysiewicz, L.K., Hickling, J.K., Graham, S., Sinclair, J., Cranage, M.P., Smith, G.L., and Sissons, J.G. (1988). Human cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells. Relative frequency of stage-specific CTL recognizing the 72-kD immediate early protein and glycoprotein B expressed by recombinant vaccinia viruses. *The Journal of experimental medicine* 168, 919-931.

Boyle, K.A., and Compton, T. (1998). Receptor-binding properties of a soluble form of human cytomegalovirus glycoprotein B. *Journal of virology* 72, 1826-1833.

Bradley, A.J., Lurain, N.S., Ghazal, P., Trivedi, U., Cunningham, C., Baluchova, K., Gatherer, D., Wilkinson, G.W., Dargan, D.J., and Davison, A.J. (2009). High-throughput sequence analysis of variants of human cytomegalovirus strains Towne and AD169. *The Journal of general virology* 90, 2375-2380.

Braud, V.M., Allan, D.S., O'Callaghan, C.A., Soderstrom, K., D'Andrea, A., Ogg, G.S., Lazetic, S., Young, N.T., Bell, J.I., Phillips, J.H., *et al.* (1998). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391, 795-799.

Britt, W. (1991). Recent advances in the identification of significant human cytomegalovirus-encoded proteins. *Transplantation proceedings* 23, 64-69.

Britt, W.J., and Auger, D. (1986). Synthesis and processing of the envelope gp55-116 complex of human cytomegalovirus. *Journal of virology* 58, 185-191.

Britt, W.J., and Boppana, S. (2004). Human cytomegalovirus virion proteins. *Human immunology* 65, 395-402.

Britt, W.J., Vugler, L., Butfiloski, E.J., and Stephens, E.B. (1990). Cell surface expression of human cytomegalovirus (HCMV) gp55-116 (gB): use of HCMV-recombinant vaccinia virus-infected cells in analysis of the human neutralizing antibody response. *Journal of virology* 64, 1079-1085.

Britt, W.J., and Vugler, L.G. (1989). Processing of the gp55-116 envelope glycoprotein complex (gB) of human cytomegalovirus. *Journal of virology* 63, 403-410.

Britt, W.J., and Vugler, L.G. (1992). Oligomerization of the human cytomegalovirus major envelope glycoprotein complex gB (gp55-116). *Journal of virology* 66, 6747-6754.

Bruminhent, J., Thongprayoon, C., Dierkhising, R.A., Kremers, W.K., Theel, E.S., and Razonable, R.R. (2015). Risk factors for cytomegalovirus reactivation after liver transplantation: can pre-transplant cytomegalovirus antibody titers predict outcome? *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 21, 539-546.

Bukowski, J.F., Warner, J.F., Dennert, G., and Welsh, R.M. (1985). Adoptive transfer studies demonstrating the antiviral effect of natural killer cells in vivo. *The Journal of experimental medicine* 161, 40-52.

Bukowski, J.F., Yang, H., and Welsh, R.M. (1988). Antiviral effect of lymphokine-activated killer cells: characterization of effector cells mediating prophylaxis. *Journal of virology* 62, 3642-3648.

Burleigh, L., Lozach, P.Y., Schiffer, C., Staropoli, I., Pezo, V., Porrot, F., Canque, B., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., and Amara, A. (2006). Infection of dendritic cells (DCs), not DC-SIGN-mediated internalization of human immunodeficiency virus, is required for long-term transfer of virus to T cells. *Journal of virology* 80, 2949-2957.

- Cambi, A., de Lange, F., van Maarseveen, N.M., Nijhuis, M., Joosten, B., van Dijk, E.M., de Bakker, B.I., Fransen, J.A., Bovee-Geurts, P.H., van Leeuwen, F.N., *et al.* (2004). Microdomains of the C-type lectin DC-SIGN are portals for virus entry into dendritic cells. *J Cell Biol* *164*, 145-155.
- Canard, B., Vachon, H., Fontaine, T., Pin, J.J., Paul, S., Genin, C., and Mueller, C.G. (2011). Generation of anti-DC-SIGN monoclonal antibodies capable of blocking HIV-1 gp120 binding and reactive on formalin-fixed tissue. *Immunology letters* *135*, 165-172.
- Cannon, M.J., Schmid, D.S., and Hyde, T.B. (2010). Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Reviews in medical virology* *20*, 202-213.
- Cha, T.A., Tom, E., Kemble, G.W., Duke, G.M., Mocarski, E.S., and Spaete, R.R. (1996). Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *Journal of virology* *70*, 78-83.
- Chabrol, E., Nurisso, A., Daina, A., Vassal-Stermann, E., Thepaut, M., Girard, E., Vives, R.R., and Fiesch, F. (2012). <Chabrol-Fieschi-12-PlosOne-glycosaminoglycans and langerin and gp120.pdf>. PloS one.
- Chacko, B., and John, G.T. (2012). Leflunomide for cytomegalovirus: bench to bedside. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society* *14*, 111-120.
- Chatwell, L., Holla, A., Kaufer, B.B., and Skerra, A. (2008). The carbohydrate recognition domain of Langerin reveals high structural similarity with the one of DC-SIGN but an additional, calcium-independent sugar-binding site. *Molecular immunology* *45*, 1981-1994.
- Cinatl, J., Jr., Scholz, M., and Doerr, H.W. (2005). Role of tumor cell immune escape mechanisms in cytomegalovirus-mediated oncomodulation. *Medicinal research reviews* *25*, 167-185.
- Comelli, E.M., Sutton-Smith, M., Yan, Q., Amado, M., Panico, M., Gilmartin, T., Whisenant, T., Lanigan, C.M., Head, S.R., Goldberg, D., *et al.* (2006). Activation of Murine CD4+ and CD8+ T Lymphocytes Leads to Dramatic Remodeling of N-Linked Glycans. *The Journal of Immunology* *177*, 2431-2440.
- Compton, T. (2004). Receptors and immune sensors: the complex entry path of human cytomegalovirus. *Trends Cell Biol* *14*, 5-8.
- Compton, T., and Feire, A. (2007). Early events in human cytomegalovirus infection. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P.S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, and K. Yamanishi, eds. (Cambridge).
- Compton, T., Kurt-Jones, E.A., Boehme, K.W., Belko, J., Latz, E., Golenbock, D.T., and Finberg, R.W. (2003). Human Cytomegalovirus Activates Inflammatory Cytokine Responses via CD14 and Toll-Like Receptor 2. *Journal of virology* *77*, 4588-4596.
- Compton, T., Nepomuceno, R.R., and Nowlin, D.M. (1992). Human cytomegalovirus penetrates host cells by pH-independent fusion at the cell surface. *Virology* *191*, 387-395.
- Conde, P., Rodriguez, M., van der Touw, W., Jimenez, A., Burns, M., Miller, J., Brahmachary, M., Chen, H.M., Boros, P., Rausell-Palamos, F., *et al.* (2015). DC-SIGN(+) Macrophages Control the Induction of Transplantation Tolerance. *Immunity* *42*, 1143-1158.

Coonrod, D., Collier, A.C., Ashley, R., DeRouen, T., and Corey, L. (1998). Association between cytomegalovirus seroconversion and upper genital tract infection among women attending a sexually transmitted disease clinic: a prospective study. *The Journal of infectious diseases* *177*, 1188-1193.

Couzi, L., Lafarge, X., Pitard, V., Neau-Cransac, M., Dromer, C., Billes, M.A., Lacaille, F., Moreau, J.F., Merville, P., and Dechanet-Merville, J. (2011). Gamma-delta T cell expansion is closely associated with cytomegalovirus infection in all solid organ transplant recipients. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* *24*, e40-42.

Cranage, M.P., Kouzarides, T., Bankier, A.T., Satchwell, S., Weston, K., Tomlinson, P., Barrell, B., Hart, H., Bell, S.E., Minson, A.C., *et al.* (1986). Identification of the human cytomegalovirus glycoprotein B gene and induction of neutralizing antibodies via its expression in recombinant vaccinia virus. *The EMBO journal* *5*, 3057-3063.

Crough, T., and Khanna, R. (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clinical microbiology reviews* *22*, 76-98, Table of Contents.

Curtis, B.M., Scharnowske, S., and Watson, A.J. (1992). Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *89*, 8356-8360.

Cwynarski, K., Ainsworth, J., Cobbold, M., Wagner, S., Mahendra, P., Apperley, J., Goldman, J., Craddock, C., and Moss, P.A. (2001). Direct visualization of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* *97*, 1232-1240.

Dargan, D.J., Douglas, E., Cunningham, C., Jamieson, F., Stanton, R.J., Baluchova, K., McSharry, B.P., Tomasec, P., Emery, V.C., Percivalle, E., *et al.* (2010). Sequential mutations associated with adaptation of human cytomegalovirus to growth in cell culture. *The Journal of general virology* *91*, 1535-1546.

Davison, A.J. (2003). The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *Journal of General Virology* *84*, 17-28.

de Jong, M.A., Vriend, L.E., Theelen, B., Taylor, M.E., Fluitsma, D., Boekhout, T., and Geijtenbeek, T.B. (2010). C-type lectin Langerin is a beta-glucan receptor on human Langerhans cells that recognizes opportunistic and pathogenic fungi. *Molecular immunology* *47*, 1216-1225.

de Witte, L., Abt, M., Schneider-Schaulies, S., van Kooyk, Y., and Geijtenbeek, T.B. (2006). Measles virus targets DC-SIGN to enhance dendritic cell infection. *Journal of virology* *80*, 3477-3486.

de Witte, L., Nabatov, A., and Geijtenbeek, T.B. (2008). Distinct roles for DC-SIGN+-dendritic cells and Langerhans cells in HIV-1 transmission. *Trends in molecular medicine* *14*, 12-19.

de Witte, L., Nabatov, A., Pion, M., Fluitsma, D., de Jong, M.A., de Gruijl, T., Piguet, V., van Kooyk, Y., and Geijtenbeek, T.B. (2007). Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nature medicine* *13*, 367-371.

Dechanet, J., Merville, P., Lim, A., Retiere, C., Pitard, V., Lafarge, X., Michelson, S., Meric, C., Hallet, M.M., Kourilsky, P., *et al.* (1999). Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *The Journal of clinical investigation* *103*, 1437-1449.

- Dieu, M.C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J.M., Oldham, E., Ait-Yahia, S., Briere, F., Zlotnik, A., Lebecque, S., and Caux, C. (1998). Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *The Journal of experimental medicine* *188*, 373-386.
- Dolan, A. (2004). Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *Journal of General Virology* *85*, 1301-1312.
- Dunn, C., Chalupny, N.J., Sutherland, C.L., Dosch, S., Sivakumar, P.V., Johnson, D.C., and Cosman, D. (2003). Human cytomegalovirus glycoprotein UL16 causes intracellular sequestration of NKG2D ligands, protecting against natural killer cell cytotoxicity. *The Journal of experimental medicine* *197*, 1427-1439.
- Dustin, M.L., Olszowy, M.W., Holdorf, A.D., Li, J., Bromley, S., Desai, N., Widder, P., Rosenberger, F., van der Merwe, P.A., Allen, P.M., *et al.* (1998). A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell* *94*, 667-677.
- Dustin, M.L., and Springer, T.A. (1989). T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* *341*, 619-624.
- Dworsky, M., Yow, M., Stagno, S., Pass, R.F., and Alford, C. (1983). Cytomegalovirus infection of breast milk and transmission in infancy. *Pediatrics* *72*, 295-299.
- Eisenberg, R.J., Atanasiu, D., Cairns, T.M., Gallagher, J.R., Krummenacher, C., and Cohen, G.H. (2012). Herpes virus fusion and entry: a story with many characters. *Viruses* *4*, 800-832.
- Engering, A., Geijtenbeek, T.B., van Vliet, S.J., Wijers, M., van Liempt, E., Demaurex, N., Lanzavecchia, A., Fransen, J., Figdor, C.G., Piguet, V., *et al.* (2002). The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol* *168*, 2118-2126.
- Faure-Della Corte, M., Samot, J., Garrigue, I., Magnin, N., Reigadas, S., Couzi, L., Dromer, C., Velly, J.F., Dechanet-Merville, J., Fleury, H.J., *et al.* (2010). Variability and recombination of clinical human cytomegalovirus strains from transplantation recipients. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* *47*, 161-169.
- Feinberg, H., Guo, Y., Mitchell, D.A., Drickamer, K., and Weis, W.I. (2005). Extended neck regions stabilize tetramers of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *The Journal of biological chemistry* *280*, 1327-1335.
- Feinberg, H., Mitchell, D.A., Drickamer, K., and Weis, W.I. (2001). Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science* *294*, 2163-2166.
- Feinberg, H., Powlesland, A.S., Taylor, M.E., and Weis, W.I. (2010). Trimeric structure of langerin. *The Journal of biological chemistry* *285*, 13285-13293.
- Feire, A.L., Koss, H., and Compton, T. (2004). Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 15470-15475.
- Foley, B., Cooley, S., Verneris, M.R., Curtsinger, J., Luo, X., Waller, E.K., Weisdorf, D.J., and Miller, J.S. (2011). NK cell education after allogeneic transplantation: dissociation between recovery of cytokine-producing and cytotoxic functions. *Blood* *118*, 2784-2792.

- Forster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Muller, I., Wolf, E., and Lipp, M. (1999). CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* *99*, 23-33.
- Fowler, K.B., Stagno, S., Pass, R.F., Britt, W.J., Boll, T.J., and Alford, C.A. (1992). The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *The New England journal of medicine* *326*, 663-667.
- Gamadia, L.E., Rentenaar, R.J., van Lier, R.A., and ten Berge, I.J. (2004). Properties of CD4(+) T cells in human cytomegalovirus infection. *Human immunology* *65*, 486-492.
- Gandhi, M.K., and Khanna, R. (2004). Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *The Lancet infectious diseases* *4*, 725-738.
- Gavel, Y., and von Heijne, G. (1990). Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein engineering* *3*, 433-442.
- Geijtenbeek, T.B., Krooshoop, D.J., Bleijs, D.A., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Grabovsky, V., Alon, R., Figdor, C.G., and van Kooyk, Y. (2000a). DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nature immunology* *1*, 353-357.
- Geijtenbeek, T.B., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Middel, J., Cornelissen, I.L., Nottet, H.S., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., *et al.* (2000b). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* *100*, 587-597.
- Geijtenbeek, T.B., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Adema, G.J., van Kooyk, Y., and Figdor, C.G. (2000c). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* *100*, 575-585.
- Geijtenbeek, T.B., van Duijnhoven, G.C., van Vliet, S.J., Krieger, E., Vriend, G., Figdor, C.G., and van Kooyk, Y. (2002a). Identification of different binding sites in the dendritic cell-specific receptor DC-SIGN for intercellular adhesion molecule 3 and HIV-1. *The Journal of biological chemistry* *277*, 11314-11320.
- Geijtenbeek, T.B.H., van Vliet, S.J., Koppel, E.A., Sanchez-Hernandez, M., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Appelmelk, B., and van Kooyk, Y. (2002b). Mycobacteria Target DC-SIGN to Suppress Dendritic Cell Function. *Journal of Experimental Medicine* *197*, 7-17.
- Gibson, W. (1996a). Structure and assembly of the virion. *Intervirology* *39*, 389-400.
- Gibson, W. (1996b). Structure and assembly of the virion. *Intervirology* *39*(5-6).
- Gicklhorn, D., eickmann, M., meyer, G., Ohlin, M., and Radsak, K. (2003). Differential effects of glycoprotein B epitope-specific antibodies on human cytomegalovirus-induced cell-cell fusion. *The Journal of general virology* *84*, 1859-1862.
- Giugni, T.D., Soderberg, C., Ham, D.J., Bautista, R.M., Hedlund, K.O., Moller, E., and Zaia, J.A. (1996). Neutralization of human cytomegalovirus by human CD13-specific antibodies. *The Journal of infectious diseases* *173*, 1062-1071.
- Goochee, C., and Monica, T. (1990). Environmental effects on protein glycosylation. *biotechnology* *8*, 421-427.

- Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., and Dustin, M.L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221-227.
- Gretch, D.R., Kari, B., Rasmussen, L., Gehrz, R.C., and Stinski, M.F. (1988). Identification and characterization of three distinct families of glycoprotein complexes in the envelopes of human cytomegalovirus. *Journal of virology* 62, 875-881.
- Griffiths, P.D., Stanton, A., McCarrell, E., Smith, C., Osman, M., Harber, M., Davenport, A., Jones, G., Wheeler, D.C., O'Beirne, J., *et al.* (2011). Cytomegalovirus glycoprotein-B vaccine with MF59 adjuvant in transplant recipients: a phase 2 randomised placebo-controlled trial. *The Lancet* 377, 1256-1263.
- Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C., and Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual review of immunology* 20, 621-667.
- Guo, Y., Feinberg, H., Conroy, E., Mitchell, D.A., Alvarez, R., Blixt, O., Taylor, M.E., Weis, W.I., and Drickamer, K. (2004). Structural basis for distinct ligand-binding and targeting properties of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *Nature structural & molecular biology* 11, 591-598.
- Haberland, M., Meyer-Konig, U., and Hufert, F.T. (1999). Variation within the glycoprotein B gene of human cytomegalovirus is due to homologous recombination. *The Journal of general virology* 80 (Pt 6), 1495-1500.
- Hahn, G., Jores, R., and Mocarski, E.S. (1998). Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 3937-3942.
- Hahn, G., Revello, M.G., Patrone, M., Percivalle, E., Campanini, G., Sarasini, A., Wagner, M., Gallina, A., Milanesi, G., Koszinowski, U., *et al.* (2004). Human cytomegalovirus UL131-128 genes are indispensable for virus growth in endothelial cells and virus transfer to leukocytes. *Journal of virology* 78, 10023-10033.
- Halary, F., Amara, A., Lortat-Jacob, H., Messerle, M., Delaunay, T., Houles, C., Fieschi, F., Arenzana-Seisdedos, F., Moreau, J.F., and Dechanet-Merville, J. (2002). Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity* 17, 653-664.
- Halary, F., Pitard, V., Dlubek, D., Krzysiek, R., de la Salle, H., Merville, P., Dromer, C., Emilie, D., Moreau, J.F., and Dechanet-Merville, J. (2005). Shared reactivity of V δ 2(neg) $\gamma\delta$ T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells. *The Journal of experimental medicine* 201, 1567-1578.
- Harrison, C.J., Britt, W.J., Chapman, N.M., Mullican, J., and Tracy, S. (1995). Reduced congenital cytomegalovirus (CMV) infection after maternal immunization with a guinea pig CMV glycoprotein before gestational primary CMV infection in the guinea pig model. *The Journal of infectious diseases* 172, 1212-1220.
- Harrison, S.C. (2008). Viral membrane fusion. *Nature structural & molecular biology* 15, 690-698.
- Haslam, S.M., Julien, S., Burchell, J.M., Monk, C.R., Ceroni, A., Garden, O.A., and Dell, A. (2008). Characterizing the glycome of the mammalian immune system. *Immunology and cell biology* 86, 564-573.

Haspot, F., Lavault, A., Sinzger, C., Laib Sampaio, K., Stierhof, Y.D., Pilet, P., Bressolette-Bodin, C., and Halary, F. (2012). Human cytomegalovirus entry into dendritic cells occurs via a macropinocytosis-like pathway in a pH-independent and cholesterol-dependent manner. *PloS one* 7, e34795.

Heineman, T.C., Schleiss, M., Bernstein, D.I., Spaete, R.R., Yan, L., Duke, G., Prichard, M., Wang, Z., Yan, Q., Sharp, M.A., *et al.* (2006). A phase 1 study of 4 live, recombinant human cytomegalovirus Towne/Toledo chimeric vaccines. *The Journal of infectious diseases* 193, 1350-1360.

Heldwein, E.E. (2009). Entry of herpesviruses into cells: more than one way to pull the trigger. *Structure* 17, 147-149.

Heldwein, E.E., Lou, H., Bender, F.C., Cohen, G.H., Eisenberg, R.J., and Harrison, S.C. (2006). Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1. *Science* 313, 217-220.

Hensler, H.R., Tomaszewski, M.J., Rappocciolo, G., Rinaldo, C.R., and Jenkins, F.J. (2014). Human herpesvirus 8 glycoprotein B binds the entry receptor DC-SIGN. *Virus research* 190, 97-103.

Hertel, L. (2014). Human cytomegalovirus tropism for mucosal myeloid dendritic cells. *Reviews in medical virology* 24, 379-395.

Hertel, L., Lacaille, V.G., Strobl, H., Mellins, E.D., and Mocarski, E.S. (2003). Susceptibility of immature and mature Langerhans cell-type dendritic cells to infection and immunomodulation by human cytomegalovirus. *Journal of virology* 77, 7563-7574.

Hobom, U., Brune, W., Messerle, M., Hahn, G., and Koszinowski, U.H. (2000). Fast screening procedures for random transposon libraries of cloned herpesvirus genomes: mutational analysis of human cytomegalovirus envelope glycoprotein genes. *Journal of virology* 74, 7720-7729.

Holla, A., and Skerra, A. (2011). Comparative analysis reveals selective recognition of glycans by the dendritic cell receptors DC-SIGN and Langerin. *Protein engineering, design & selection : PEDS* 24, 659-669.

Huang, C. (2011). <Huang-11-Glycobiology-MPA specificity.pdf>.

Hubbard, S., and Ivatt, R. (1981). Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides. *annu rev biochem* 50, 555-583.

Huber, M.T., and Compton, T. (1998). The human cytomegalovirus UL74 gene encodes the third component of the glycoprotein H-glycoprotein L-containing envelope complex. *Journal of virology* 72, 8191-8197.

Isaacson, M.K., and Compton, T. (2009). Human cytomegalovirus glycoprotein B is required for virus entry and cell-to-cell spread but not for virion attachment, assembly, or egress. *Journal of virology* 83, 3891-3903.

Isaacson, M.K., Feire, A.L., and Compton, T. (2007). Epidermal growth factor receptor is not required for human cytomegalovirus entry or signaling. *Journal of virology* 81, 6241-6247.

Jackson, R.J., Hall, D.F., and Kerr, P.J. (1999). Myxoma virus encodes an alpha2,3-sialyltransferase that enhances virulence. *Journal of virology* 73, 2376-2384.

Janeway, C.A., Jr., and Medzhitov, R. (1999). Lipoproteins take their toll on the host. *Current biology : CB* 9, R879-882.

Jonjic, S., Mutter, W., Weiland, F., Reddehase, M.J., and Koszinowski, U.H. (1989). Site-restricted persistent cytomegalovirus infection after selective long-term depletion of CD4+ T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 169, 1199-1212.

Kenneson, A., and Cannon, M.J. (2007). Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Reviews in medical virology* 17, 253-276.

Khaiboullina, S.F., Maciejewski, J.P., Crapnell, K., Spallone, P.A., Dean Stock, A., Pari, G.S., Zanjani, E.D., and Jeor, S.S. (2004). Human cytomegalovirus persists in myeloid progenitors and is passed to the myeloid progeny in a latent form. *British journal of haematology* 126, 410-417.

Kono, H., and Rock, K.L. (2008). How dying cells alert the immune system to danger. *Nature reviews Immunology* 8, 279-289.

Koppel, E.A., Saeland, E., de Cooker, D.J., van Kooyk, Y., and Geijtenbeek, T.B. (2005). DC-SIGN specifically recognizes *Streptococcus pneumoniae* serotypes 3 and 14. *Immunobiology* 210, 203-210.

Kotenko, S.V., Sacconi, S., Izotova, L.S., Mirochnitchenko, O.V., and Pestka, S. (2000). Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 1695-1700.

Kwon, D.S., Gregorio, G., Bitton, N., Hendrickson, W.A., and Littman, D.R. (2002). DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity* 16, 135-144.

Lanteri, M., Giordanengo, V., Hiraoka, N., Fuzibet, J.G., Auberger, P., Fukuda, M., Baum, L.G., and Lefebvre, J.C. (2003). Altered T cell surface glycosylation in HIV-1 infection results in increased susceptibility to galectin-1-induced cell death. *Glycobiology* 13, 909-918.

Lasala, F., Arce, E., Otero, J.R., Rojo, J., and Delgado, R. (2003). Mannosyl Glycodendritic Structure Inhibits DC-SIGN-Mediated Ebola Virus Infection in cis and in trans. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47, 3970-3972.

Lauring, A.S., and Andino, R. (2010). Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS pathogens* 6, e1001005.

Lauron, E.J., Yu, D., Fehr, A.R., and Hertel, L. (2014). Human cytomegalovirus infection of langerhans-type dendritic cells does not require the presence of the gH/gL/UL128-131A complex and is blocked after nuclear deposition of viral genomes in immature cells. *Journal of virology* 88, 403-416.

Lepoutre, A., Antona, D., Fonteneau, L., Halftermeyer-Zhou, F., Baudon, C., and Dorléans, F. (2013). Séroprévalence des maladies à prévention vaccinale et de cinq autres maladies infectieuses en France. Résultats de deux enquêtes nationales 2008-2010. *Bull Epidemiol Hebd*, 526-534.

Littler, E., Stuart, A.D., and Chee, M.S. (1992). Human cytomegalovirus UL97 open reading frame encodes a protein that phosphorylates the antiviral nucleoside analogue ganciclovir. *Nature* 358, 160-162.

Liu, H., Yu, W., Liou, L.-Y., and Rice, A.P. (2003). Isolation and characterization of the human DC-SIGN and DC-SIGNR promoters. *Gene* 313, 149-159.

Liu, P., Wang, X., Itano, M.S., Neumann, A.K., de Silva, A.M., Jacobson, K., and Thompson, N.L. (2014). Low copy numbers of DC-SIGN in cell membrane microdomains: implications for structure and function. *Traffic* 15, 179-196.

Liu, P., Wang, X., Itano, M.S., Neumann, A.K., Jacobson, K., and Thompson, N.L. (2012). The formation and stability of DC-SIGN microdomains require its extracellular moiety. *Traffic* 13, 715-726.

Loris (2000). <Loris-Imberty-00-JMB-carbohydrate reco by UEA-II.pdf>.

Lowance, D., Neumayer, H.H., Legendre, C.M., Squifflet, J.P., Kovarik, J., Brennan, P.J., Norman, D., Mendez, R., Keating, M.R., Coggon, G.L., *et al.* (1999). Valacyclovir for the prevention of cytomegalovirus disease after renal transplantation. International Valacyclovir Cytomegalovirus Prophylaxis Transplantation Study Group. *The New England journal of medicine* 340, 1462-1470.

Luczkowiak, J., Sattin, S., Sutkeviciute, I., Reina, J.J., Sanchez-Navarro, M., Thepaut, M., Martinez-Prats, L., Daggetti, A., Fieschi, F., Delgado, R., *et al.* (2011). Pseudosaccharide functionalized dendrimers as potent inhibitors of DC-SIGN dependent Ebola pseudotyped viral infection. *Bioconjugate chemistry* 22, 1354-1365.

Ludwig, I.S., Geijtenbeek, T.B., and van Kooyk, Y. (2006). Two way communication between neutrophils and dendritic cells. *Current opinion in pharmacology* 6, 408-413.

Lundberg, K., Albrekt, A.S., Nelissen, I., Santegoets, S., de Gruijl, T.D., Gibbs, S., and Lindstedt, M. (2013). Transcriptional profiling of human dendritic cell populations and models--unique profiles of in vitro dendritic cells and implications on functionality and applicability. *PloS one* 8, e52875.

Ma, B.J., Alam, S.M., Go, E.P., Lu, X., Desaire, H., Tomaras, G.D., Bowman, C., Sutherland, L.L., Searce, R.M., Santra, S., *et al.* (2011). Envelope deglycosylation enhances antigenicity of HIV-1 gp41 epitopes for both broad neutralizing antibodies and their unmutated ancestor antibodies. *PLoS pathogens* 7, e1002200.

Macagno, A., Bernasconi, N.L., Vanzetta, F., Dander, E., Sarasini, A., Revello, M.G., Gerna, G., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (2010). Isolation of human monoclonal antibodies that potently neutralize human cytomegalovirus infection by targeting different epitopes on the gH/gL/UL128-131A complex. *Journal of virology* 84, 1005-1013.

Mach, M., Kropff, B., Dal Monte, P., and Britt, W. (2000). Complex formation by human cytomegalovirus glycoproteins M (gpUL100) and N (gpUL73). *Journal of virology* 74, 11881-11892.

Maidji, E., Nigro, G., Tabata, T., McDonagh, S., Nozawa, N., Shiboski, S., Muci, S., Anceschi, M.M., Aziz, N., Adler, S.P., *et al.* (2010). Antibody treatment promotes compensation for human cytomegalovirus-induced pathogenesis and a hypoxia-like condition in placentas with congenital infection. *The American journal of pathology* 177, 1298-1310.

Martinez, O., Ndungo, E., Tantral, L., Miller, E.H., Leung, L.W., Chandran, K., and Basler, C.F. (2013). A mutation in the Ebola virus envelope glycoprotein restricts viral entry in a host species- and cell-type-specific manner. *Journal of virology* 87, 3324-3334.

Marty, F.M., Ljungman, P., Papanicolaou, G.A., Winston, D.J., Chemaly, R.F., Strasfeld, L., Young, J.A., Rodriguez, T., Maertens, J., Schmitt, M., *et al.* (2011). Maribavir prophylaxis for prevention of cytomegalovirus disease in recipients of allogeneic stem-cell transplants: a phase 3, double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *The Lancet infectious diseases* 11, 284-292.

Mathys, L., Francois, K.O., Quandte, M., Braakman, I., and Balzarini, J. (2014). Deletion of the highly conserved N-glycan at Asn260 of HIV-1 gp120 affects folding and lysosomal degradation of gp120, and results in loss of viral infectivity. *PloS one* 9, e101181.

- Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296, 301-305.
- McKeating, J.A., Grundy, J.E., Varghese, Z., and Griffiths, P.D. (1986). Detection of cytomegalovirus by ELISA in urine samples is inhibited by beta 2 microglobulin. *Journal of medical virology* 18, 341-348.
- McLaughlin-Taylor, E., Pande, H., Forman, S.J., Tanamachi, B., Li, C.R., Zaia, J.A., Greenberg, P.D., and Riddell, S.R. (1994). Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8+ virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Journal of medical virology* 43, 103-110.
- Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nature reviews Immunology* 1, 135-145.
- Miller, D.M., Cebulla, C.M., Rahill, B.M., and Sedmak, D.D. (2001). Cytomegalovirus and transcriptional down-regulation of major histocompatibility complex class II expression. *Seminars in immunology* 13, 11-18.
- Mitchell, D.A., Fadden, A.J., and Drickamer, K. (2001). A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands. *The Journal of biological chemistry* 276, 28939-28945.
- Mocarski, E.S., Jr. (2002). Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative strategies beyond evasion. *Trends in microbiology* 10, 332-339.
- Mondotte, J.A., Lozach, P.Y., Amara, A., and Gamarnik, A.V. (2007). Essential role of dengue virus envelope protein N glycosylation at asparagine-67 during viral propagation. *Journal of virology* 81, 7136-7148.
- Mummidi, S., Catano, G., Lam, L., Hoefle, A., Telles, V., Begum, K., Jimenez, F., Ahuja, S.S., and Ahuja, S.K. (2001). Extensive repertoire of membrane-bound and soluble dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin 1 (DC-SIGN1) and DC-SIGN2 isoforms. Inter-individual variation in expression of DC-SIGN transcripts. *The Journal of biological chemistry* 276, 33196-33212.
- Munger, J., Yu, D., and Shenk, T. (2006). UL26-deficient human cytomegalovirus produces virions with hypophosphorylated pp28 tegument protein that is unstable within newly infected cells. *Journal of virology* 80, 3541-3548.
- Murph, J.R., Bale, J.F., Jr., JC, M., Stinski, M.F., and S, P. (1986). Cytomegalovirus transmission in a Midwest day care center: possible relationship to child care practices. *The Journal of pediatrics*.
- Murrell, I., Tomasec, P., Wilkie, G.S., Dargan, D.J., Davison, A.J., and Stanton, R.J. (2013). Impact of sequence variation in the UL128 locus on production of human cytomegalovirus in fibroblast and epithelial cells. *Journal of virology* 87, 10489-10500.
- Nash, P., Barry, M., Seet, B.T., Veugelers, K., Hota, S., Heger, J., Hodgkinson, C., Graham, K., Jackson, R.J., and McFadden, G. (2000). Post-translational modification of the myxoma-virus anti-inflammatory serpin SERP-1 by a virally encoded sialyltransferase. *The Biochemical journal* 347, 375-382.
- Navarro, D., Paz, P., and Pereira, L. (1992). Domains of herpes simplex virus I glycoprotein B that function in virus penetration, cell-to-cell spread, and cell fusion. *Virology* 186, 99-112.

- Nelson, C.T., and Demmler, G.J. (1997). Cytomegalovirus infection in the pregnant mother, fetus, and newborn infant. *Clinics in perinatology* 24, 151-160.
- Nystrom, K., Biller, M., Grahn, A., Lindh, M., Larson, G., and Olofsson, S. (2004). Real time PCR for monitoring regulation of host gene expression in herpes simplex virus type 1-infected human diploid cells. *Journal of virological methods* 118, 83-94.
- Nystrom, K., Grahn, A., Lindh, M., Brytting, M., Mandel, U., Larson, G., and Olofsson, S. (2007). Virus-induced transcriptional activation of host FUT genes associated with neo-expression of Ley in cytomegalovirus-infected and sialyl-Lex in varicella-zoster virus-infected diploid human cells. *Glycobiology* 17, 355-366.
- Nystrom, K., Norden, R., Muylaert, I., Elias, P., Larson, G., and Olofsson, S. (2009). Induction of sialyl-Lex expression by herpes simplex virus type 1 is dependent on viral immediate early RNA-activated transcription of host fucosyltransferase genes. *Glycobiology* 19, 847-859.
- Ogert, R.A., Lee, M.K., Ross, W., Buckler-White, A., Martin, M.A., and Cho, M.W. (2001). N-linked glycosylation sites adjacent to and within the V1/V2 and the V3 loops of dualtropic human immunodeficiency virus type 1 isolate DH12 gp120 affect coreceptor usage and cellular tropism. *Journal of virology* 75, 5998-6006.
- Ojosnegros, S., Beerenwinkel, N., Antal, T., Nowak, M.A., Escarmis, C., and Domingo, E. (2010). Competition-colonization dynamics in an RNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 2108-2112.
- Pachl, C., Probert, W.S., Hermsen, K.M., Masiarz, F.R., Rasmussen, L., Merigan, T.C., and Spaete, R.R. (1989). The human cytomegalovirus strain Towne glycoprotein H gene encodes glycoprotein p86. *Virology* 169, 418-426.
- Paessens, L.C., Garcia-Vallejo, J.J., Fernandes, R.J., and van Kooyk, Y. (2007). The glycosylation of thymic microenvironments. A microscopic study using plant lectins. *Immunology letters* 110, 65-73.
- Pass, R.F. (2009). Development and evidence for efficacy of CMV glycoprotein B vaccine with MF59 adjuvant. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 46 Suppl 4, S73-76.
- Pass, R.F., and Hutto, C. (1986). Group day care and cytomegaloviral infections of mothers and children. *Reviews of infectious diseases* 8, 599-605.
- Pass, R.F., Stagno, S., Dworsky, M.E., Smith, R.J., and Alford, C.A. (1982). Excretion of cytomegalovirus in mothers: observations after delivery of congenitally infected and normal infants. *The Journal of infectious diseases* 146, 1-6.
- Pass, R.F., Zhang, C., Evans, A., Simpson, T., Andrews, W., Huang, M.L., Corey, L., Hill, J., Davis, E., Flanagan, C., *et al.* (2009). Vaccine prevention of maternal cytomegalovirus infection. *The New England journal of medicine* 360, 1191-1199.
- Patrone, M., Carinhas, N., Sousa, M.Q., Peixoto, C., Ciferri, C., Carfi, A., and Alves, P.M. (2014). Enhanced expression of full-length human cytomegalovirus fusion protein in non-swelling baculovirus-infected cells with a minimal fed-batch strategy. *PloS one* 9, e90753.

- Peguet-Navarro, J., Moulon, C., Caux, C., Dalbiez-Gauthier, C., Banchereau, J., and Schmitt, D. (1994). Interleukin-10 inhibits the primary allogeneic T cell response to human epidermal Langerhans cells. *European journal of immunology* 24, 884-891.
- Pellett, P.E., and B. Roizman (2007). The family Herpesviridae: a brief introduction. *Fields Virology II*.
- Pepperl, S., Munster, J., Mach, M., Harris, J.R., and Plachter, B. (2000). Dense bodies of human cytomegalovirus induce both humoral and cellular immune responses in the absence of viral gene expression. *Journal of virology* 74, 6132-6146.
- Pietropaolo, R.L., and Compton, T. (1997). Direct interaction between human cytomegalovirus glycoprotein B and cellular annexin II. *Journal of virology* 71, 9803-9807.
- Plachter, B., Sinzger, C., and Jahn, G. (1996). Cell types involved in replication and distribution of human cytomegalovirus. *Advances in virus research* 46, 195-261.
- Plazolles, N., Humbert, J.M., Vachot, L., Verrier, B., Hocke, C., and Halary, F. (2011). Pivotal advance: The promotion of soluble DC-SIGN release by inflammatory signals and its enhancement of cytomegalovirus-mediated cis-infection of myeloid dendritic cells. *Journal of leukocyte biology* 89, 329-342.
- Pohlmann, S., Baribaud, F., and Doms, R.W. (2001). DC-SIGN and DC-SIGNR: helping hands for HIV. *Trends in immunology* 22, 643-646.
- Pohlmann, S., Zhang, J., Baribaud, F., Chen, Z., Leslie, G.J., Lin, G., Granelli-Piperno, A., Doms, R.W., Rice, C.M., and McKeating, J.A. (2003). Hepatitis C Virus Glycoproteins Interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *Journal of virology* 77, 4070-4080.
- Potzsch, S., Spindler, N., Wiegers, A.K., Fisch, T., Rucker, P., Sticht, H., Grieb, N., Baroti, T., Weisel, F., Stamminger, T., *et al.* (2011). B cell repertoire analysis identifies new antigenic domains on glycoprotein B of human cytomegalovirus which are target of neutralizing antibodies. *PLoS pathogens* 7, e1002172.
- Quinnan, G.J., Kirmani, N., Rook, A., Manischewitz, J., Jackson, L., Moreschi, G., Santos, G., Saral, R., and Burns, W. (1982). Cytotoxic t cells in cytomegalovirus infection: HLA-restricted T-lymphocyte and non-T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients. *N Engl J Med* 307.
- Rademacher, T., Parekh, R., and Dwek, R. (1988). *Glycobiology. annual review of biochemistry* 57, 785-838.
- Rafailidis, P.I., Mourtzoukou, E.G., Varbobitis, I.C., and Falagas, M.E. (2008). Severe cytomegalovirus infection in apparently immunocompetent patients: a systematic review. *Virology journal* 5, 47.
- Ramanan, P., and Razonable, R.R. (2013). Cytomegalovirus infections in solid organ transplantation: a review. *Infection & chemotherapy* 45, 260-271.
- Randolph, G.J., Ochando, J., and Partida-Sanchez, S. (2008). Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annual review of immunology* 26, 293-316.
- Rappocciolo, G., Jenkins, F.J., Hensler, H.R., Piazza, P., Jais, M., Borowski, L., Watkins, S.C., and Rinaldo, C.R. (2006). DC-SIGN Is a Receptor for Human Herpesvirus 8 on Dendritic Cells and Macrophages. *The Journal of Immunology* 176, 1741-1749.

Rentenaar, R.J., Gamadia, L.E., van DerHoek, N., van Diepen, F.N., Boom, R., Weel, J.F., Wertheim-van Dillen, P.M., van Lier, R.A., and ten Berge, I.J. (2000). Development of virus-specific CD4(+) T cells during primary cytomegalovirus infection. *The Journal of clinical investigation* 105, 541-548.

Reschke, M., Reis, B., Noding, K., Rohsiepe, D., Richter, A., Mockenhaupt, T., Garten, W., and Radsak, K. (1995). Constitutive expression of human cytomegalovirus glycoprotein B (gpUL55) with mutagenized carboxy-terminal hydrophobic domains. *The Journal of general virology* 76 (Pt 1), 113-122.

Reynolds, D.W., Stagno, S., Hosty, T.S., Tiller, M., and Alford, C.A., Jr. (1973). Maternal cytomegalovirus excretion and perinatal infection. *The New England journal of medicine* 289, 1-5.

Riegler, S., Hebart, H., Einsele, H., Brossart, P., Jahn, G., and Sinzger, C. (2000). Monocyte-derived dendritic cells are permissive to the complete replicative cycle of human cytomegalovirus. *The Journal of general virology* 81, 393-399.

Rojo, J., and Delgado, R. (2004). Glycodendritic structures: promising new antiviral drugs. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 54, 579-581.

Romani, N., Clausen, B.E., and Stoitzner, P. (2010). Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunological reviews* 234, 120-141.

Ryckman, B.J., Jarvis, M.A., Drummond, D.D., Nelson, J.A., and Johnson, D.C. (2006). Human cytomegalovirus entry into epithelial and endothelial cells depends on genes UL128 to UL150 and occurs by endocytosis and low-pH fusion. *Journal of virology* 80, 710-722.

Salazar-Mather, T.P., Lewis, C.A., and Biron, C.A. (2002). Type I interferons regulate inflammatory cell trafficking and macrophage inflammatory protein 1 α delivery to the liver. *Journal of Clinical Investigation* 110, 321-330.

Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *The Journal of experimental medicine* 179, 1109-1118.

Sallusto, F., Schaerli, P., Loetscher, P., Schaniel, C., Lenig, D., Mackay, C.R., Qin, S., and Lanzavecchia, A. (1998). Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *European journal of immunology* 28, 2760-2769.

Sattin, S., Daghetti, A., Thepaut, M., Berzi, A., Sanchez-Navarro, M., Tabarani, G., Rojo, J., Fieschi, F., Clerici, M., and Bernardi, A. (2010). Inhibition of DC-SIGN-mediated HIV infection by a linear trimannoside mimic in a tetravalent presentation. *ACS chemical biology* 5, 301-312.

Segura, E., Touzot, M., Bohineust, A., Cappuccio, A., Chiochia, G., Hosmalin, A., Dalod, M., Soumelis, V., and Amigorena, S. (2013). Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. *Immunity* 38, 336-348.

Serrano-Gomez, D., Sierra-Filardi, E., Martinez-Nunez, R.T., Caparros, E., Delgado, R., Munoz-Fernandez, M.A., Abad, M.A., Jimenez-Barbero, J., Leal, M., and Corbi, A.L. (2008). Structural requirements for multimerization of the pathogen receptor dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (CD209) on the cell surface. *The Journal of biological chemistry* 283, 3889-3903.

- Sharma, S., Wisner, T.W., Johnson, D.C., and Heldwein, E.E. (2013). HCMV gB shares structural and functional properties with gB proteins from other herpesviruses. *Virology* 435, 239-249.
- Shortman, K., and Naik, S.H. (2007). Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nature reviews Immunology* 7, 19-30.
- Sijmons, S., Thys, K., Corthout, M., Van Damme, E., Van Loock, M., Bollen, S., Baguet, S., Aerssens, J., Van Ranst, M., and Maes, P. (2014). A method enabling high-throughput sequencing of human cytomegalovirus complete genomes from clinical isolates. *PloS one* 9, e95501.
- Simmen, K.A., Singh, J., Luukkonen, B.G., Lopper, M., Bittner, A., Miller, N.E., Jackson, M.R., Compton, T., and Fruh, K. (2001). Global modulation of cellular transcription by human cytomegalovirus is initiated by viral glycoprotein B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 7140-7145.
- Sinzger, C., Digel, M., and Jahn, G. (2008). Cytomegalovirus cell tropism. *Current topics in microbiology and immunology* 325, 63-83.
- Sinzger, C., and Jahn, G. (1996). Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. *Intervirology* 39, 302-319.
- Smith, I.L., Cherrington, J.M., Jiles, R.E., Fuller, M.D., Freeman, W.R., and Spector, S.A. (1997). High-level resistance of cytomegalovirus to ganciclovir is associated with alterations in both the UL97 and DNA polymerase genes. *The Journal of infectious diseases* 176, 69-77.
- Snyder, G.A., Ford, J., Torabi-Parizi, P., Arthos, J.A., Schuck, P., Colonna, M., and Sun, P.D. (2005). Characterization of DC-SIGN/R interaction with human immunodeficiency virus type 1 gp120 and ICAM molecules favors the receptor's role as an antigen-capturing rather than an adhesion receptor. *Journal of virology* 79, 4589-4598.
- Soderberg, C., Giugni, T.D., Zaia, J.A., Larsson, S., Wahlberg, J.M., and Moller, E. (1993). CD13 (human aminopeptidase N) mediates human cytomegalovirus infection. *Journal of virology* 67, 6576-6585.
- Soilleux, E.J., Barten, R., and Trowsdale, J. (2000). DC-SIGN; a related gene, DC-SIGNR; and CD23 form a cluster on 19p13. *J Immunol* 165, 2937-2942.
- Song, M.-K., Azen, S.P., Buley, A., Torriani, F., Cheng, L., Chaidhawangul, S., Ozerdem, U., Scholz, B., and Freeman, W.R. (2003). Effect of anti-cytomegalovirus therapy on the incidence of immune recovery uveitis in AIDS patients with healed cytomegalovirus retinitis. *American Journal of Ophthalmology* 136, 696-702.
- Soroceanu, L., Akhavan, A., and Cobbs, C.S. (2008). Platelet-derived growth factor-alpha receptor activation is required for human cytomegalovirus infection. *Nature* 455, 391-395.
- Spindler, N., Diestel, U., Stump, J.D., Wiegers, A.K., Winkler, T.H., Sticht, H., Mach, M., and Muller, Y.A. (2014). Structural basis for the recognition of human cytomegalovirus glycoprotein B by a neutralizing human antibody. *PLoS pathogens* 10, e1004377.
- Spindler, N., Rucker, P., Potzsch, S., Diestel, U., Sticht, H., Martin-Parras, L., Winkler, T.H., and Mach, M. (2013). Characterization of a discontinuous neutralizing epitope on glycoprotein B of human cytomegalovirus. *Journal of virology* 87, 8927-8939.

- Stambach, N.S., and Taylor, M.E. (2003). Characterization of carbohydrate recognition by langerin, a C-type lectin of Langerhans cells. *Glycobiology* *13*, 401-410.
- Stanton, R.J., Baluchova, K., Dargan, D.J., Cunningham, C., Sheehy, O., Seirafian, S., McSharry, B.P., Neale, M.L., Davies, J.A., Tomasec, P., *et al.* (2010). Reconstruction of the complete human cytomegalovirus genome in a BAC reveals RL13 to be a potent inhibitor of replication. *The Journal of clinical investigation* *120*, 3191-3208.
- Steinman, R.M., Adams, J.C., and Cohn, Z.A. (1975). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen. *The Journal of experimental medicine* *141*, 804-820.
- Steinman, R.M., and Cohn, Z.A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of experimental medicine* *137*, 1142-1162.
- Steinman, R.M., Lustig, D.S., and Cohn, Z.A. (1974). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. *The Journal of experimental medicine* *139*, 1431-1445.
- Steven, A.C., and Spear, P.G. (2006). Biochemistry. Viral glycoproteins and an evolutionary conundrum. *Science* *313*, 177-178.
- Stossel, H., Koch, F., Kampgen, E., Stoger, P., Lenz, A., Heufler, C., Romani, N., and Schuler, G. (1990). Disappearance of certain acidic organelles (endosomes and Langerhans cell granules) accompanies loss of antigen processing capacity upon culture of epidermal Langerhans cells. *The Journal of experimental medicine* *172*, 1471-1482.
- Su, S.V., Hong, P., Baik, S., Negrete, O.A., Gurney, K.B., and Lee, B. (2004). DC-SIGN binds to HIV-1 glycoprotein 120 in a distinct but overlapping fashion compared with ICAM-2 and ICAM-3. *The Journal of biological chemistry* *279*, 19122-19132.
- Sujino, K., Jackson, R.J., Chan, N.W., Tsuji, S., and Palcic, M.M. (2000). A novel viral alpha2,3-sialyltransferase (v-ST3Gal I): transfer of sialic acid to fucosylated acceptors. *Glycobiology* *10*, 313-320.
- Sutkeviciute, I., Thepaut, M., Sattin, S., Berzi, A., McGeagh, J., Grudinin, S., Weiser, J., Le Roy, A., Reina, J.J., Rojo, J., *et al.* (2014). Unique DC-SIGN clustering activity of a small glycomimetic: A lesson for ligand design. *ACS chemical biology* *9*, 1377-1385.
- Syggelou, A., Iacovidou, N., Kloudas, S., Christoni, Z., and Papaevangelou, V. (2010). Congenital cytomegalovirus infection. *Annals of the New York Academy of Sciences* *1205*, 144-147.
- Tabarani, G., Thepaut, M., Stroebel, D., Ebel, C., Vives, C., Vachette, P., Durand, D., and Fieschi, F. (2009). DC-SIGN neck domain is a pH-sensor controlling oligomerization: SAXS and hydrodynamic studies of extracellular domain. *The Journal of biological chemistry* *284*, 21229-21240.
- Tailleux, L., Pham-Thi, N., Bergeron-Lafaurie, A., Herrmann, J.L., Charles, P., Schwartz, O., Scheinmann, P., Lagrange, P.H., de Blic, J., Tazi, A., *et al.* (2005). DC-SIGN induction in alveolar macrophages defines privileged target host cells for mycobacteria in patients with tuberculosis. *PLoS medicine* *2*, e381.

- Tang, A., Amagai, M., Granger, L.G., Stanley, J.R., and Udey, M.C. (1993). Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature* 361, 82-85.
- Thepaut, M., Valladeau, J., Nurisso, A., Kahn, R., Arnou, B., Vives, C., Saeland, S., Ebel, C., Monnier, C., Dezutter-Dambuyant, C., *et al.* (2009). Structural studies of langerin and Birbeck granule: a macromolecular organization model. *Biochemistry* 48, 2684-2698.
- Tischer, B.K., Smith, G.A., and Osterrieder, N. (2010). En passant mutagenesis: a two step markerless red recombination system. *Methods Mol Biol* 634, 421-430.
- Tomasec, P., Braud, V.M., Rickards, C., Powell, M.B., McSharry, B.P., Gadola, S., Cerundolo, V., Borysiewicz, L.K., McMichael, A.J., and Wilkinson, G.W. (2000). Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science* 287, 1031.
- Towler, J.C., Ebrahimi, B., Lane, B., Davison, A.J., and Dargan, D.J. (2012). Human cytomegalovirus transcriptome activity differs during replication in human fibroblast, epithelial and astrocyte cell lines. *The Journal of general virology* 93, 1046-1058.
- Tsuchiya, K., Ode, H., Hayashida, T., Kakizawa, J., Sato, H., Oka, S., and Gatanaga, H. (2013). Arginine insertion and loss of N-linked glycosylation site in HIV-1 envelope V3 region confer CXCR4-tropism. *Scientific reports* 3, 2389.
- Tugizov, S., Maidji, E., Xiao, J., Zheng, Z., and Pereira, L. (1998). Human cytomegalovirus glycoprotein B contains autonomous determinants for vectorial targeting to apical membranes of polarized epithelial cells. *Journal of virology* 72, 7374-7386.
- Turville, S.G., Cameron, P.U., Handley, A., Lin, G., Pohlmann, S., Doms, R.W., and Cunningham, A.L. (2002). Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nature immunology* 3, 975-983.
- Turville, S.G., Santos, J.J., Frank, I., Cameron, P.U., Wilkinson, J., Miranda-Saksena, M., Dable, J., Stossel, H., Romani, N., Piatak, M., Jr., *et al.* (2004). Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood* 103, 2170-2179.
- Urban, M., Klein, M., Britt, W., E, H., and Mach, M. (1996). Glycoprotein H of human cytomegalovirus is a major antigen for the neutralizing humoral immune response. *The Journal of general virology* 77, 1537-1546.
- Valladeau, J., Ravel, O., Dezutter-Dambuyant, C., Moore, K., Kleijmeer, M., Liu, Y., Duvert-Frances, V., Vincent, C., Schmitt, D., Davoust, J., *et al.* (2000). Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 12, 71-81.
- Van Breedam, W., Pohlmann, S., Favoreel, H.W., de Groot, R.J., and Nauwynck, H.J. (2014). Bitter-sweet symphony: glycan-lectin interactions in virus biology. *FEMS microbiology reviews* 38, 598-632.
- van Gisbergen, K.P., Aarnoudse, C.A., Meijer, G.A., Geijtenbeek, T.B., and van Kooyk, Y. (2005a). Dendritic cells recognize tumor-specific glycosylation of carcinoembryonic antigen on colorectal cancer cells through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin. *Cancer research* 65, 5935-5944.
- van Gisbergen, K.P., Paessens, L.C., Geijtenbeek, T.B., and van Kooyk, Y. (2005b). Molecular mechanisms that set the stage for DC-T cell engagement. *Immunology letters* 97, 199-208.

- van Kooyk, Y., and Geijtenbeek, T.B. (2003). DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nature reviews Immunology* 3, 697-709.
- Vanarsdall, A.L., and Johnson, D.C. (2012). Human cytomegalovirus entry into cells. *Current opinion in virology* 2, 37-42.
- Vanarsdall, A.L., Ryckman, B.J., Chase, M.C., and Johnson, D.C. (2008). Human cytomegalovirus glycoproteins gB and gH/gL mediate epithelial cell-cell fusion when expressed either in cis or in trans. *Journal of virology* 82, 11837-11850.
- Vanarsdall, A.L., Wisner, T.W., Lei, H., Kazlauskas, A., and Johnson, D.C. (2012). PDGF receptor-alpha does not promote HCMV entry into epithelial and endothelial cells but increased quantities stimulate entry by an abnormal pathway. *PLoS pathogens* 8, e1002905.
- Vanderplasschen, A., Markine-Goriaynoff, N., Lomonte, P., Suzuki, M., Hiraoka, N., Yeh, J.C., Bureau, F., Willems, L., Thiry, E., Fukuda, M., *et al.* (2000). A multipotential beta -1,6-N-acetylglucosaminyl-transferase is encoded by bovine herpesvirus type 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 5756-5761.
- Varga, N., Sutkeviciute, I., Ribeiro-Viana, R., Berzi, A., Ramdasi, R., Daghetti, A., Vettoretti, G., Amara, A., Clerici, M., Rojo, J., *et al.* (2014). A multivalent inhibitor of the DC-SIGN dependent uptake of HIV-1 and Dengue virus. *Biomaterials* 35, 4175-4184.
- Vasconcelos-Dos-Santos, A., Oliveira, I.A., Lucena, M.C., Mantuano, N.R., Whelan, S.A., Dias, W.B., and Todeschini, A.R. (2015). Biosynthetic Machinery Involved in Aberrant Glycosylation: Promising Targets for Developing of Drugs Against Cancer. *Frontiers in oncology* 5, 138.
- Vauloup-Fellous, C., Picone, O., Cordier, A.G., Parent-du-Chatelet, I., Senat, M.V., Frydman, R., and Grangeot-Keros, L. (2009). Does hygiene counseling have an impact on the rate of CMV primary infection during pregnancy? Results of a 3-year prospective study in a French hospital. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 46 Suppl 4, S49-53.
- Vey, M., Schafer, W., Reis, B., Ohuchi, R., Britt, W., Garten, W., Klenk, H.D., and Radsak, K. (1995). Proteolytic processing of human cytomegalovirus glycoprotein B (gpUL55) is mediated by the human endoprotease furin. *Virology* 206, 746-749.
- Villadangos, J.A., and Schnorrer, P. (2007). Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nature reviews Immunology* 7, 543-555.
- Villadangos, J.A., Schnorrer, P., and Wilson, N.S. (2005). Control of MHC class II antigen presentation in dendritic cells: a balance between creative and destructive forces. *Immunological reviews* 207, 191-205.
- Wang, D., and Shen, T. (2005). Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 18153-18158.
- Wang, X., Huang, D.Y., Huong, S.M., and Huang, E.S. (2005). Integrin alphavbeta3 is a coreceptor for human cytomegalovirus. *Nature medicine* 11, 515-521.
- Wang, X., Huong, S.M., Chiu, M.L., Raab-Traub, N., and Huang, E.S. (2003). Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature* 424, 456-461.

- Weis, W.I., Taylor, M.E., and Drickamer, K. (1998). The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunological reviews* 163, 19-34.
- Weller, T.H., Hanshaw, J.B., and Scott, D.E. (1960). Serologic differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease. *Virology* 12, 130-132.
- Wiegers, A.K., Sticht, H., Winkler, T.H., Britt, W.J., and Mach, M. (2015). Identification of a neutralizing epitope within antigenic domain 5 of glycoprotein B of human cytomegalovirus. *Journal of virology* 89, 361-372.
- Wille, P.T., Knoche, A.J., Nelson, J.A., Jarvis, M.A., and Johnson, D.C. (2010). A human cytomegalovirus gO-null mutant fails to incorporate gH/gL into the virion envelope and is unable to enter fibroblasts and epithelial and endothelial cells. *Journal of virology* 84, 2585-2596.
- Wille, P.T., Wisner, T.W., Ryckman, B., and Johnson, D.C. (2013). Human cytomegalovirus (HCMV) glycoprotein gB promotes virus entry in trans acting as the viral fusion protein rather than as a receptor-binding protein. *mBio* 4, e00332-00313.
- Willer, D.O., McFadden, G., and Evans, D.H. (1999). The complete genome sequence of Shope (rabbit) fibroma virus. *Virology* 264, 319-343.
- Wood, N.T., Fadda, E., Davis, R., Grant, O.C., Martin, J.C., Woods, R.J., and Travers, S.A. (2013). The influence of N-linked glycans on the molecular dynamics of the HIV-1 gp120 V3 loop. *PLoS one* 8, e80301.
- Wreghitt, T.G., Teare, E.L., Sule, O., Devi, R., and Rice, P. (2003). Cytomegalovirus infection in immunocompetent patients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 37, 1603-1606.
- Wright, J.F., Kurosky, A., Pryzdial, E.L., and Wasi, S. (1995). Host cellular annexin II is associated with cytomegalovirus particles isolated from cultured human fibroblasts. *Journal of virology* 69, 4784-4791.
- Wright, J.F., Kurosky, A., and Wasi, S. (1994). An endothelial cell-surface form of annexin II binds human cytomegalovirus. *Biochemical and biophysical research communications* 198, 983-989.
- Wussow, F., Chiappesi, F., Martinez, J., Campo, J., Johnson, E., Flechsig, C., Newell, M., Tran, E., Ortiz, J., La Rosa, C., *et al.* (2014). Human cytomegalovirus vaccine based on the envelope gH/gL pentamer complex. *PLoS pathogens* 10, e1004524.

Thèse de Doctorat

Coraline CHÉNEAU

Caractérisation moléculaire des interactions HCMV/cellules dendritiques : impact des glycosylations de l'enveloppe virale sur le tropisme.

Characterization of molecular interactions between HCMV and dendritic cells: impact of glycosylations on viral tropism.

Résumé

Les cellules dendritiques (DC) perçoivent et alertent de l'intrusion dans l'organisme d'agents pathogènes tels que des virus. Un type de récepteurs exprimés chez les DC myéloïdes, les lectines membranaires, peuvent reconnaître des virus. Nous avons montré antérieurement que le domaine lectine ou CRD (Carbohydrate Recognition Domain) de DC-SIGN interagissait avec une glycoprotéine d'enveloppe du cytomégalovirus humain (HCMV), la glycoprotéine B (gB) (Halary, 2002). Ce travail de thèse a participé à une meilleure caractérisation de l'interaction entre DC-SIGN et la gB. Pour cela nous avons utilisé des mutants de DC-SIGN, de la gB ainsi que des anticorps dirigés contre ces deux protéines. Nous avons aussi analysé les sucres à la surface de la gB et leur importance dans l'interaction avec DC-SIGN. De plus, nous nous sommes intéressés au tropisme du CMV. Les souches de HCMV amplifiées au laboratoire présentent un tropisme directement dépendant du type de cellule ayant servi à générer le stock viral (Towler, 2012). Le tropisme différentiel du CMV pour les cellules endothéliales ou des leucocytes du lignage myéloïde a été récemment imputé à un groupe de gènes viraux, UL128-UL131A. Néanmoins ces gènes n'expliquent pas tout (Lauron, 2014). Nous avons fait l'hypothèse que le tropisme du CMV pourrait être en partie dû à des différences de glycosylations (Nyström, 2007/2009). Pour explorer cette hypothèse, nous avons utilisé deux stocks de CMV produits sur fibroblastes ou sur cellules endothéliales et nous avons analysé les sucres de leur enveloppe, leur infectiosité et les voies de glycosylation impliquées lors de l'infection.

Mots clés

Cytomégalovirus, glycoprotéine B, cellules dendritiques, DC-SIGN, inhibiteurs, anticorps, tropisme et glycosylations

Abstract

Dendritic cells (DC) sense and alert the host after pathogenic virus intrusions. We have shown previously that the lectin domain of DC-SIGN could interact with the human cytomegalovirus (HCMV) envelope glycoprotein B (Halary, 2002). However, how these two molecules interact is not well defined. Therefore I've undertaken this characterization as a first goal of my thesis in order to establish whether or not the DC-SIGN/HCMV gB complex is basically a suitable target for further new therapeutic developments. To this aim, DC-SIGN and gB mutants as well as anti-DC-SIGN or -gB antibodies were used to delineate the interaction zone between both interactants. A second aim of my thesis work was to answer the question "are HCMV envelope glycosylated proteins involved in tropism alterations?". Briefly, it has been shown previously that laboratory strains tropism may be dependent on the producing cell type from which they were originating (Towler, 2012). This differential tropism of HCMV for endothelial cells and leukocytes was recently found to correlate with the presence of the UL128L locus in the viral genome. However, this locus cannot explain on its own the former observations. So we proposed that the HCMV tropism could be in part due to differential glycosylation profiles on HCMV particles. To start solving this question, I differentially analyzed glycoprofiles on two HCMV stocks respectively produced on fibroblasts and on an endothelial cell line via a home-made lectin-based interaction assay. Then I analyzed also their respective infectiousness and how glycosylation pathways might be altered at a basal state for each cell type and also in the course of infection

Key Words

Cytomegalovirus, glycoprotein B, dendritic cells, DC-SIGN, inhibitors, antibodies, tropism and glycosylations