# Interactions virus - cellules:
## Antigènes viraux, anticorps antiviraux

**Dr Dorian McILROY**

Virologie
UE Microbiologie-Pathologies
2024-2025

# Plan du cours

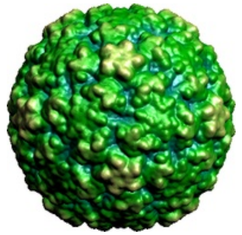
- Rappels: la réponse humorale dans les réponses antivirales
- Les antigènes viraux cibles des anticorps
- Les tests de séroneutralisation, à quoi ça sert?
- Les anticorps pour prévenir et traiter les infections virales
- Échappement viral à la neutralisation

Tropisme cellulaire

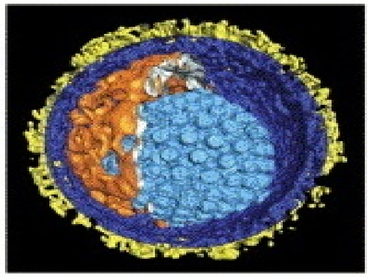
spécificité d'espèce

attachement-entrée

**Virus nu**
**- protéines de capside**



**Virus enveloppé**
**- glycoprotéines d'enveloppe**



Antigènes viraux de surface

réponse immunitaire

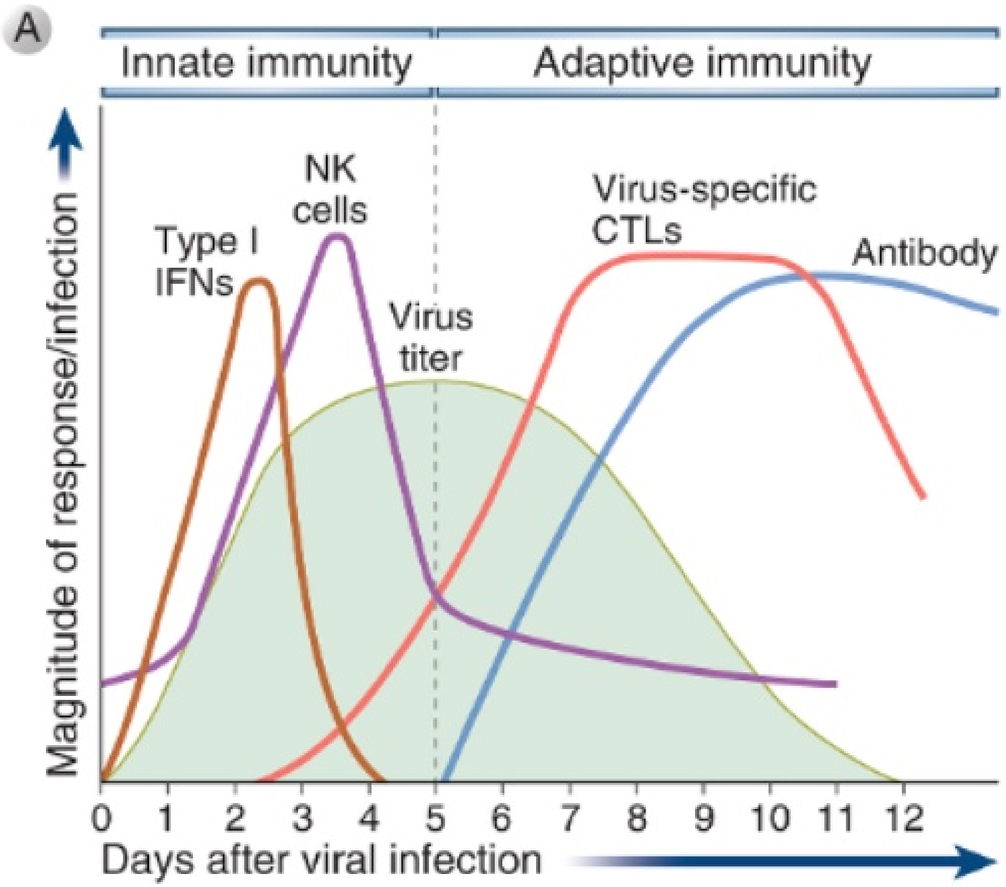
traitements antiviraux

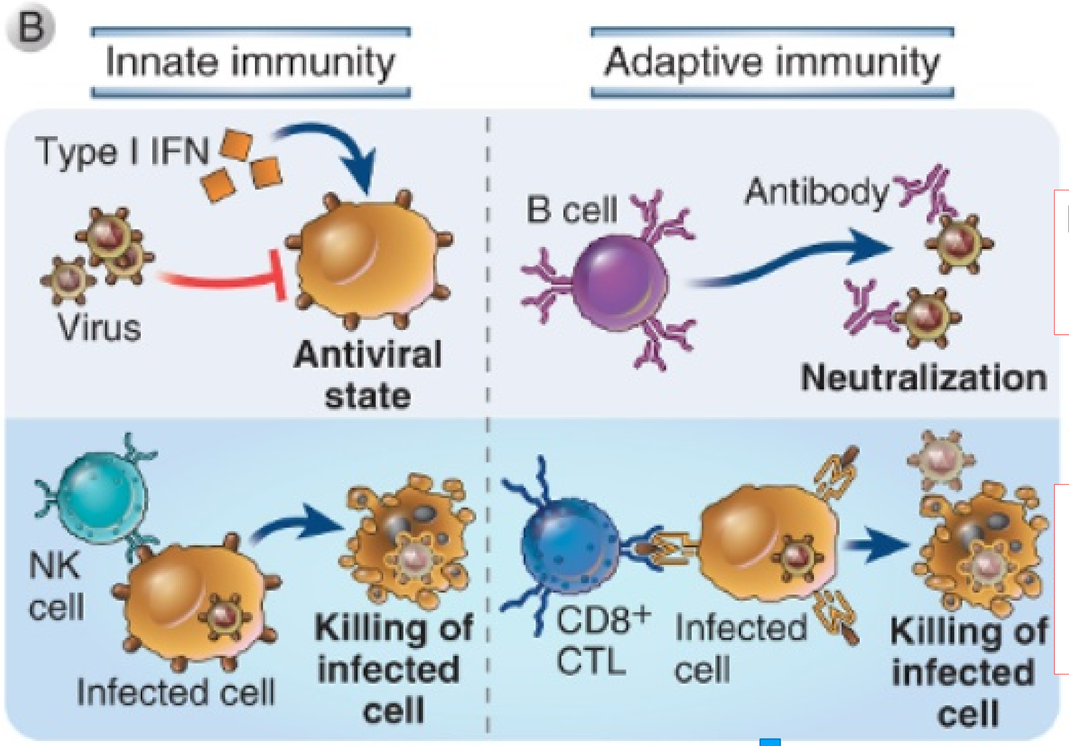
AC neutralisants naturels

immunothérapie

inhibiteurs d'entrée

# Dynamique des réponses innée et adaptative contre les virus



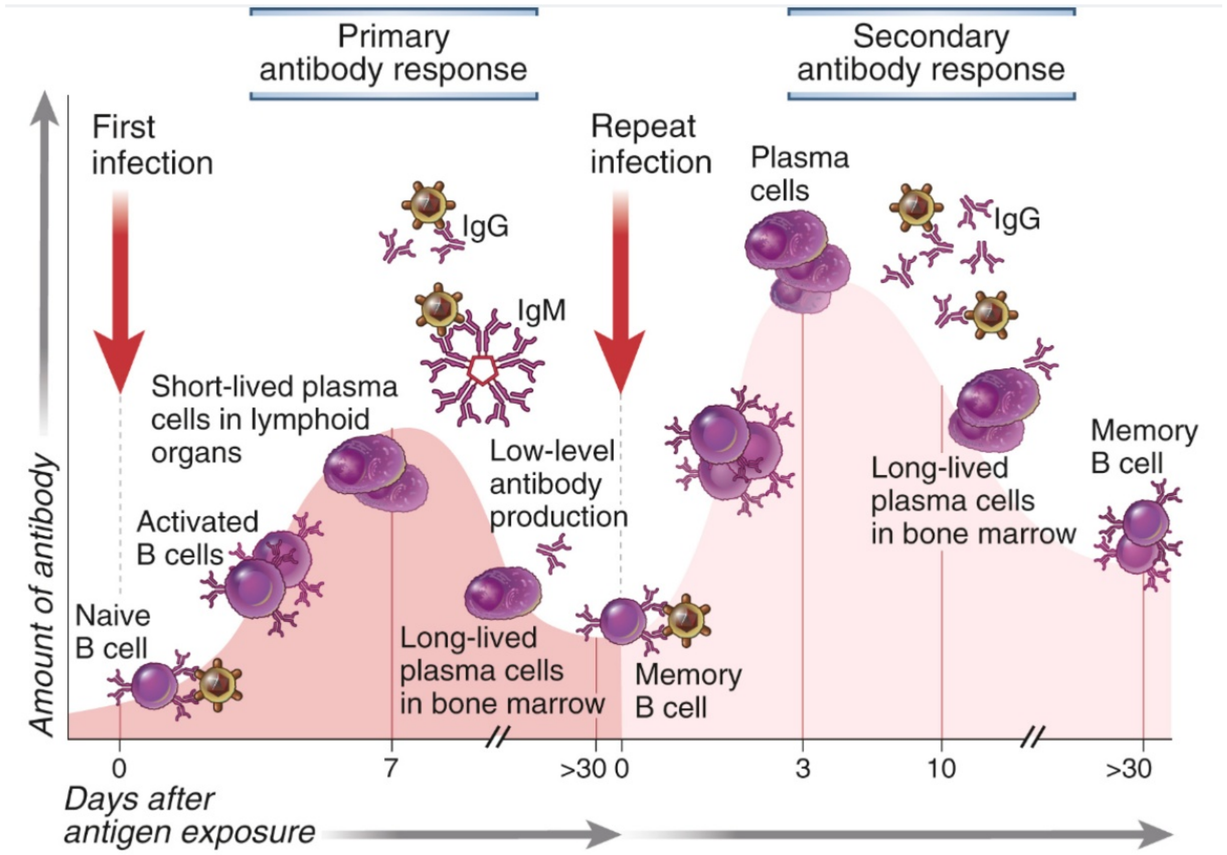



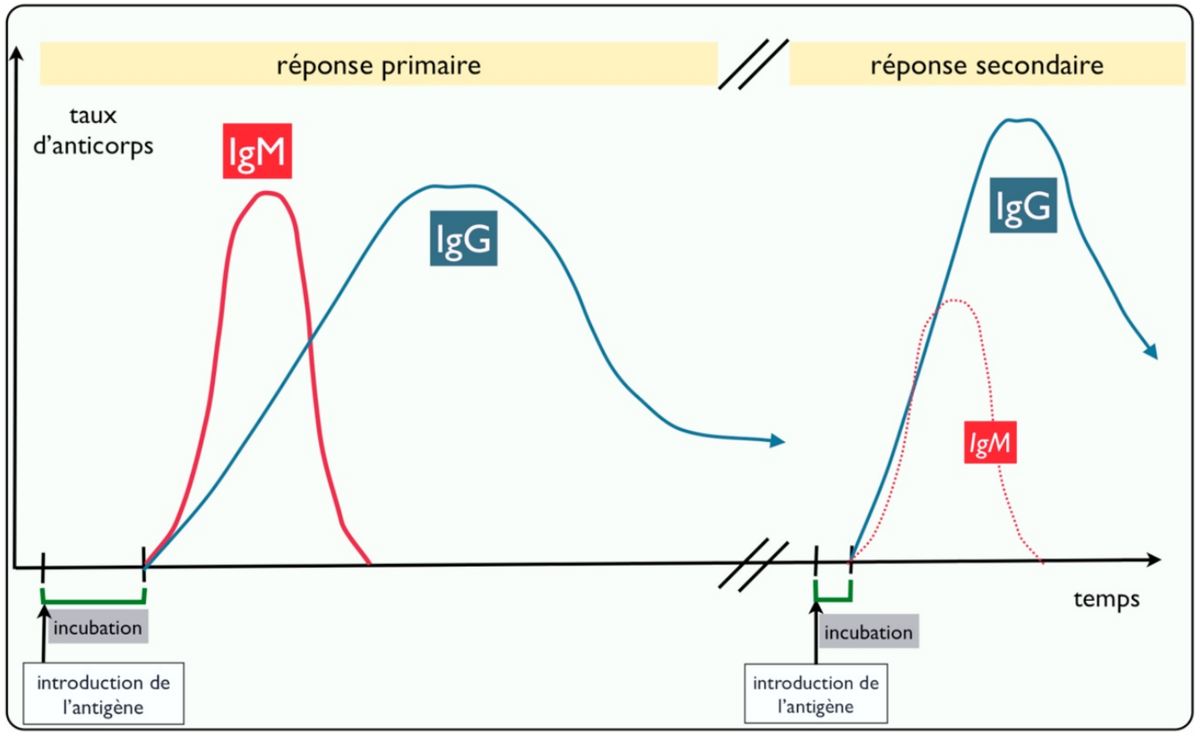

**Protection contre des infections futures**

**Eradication de l'infection**

Développement de lymphocytes **mémoires**
> protection à long terme

# Immunité adaptative: réponses humorale primaire et secondaire (= mémoire)

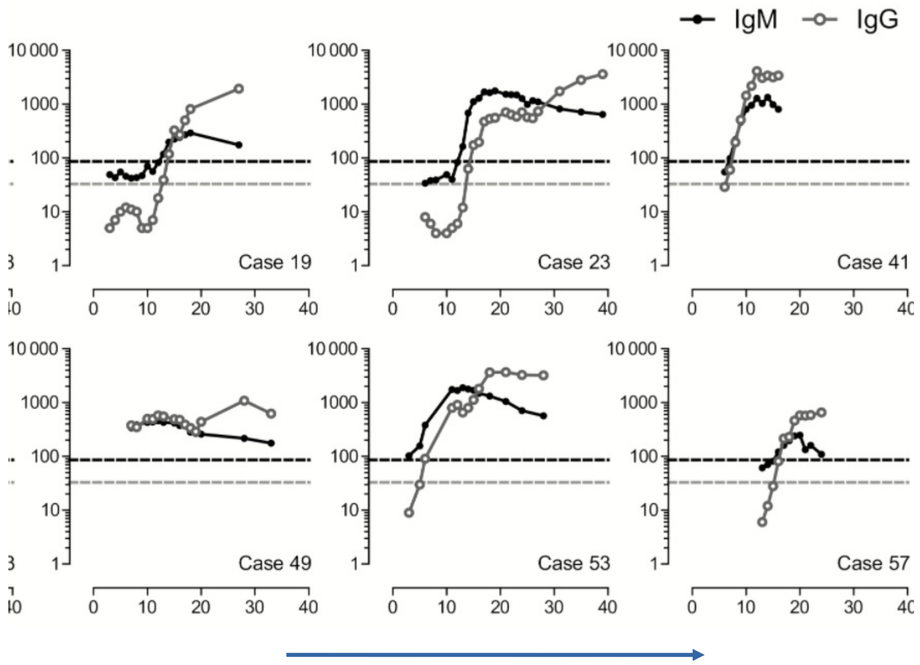



Dosages sérologiques des IgM et IgG spécifiques: intérêt pour le diagnostic des primo-infections virales

# Dynamique de la réponse humorale antivirale - exemples

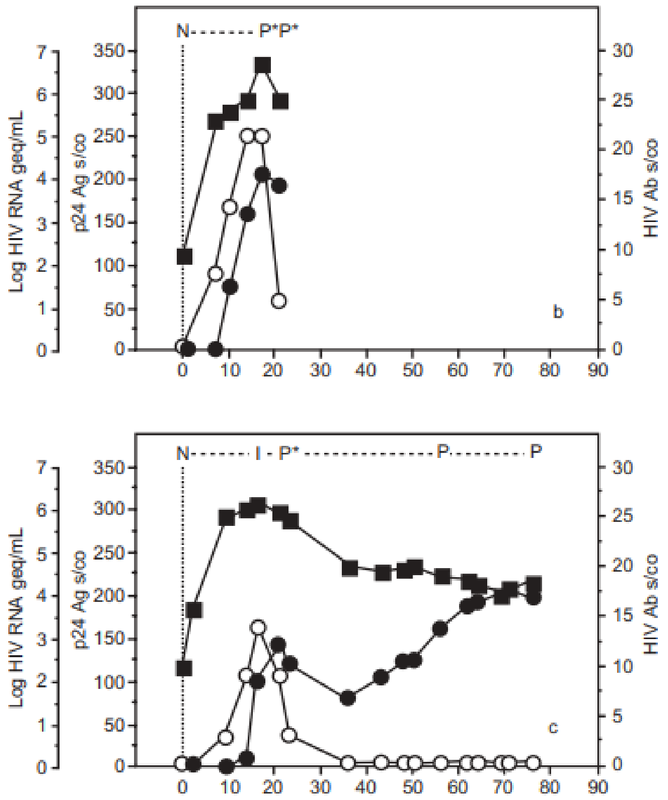
Etude de 94 infections **SARS-CoV2** aigues
ELISA anti-S IgG / IgM
Lynch et al. CID 2020




Jours depuis premiers symptômes

Séroconversion 1-2 semaines PSO
IgM souvent détectable ~2-3 jours avant IgG
A partir de 2-3 semaines PSO,
IgM baissent, IgG persiste

Etude de 44 primo-infections **VIH-1**
ELISA anti-VIH IgG / IgM
Fiebig et al. AIDS 2003




Jours depuis premier test ARN +ve

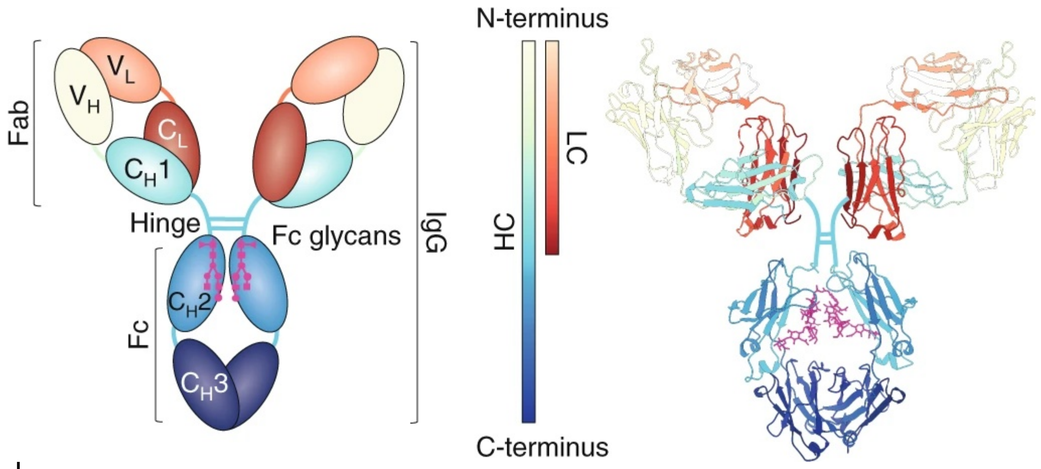
■ - Charge virale ARN
● - Titre anticorps (IgM+IgG)

○ - Antigène p24

Séroconversion 2-3 semaines
**Post-infection**
(première CV détectable)

Nantes Université

# Rappels: fonctions effectrices des AC




Structure d'un anticorps

*Murin CD, Nat Microbiol. 2019*

| Isotype | Activation Complément | FcγR (ADCC) | Neutralisation | Autres |
|---|---|---|---|---|
| IgM | + | - | + | |
| IgA1/A2 | - | - | + | FcαR (PMN, Eosino, Mono) |
| IgG1 | + | + | + | |
| IgG2 | + | - | + | |
| IgG3 | (faible) | + | + | |
| IgG4 | (faible) | - | + | |
| IgE | - | - | + ? | FcεR (Eosino, Masto) |

# La réponse humorale antivirale

- réponse adaptative humorale → production d'AC spécifiques
- **réponse AC primaire** = IgM + IgA à la surface des muqueuses / IgM + IgG dans le sérum
- **réponse AC secondaire** – principalement IgG, titre ↑↑↑
- IgA, IgM: Ig sécrétoires → infection localisée aux muqueuses
- IgG, IgM: ++ infection disséminée par voie lymphatique ou sanguine

- **AC neutralisants** : inhibition des étapes d'attachement et d'entrée infectieuse du virus
- +++ IgA et IgG de forte affinité
- **inhibition du pouvoir infectieux** des virus
- Déterminé par test de séroneutralisation en culture cellulaire

# Mécanismes d'action des Ac neutralisants

a) Déstabilisation de la glycoprotéine

b) Aggrégation des particules virales

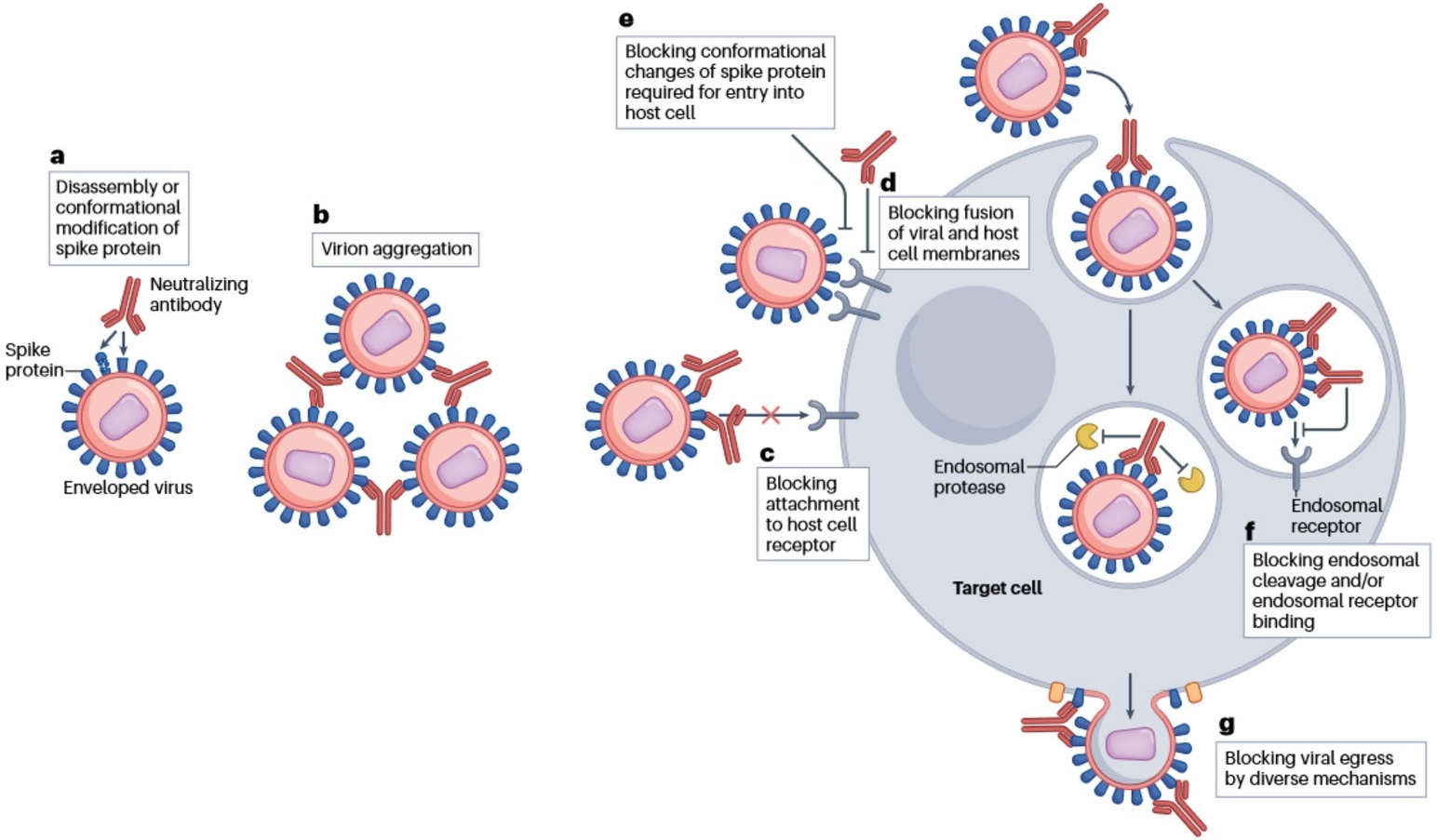
c) Blocage de la fixation au récepteur cellulaire

d) Blocage de la fusion membranaire

e) Inhibition des changements conformationnels nécessaires pour l'entrée

f) Blocage des étapes endosomales post-entrée

g) Inhibition de la libération

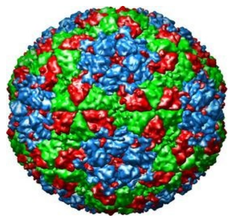


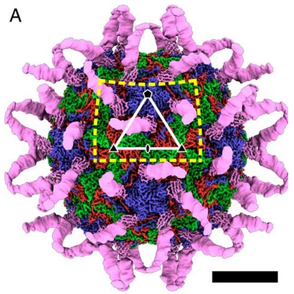



D'après Burton DR, Nat. Immunol. 2023, PMID 37069260

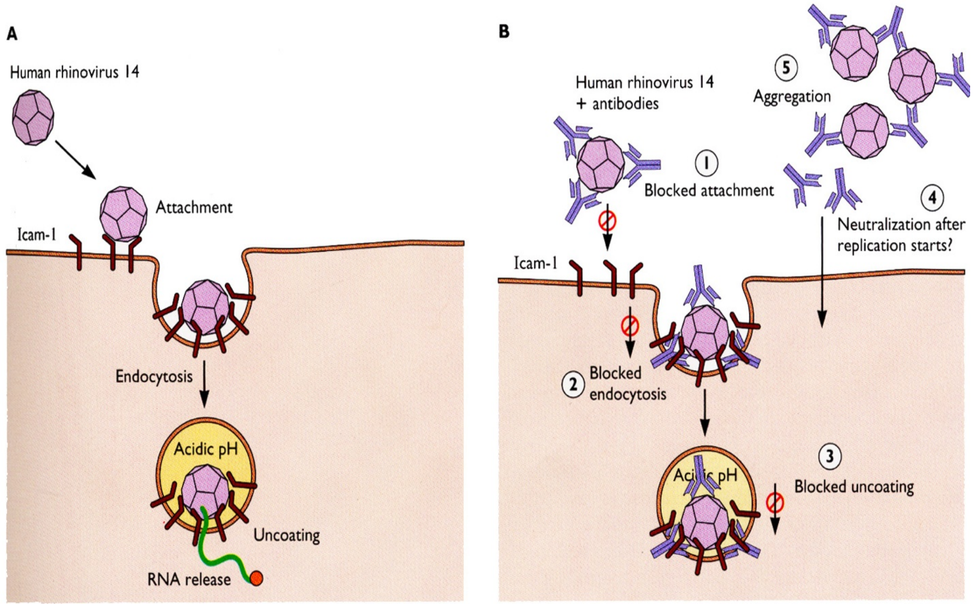
# Les anticorps neutralisants: exemple des rhinovirus

virus nus: protéines d'attachement = motifs conformationnels des protéines de capside

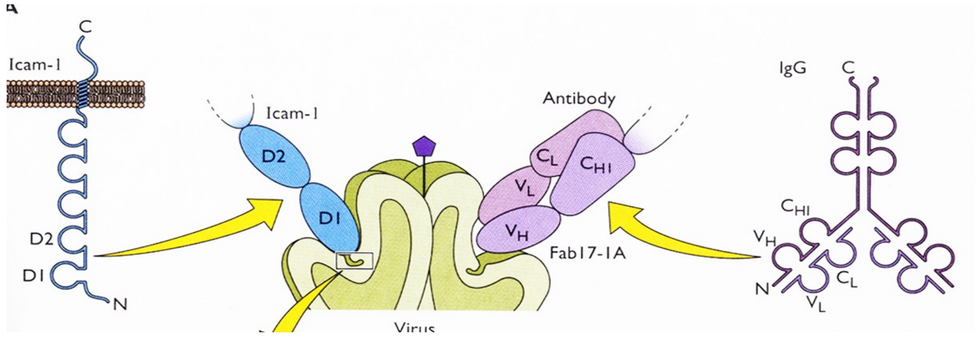




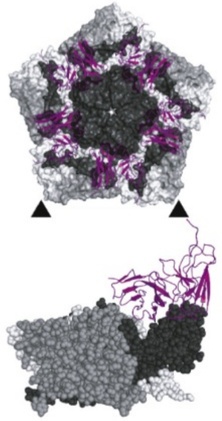

Hrebík D, PNAS 2021




Mécanisme de neutralisation 1 :
Blocage de la fixation au récepteur
(Ex. MAb 17-IA contre HRV-B14)

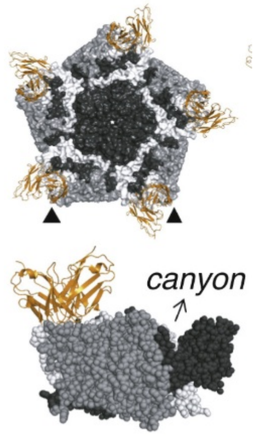



Anti-RV-B14
17-IA



Mécanisme de neutralisation 2 :
Changement conformationnel de capside
→ Libération prémature de l'ARN viral
(Ex. MAb C5 contre HRV-B14)

Anti-RV-B14
C5



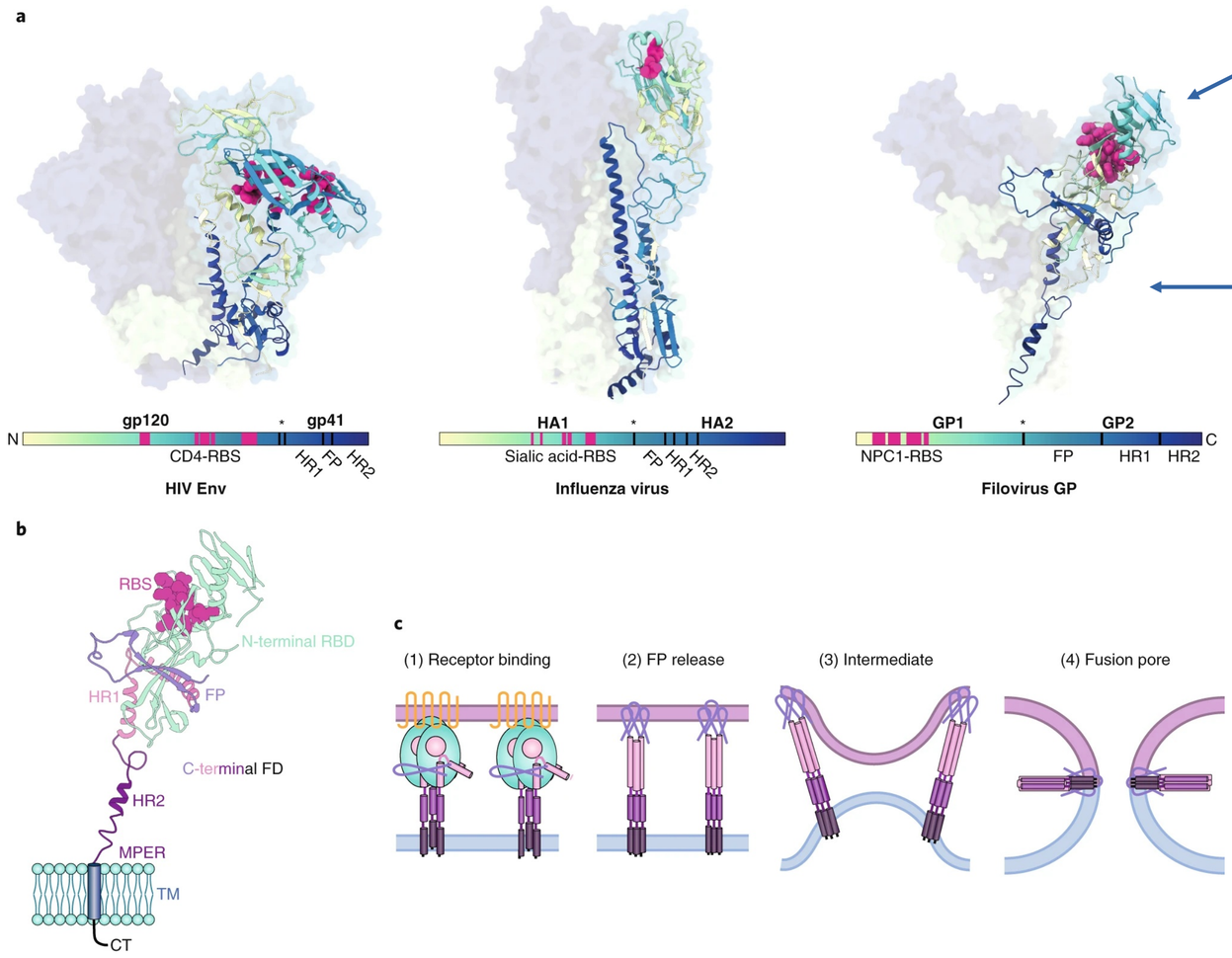

Huang Curr. Opin.Virol. 2021

# Les anticorps neutralisants: exemple des virus enveloppés

virus enveloppés = glycoprotéines d'attachement ***et*** de fusion membranaire

Feuillets beta
→ Fixation au récepteur

Hélices alpha
→ Fusion membranaire




**RBS = receptor binding site**

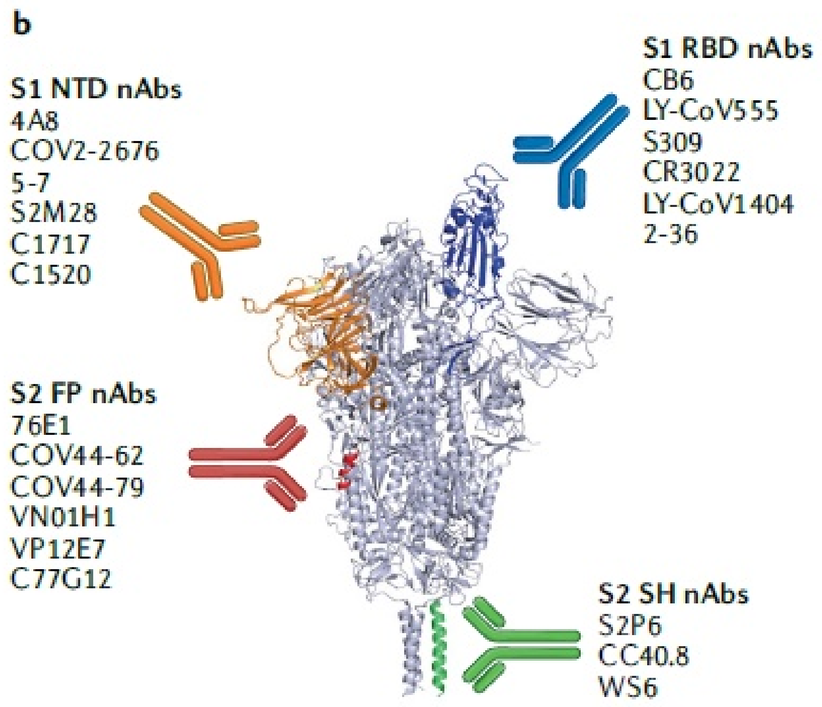
**FP = fusion peptide**

A noter : Parfois deux glycoprotéines distinctes ex. RSV
G – Fixation au récepteur
F - Fusion

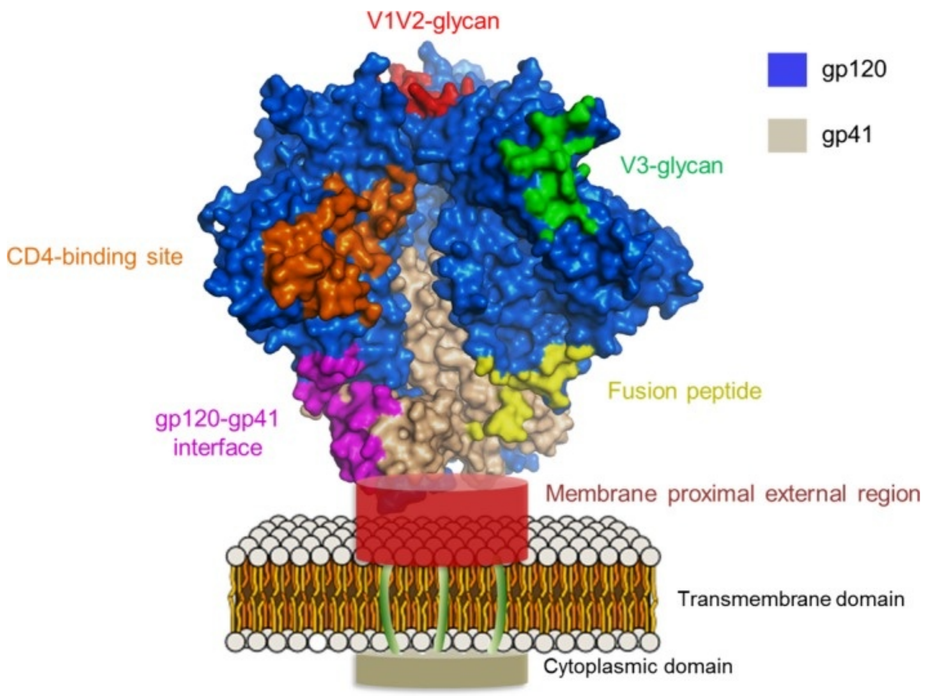
*Murin CD, Nat Microbiol. 2019*

# Les anticorps neutralisants: exemple des virus enveloppés

**SARS-CoV2**



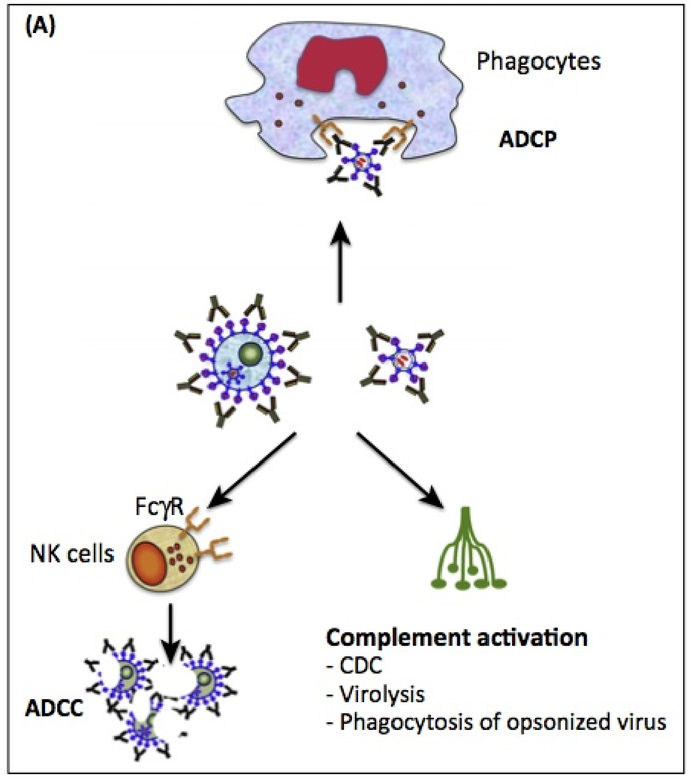

**VIH-1**

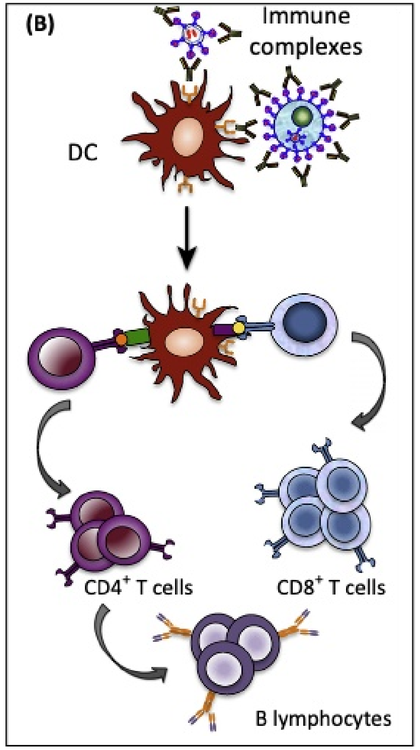



4 cibles sur la glycoprotéine S

Image credits :
Chen et al. Nat. Rev. Immunol. 2022

# Autres mécanismes d'action des anticorps antiviraux




Pelegrin et al, Trends in Microbiology 2015

- mécanismes de protection médiés par fragment Fc

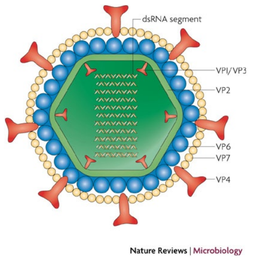
- CDC = complement-dependent cytotoxicity
  → lyse des particules virales
- ADCP = antibody-dependent cellular phagocytosis
- ADCC = antibody-dependent cellular cytotoxicity
- ADCVI = antibody-dependent, cell-mediated virus inhibition

- formation de complexes immuns virus/Ab ou cellule infectée/Ab → reconnaissance par cellules APC type DC → boost de la réponse adaptative (effet «vaccine like»)

# La séroneutralisation

- **Applications**
  - **Typage des virus: sérotypes** viraux définis par AC neutralisants

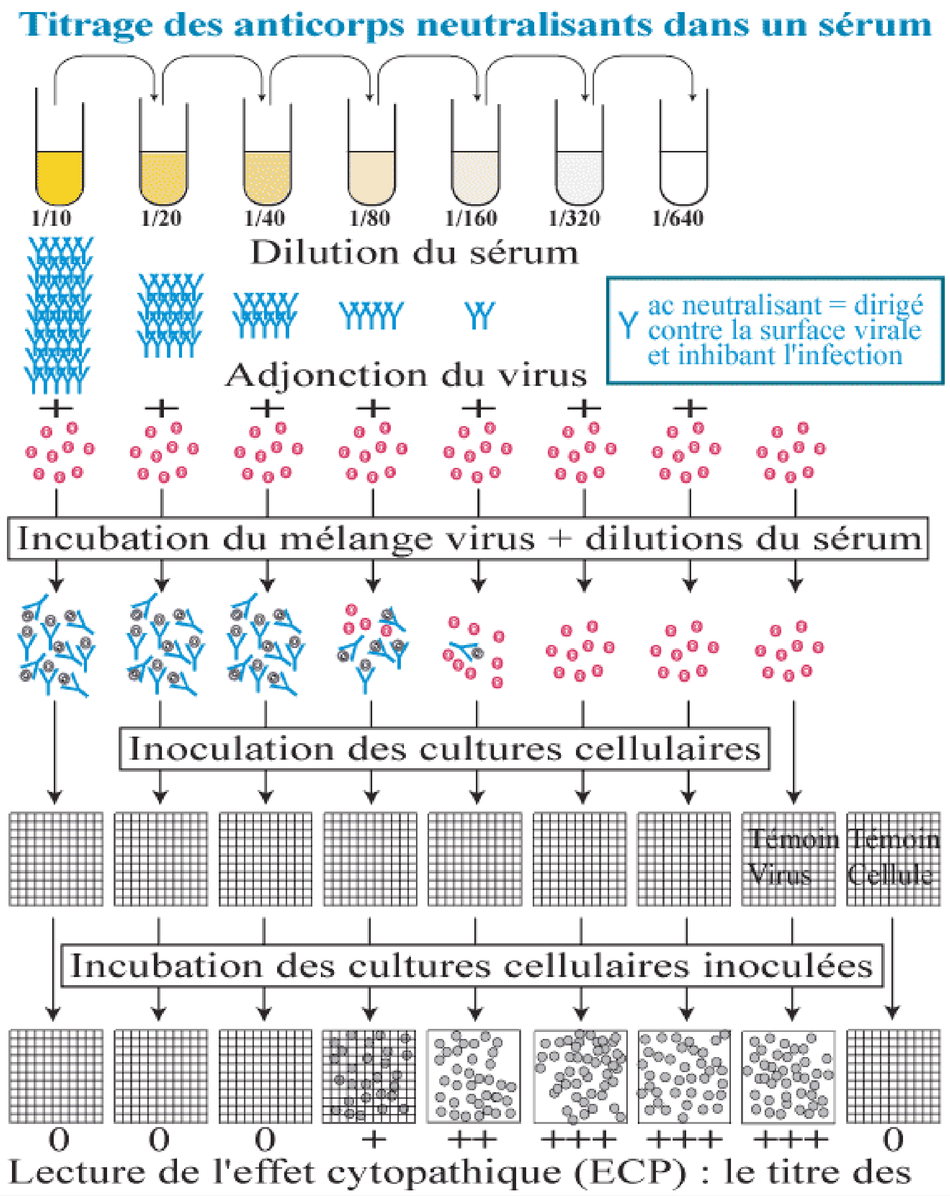
**Typage Rotavirus**: AC neutralisants dirigés contre les protéines de la capside externe = VP4 et VP7




**Typage poliovirus**: AC neutralisants dirigés contre la protéine de capside VP1

Utilisation d'antisérums spécifiques PV1, PV2, PV3

  - **Détermination du titre neutralisant des AC** dans un sérum
    - cultures cellulaires infectées par des sérotypes viraux connus, en présence d'un sérum à tester
    - la présence d'AC dans le sérum inhibe la multiplication virale et l'apparition d'un effet cytopathogène



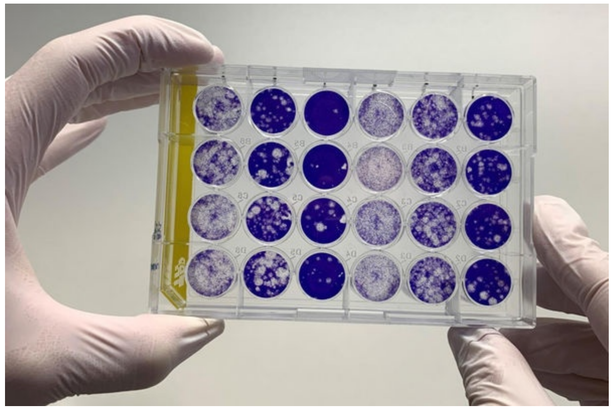
# Les tests de séroneutralisation, à quoi ça sert?

- Titre neutralisant
- Evaluer la protection contre l'infection (permet de définir un seuil de protection)
- Mesurer efficacité d'une vaccination (nécessité de définir un seuil de protection)
- Mesurer capacité neutralisante des anticorps contre différents variants d'un même virus

**FRNT50:**
**50% focus reduction neutralisation titer**

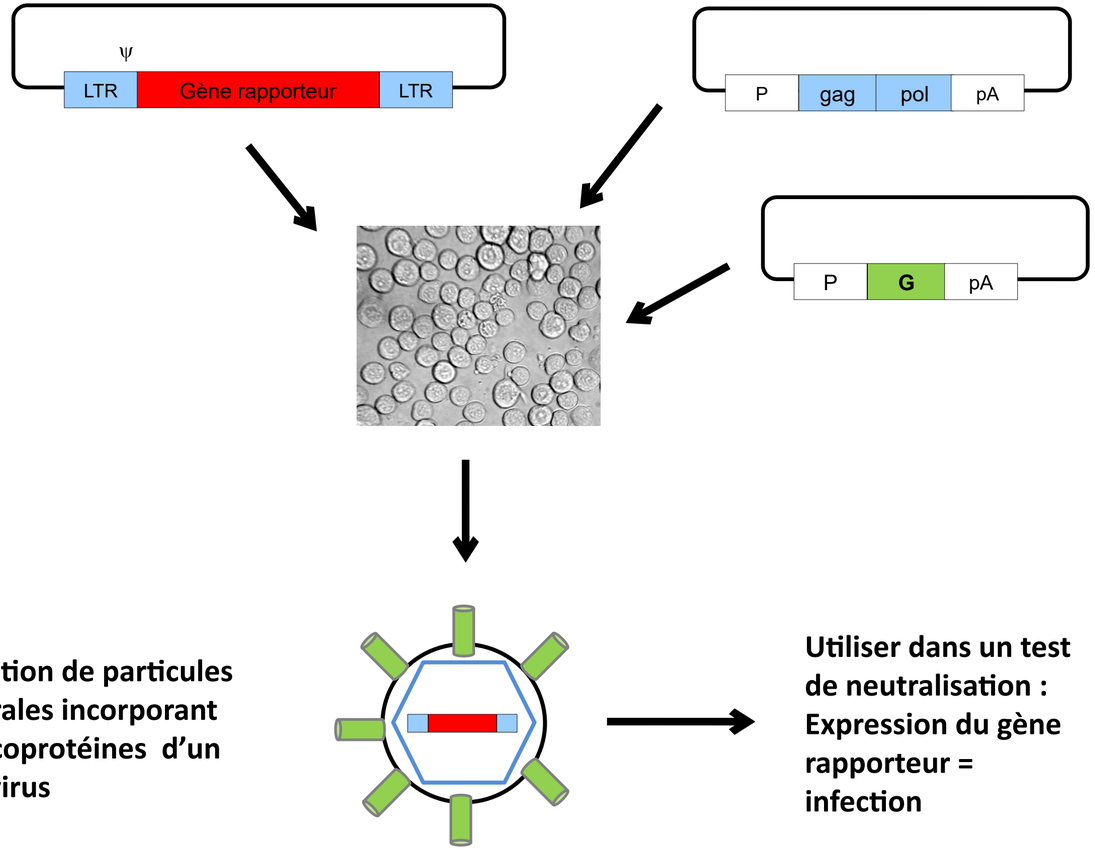
**concentration d'Ac (ou antiviral) nécessaire pour obtenir 50% diminution plage de lyse**

**Utilise un virus viable**



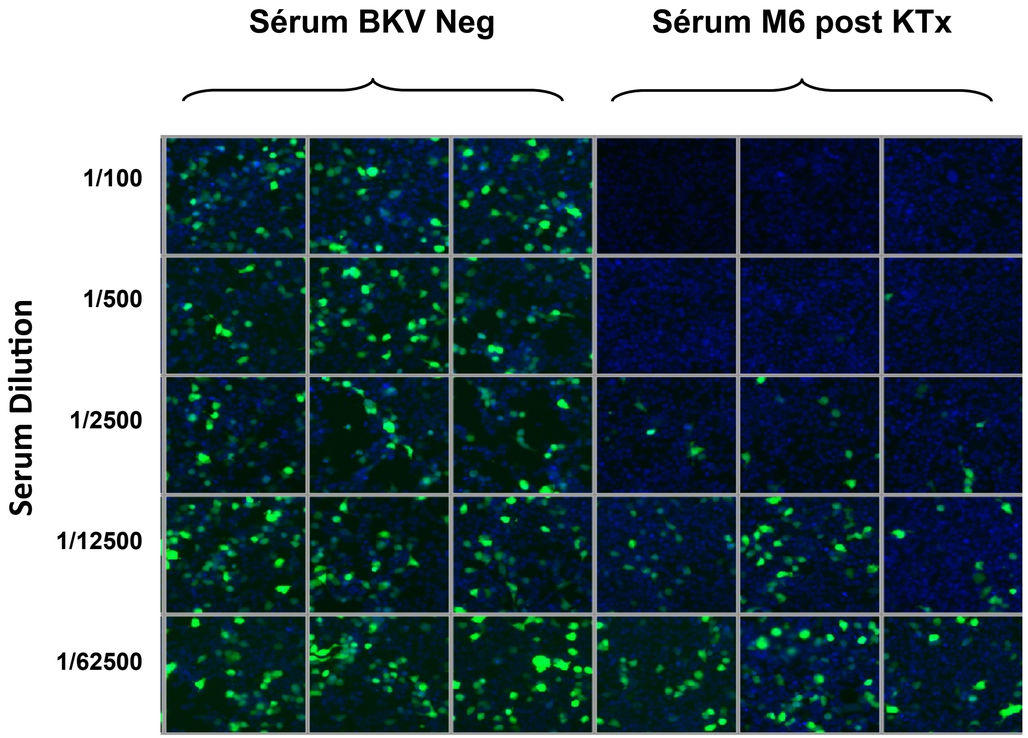
# Tests de neutralisation sans virus viable – les pseudotypes

**Principe de production d'un pseudotype lentivirale**

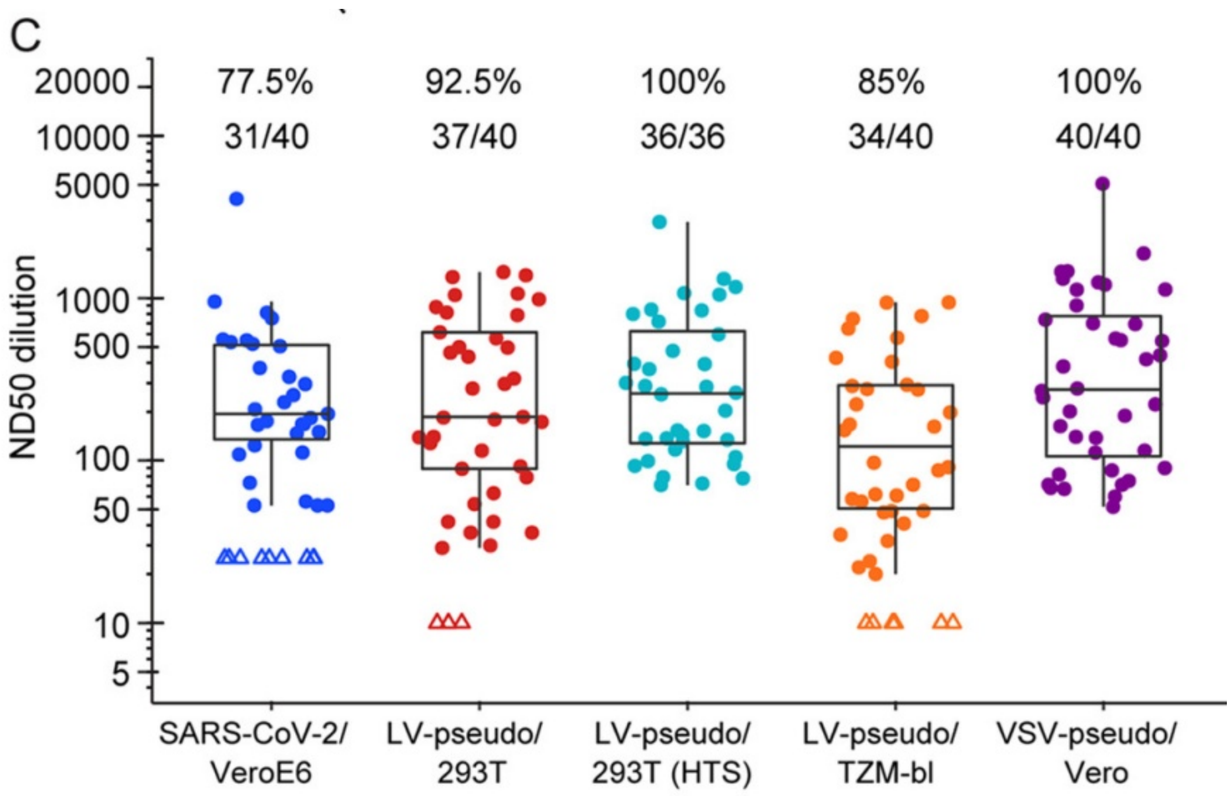



**Production de particules lentivirales incorporant les glycoprotéines d'un autre virus**

**Utiliser dans un test de neutralisation : Expression du gène rapporteur = infection**



# Validation des tests de neutralisation utilisant des pseudotypes




**Titres neutralisant équivalents dans 40 plasmas**

**- pas de différence entre titre obtenu avec virus viable et différents pseudotypes**

Sholukh et al. 2021 PMID : 34288726

# Récepteurs cellulaires et ligands viraux: **cibles thérapeutiques**

**utilisation des AC neutralisants**

immunothérapie active
=
**vaccination**

immunothérapie passive
(Ig humaines)

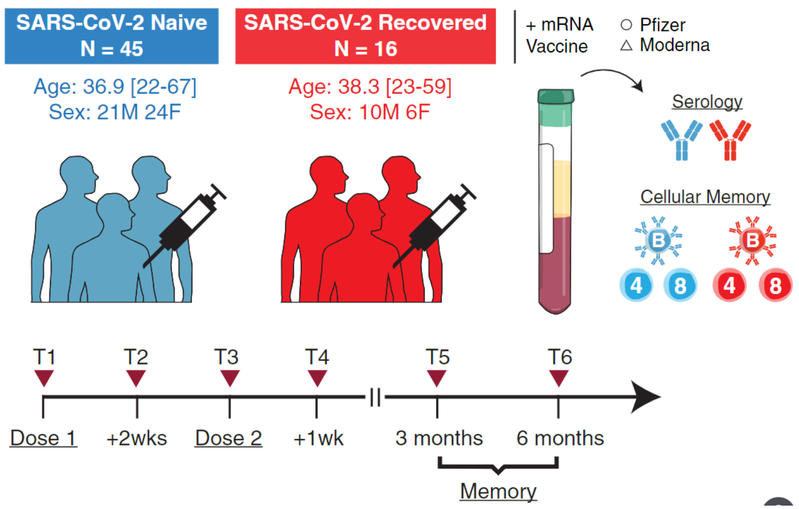
**Sérothérapie**
**AC monoclonaux**

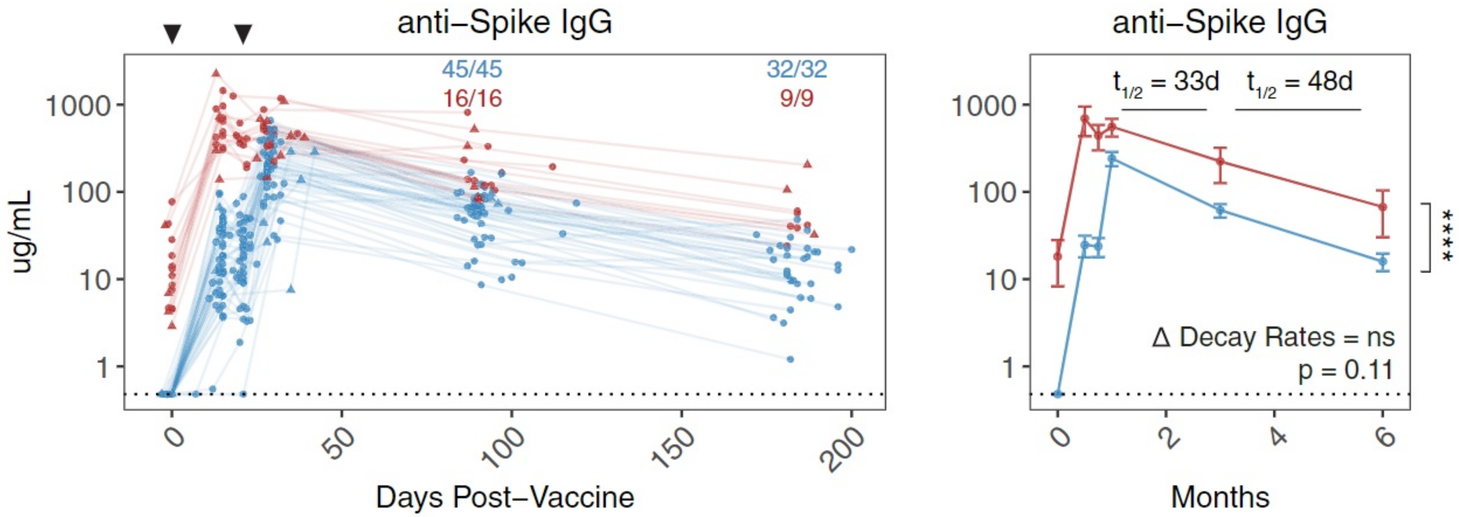
**molécules à activité antivirale**

**Inhibiteurs d'entrée**

# Induction d'anticorps par la vaccination

mRNA vaccines induce durable immune memory to SARS-CoV-2 and variants of concern
Goel et al. Science 2021




Titre anti-spike ↓ par ~1 log10 six mois post vaccination

- explique le besoin de rappels vaccinaux

# Immunothérapie passive: AC neutralisants

- **Immunisation passive**
- protection immédiate
- efficace pour prévenir une infection si utilisé très précocément
- **Immunoglobulines humaines** : neutralisent le virion à l'extérieur de la cellule
- prévention infection par le VHB, le virus de la rage….

**anticorps monoclonaux**

ex: Nirsevimab (Beyfortus®) = AC monoclonal humanisé dirigé contre la protéine F de fusion du VRS (coût +++)

# Anticorps monoclonaux antiviraux

- traitement par mAb = immunothérapie passive
- capacité à neutraliser les virions via la reconnaissance d'antigènes viraux de surface essentiels pour l'attachement ou l'entrée du virus
- la plupart = isotype IgG1 → complément + FcγR

1er mAb antiviral = Palivizumab (RSV)
+/- échecs (rage, HIV-1, Ebola)

SARS-CoV-2 : développement accéléré !
Fab pour améliorer la reconnaissance
Fc pour améliorer la fonctionnalité
↑ la demi-vie

* Approved for use in India
† Emergency use authorization by FDA
** Conditional approval in South Korea

# Stratégies pour l'obtention d'anticorps monoclonaux antiviraux

| Virus | Immunisation de souris, puis « humanisation » | Immunisation de souris humanisée | Phage Display | Culture de Lympho B humains, puis criblage | Tri de lympho B spécifiques |
|---|---|---|---|---|---|
| VRS | Palivizumab<br>Johnson et al. JID 1997 | | | Nirsevimab<br>Kwakkenbos Nat.Med. 2010<br>Zhu et al. Sci. Trans. Med. 2017 | |
| Influenza | C179<br>Okuno et al. J. Virol 1993 | | CR6261<br>Ekiert et al. Science 2009 | FI6<br>Corti et al. Science 2011 | |
| VIH-1 | | | | PG9, PG16<br>Walker et al. Science 2009 | VRC01<br>Wu et al. Science 2010 |
| Virus Ebola Zaire | zMAPP cocktail (3 mAb)<br>Qiu et al. Nature 2014 | REGN-EB3<br>Pascal et al. JID 2018 | | MAb114 (Ansuvimab)<br>Corti et al. Science 2016 | |
| SARS-CoV2 | | Casirivimab, Imdevimab<br>Hansen et al. Science 2020 | | Bamlanivimab<br>Jones et al. Sci Trans Med 2021 | Cilgavimab, Tixagevimab<br>Zost et al. Nature 2020 |
| Polyomavirus BK | | | | 41F17<br>Lindner et al. Immunity 2019 | mAb120<br>Nguyen et al.LSA 2023 |

# Criblage versus tri de lymphocytes B humains

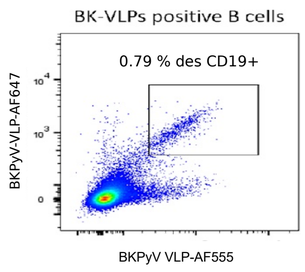
## Lindner et al. Immunity 2019

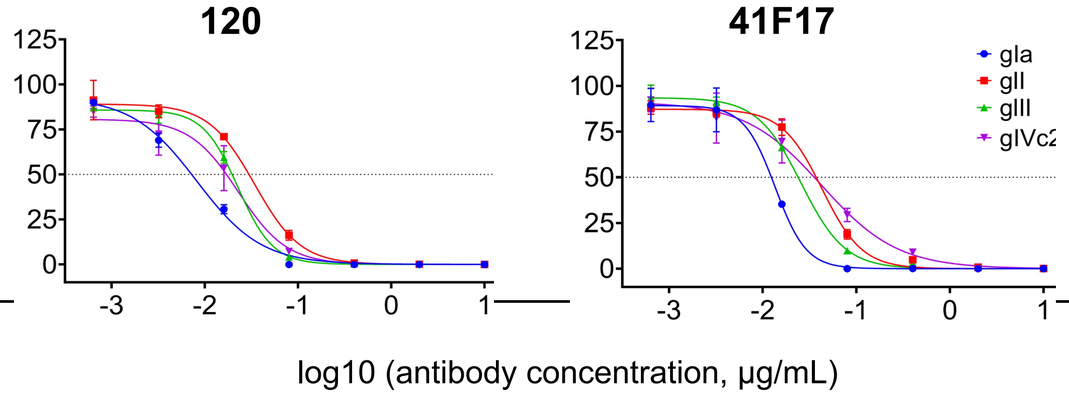
PBMC 3 donneurs sains
↓
1,6x10$^5$ Lympho B triés
Culture à 1-4 cellules/puits 10-12j
↓
Cribler surnageant par ELISA
~300 clones spécifiques
↓
Séquencer BCR
230 séquences mAb
↓
99 mAb caractérisés

| Clone | ELISA binding BKV-ST1 | ELISA binding BKV-ST4 | Recombinant IgG1 viral neutralization $EC_{50}$ (nM) BKV ST1 | ST2 | ST3 | ST4 | JCV |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 27O24 | ● | ● | 0.4 | 3.5 | 3.3 | 0.3 | 0.4 |
| 41F17 | ● | ● | 0.3 | 0.5 | 2.8 | 0.1 | 0.05 |
| 35F17 | ● | | 0.03 | | | | |

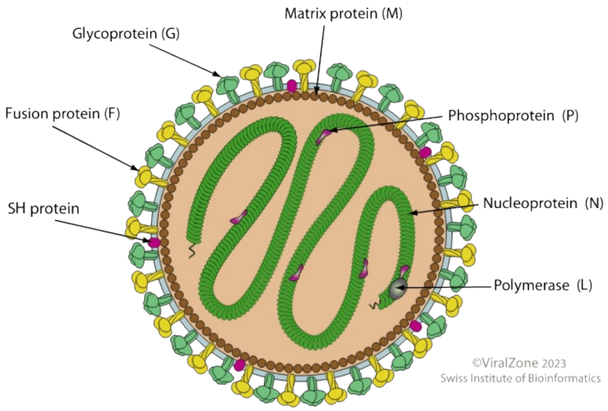
## Nguyen et al.LSA 2023

PBMC 6 receveurs KTx avec réplication BK
↓
~ 10$^4$ Lympho B spécifiques triés
↓
Séquençage 10x Genomics
~ 2000 séquences mAb
↓
Sélection de candidats



# VRS / Palivizumab – 1er mAb antiviral prophylactique




Virus Respiratoire Syncytial (VRS)
→ *Orthopneumovirus ; Pneumoviridae*

ARN brin (-)
Attachement : G
Fusion : F

Principale cause de bronchiolite + hospitalisations chez les enfants
2ème cause de mortalité infantile (post-néonatale)

Risque majeure chez les enfants prématurés ou avec dysplasie broncho-pulmonaire

Années 1990
Essais cliniques
RSV-IVIG

1997
Génération du
Palivizumab

A partir des années 2000
Recherche d'un Ac mieux que Palivizumab

1996
Autorisation FDA
RSV-IVIG

1999
AMM France
Palivizumab
- enfants avec
facteurs de risque

PREVENT study group 1997

510 enfants randomisés RSV-IVIG vs placébo

↓41 % du taux d'hospitalisation pour VRS
(13,5 % placébo ; 8 % RSV-IVIG)

Efficacité avéré des Ac polyclonaux chez les enfants prématurés

→ dose 750 mg/kg pas facile à administrer chez nouveaux-nés

IMPACT-RSV Study Group 1998

1502 enfants randomisés
Palivizumab vs placébo
15 mg/kg 5x
(tous les 30j pendant 150j)

↓55 % du taux d'hospitalisation pour VRS
(10,6 % placébo ; 4,8 % RSV-IVIG)

# VRS / cibles moléculaires des mAb

**Protéine G :**

Fixation sur récepteurs (Heparan Sulfate ; CX3CR1)

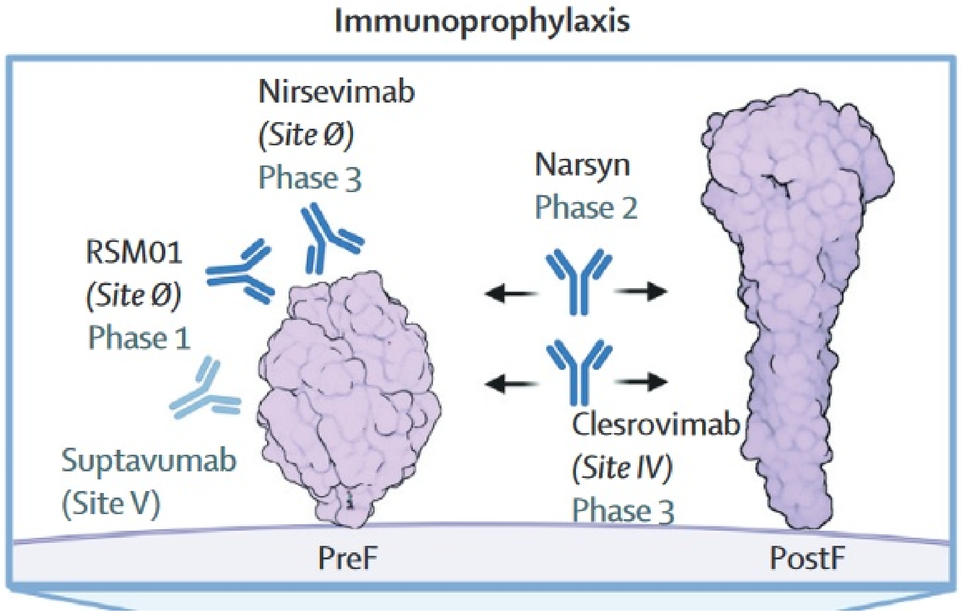
Fortement glycosylée

Forte variabilité
→ pas une bonne cible pour immunoprophylaxie

**Protéine F :**

Fusion membranaire après attachement
**Conformations pre- et post-fusion**

Séquence conservée
→cible des mAb et des vaccins



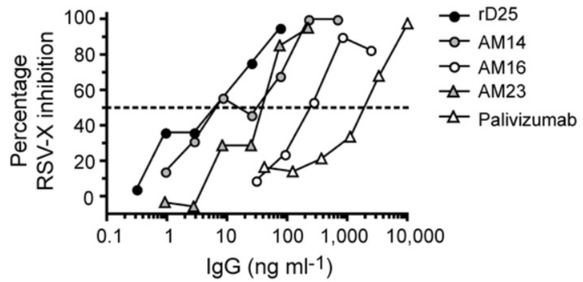

Mazur et al. 2023 PMID :35952703

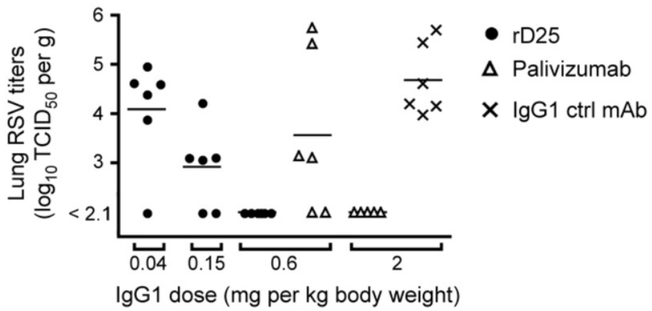
*Site Φ* – épitope reconnu par Palivizumab

# VRS / développement et utilisation de Nirsevimab

**1. Identification du mAb D25**
Kwakkenbos Nat.Med. 2010

Cultures de pools de 100 Lympho B mémoires d'un donneur sain adulte (~4x10$^4$ LB criblés)



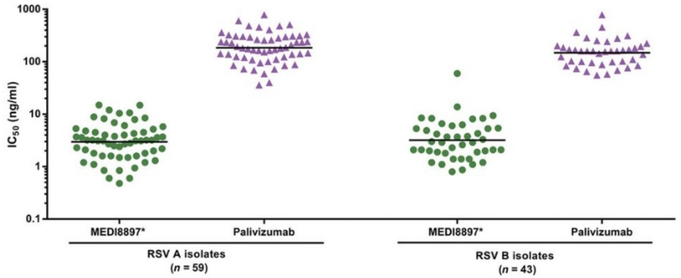




Effet protecteur in vivo : modèle "Cotton rat"

Antibodies were administered i.m. one day before intranasal challenge with RSV X (106 TCID50/animal).
Lung virus titers determined 5 days post challenge.

**2. Amélioration du mAb D25**
Zhu et al. Sci. Trans. Med. 2017

Cribler 1500 variantes du mAb D25
→ Optimiser affinité + activité antivirale
"MEDI8897*"



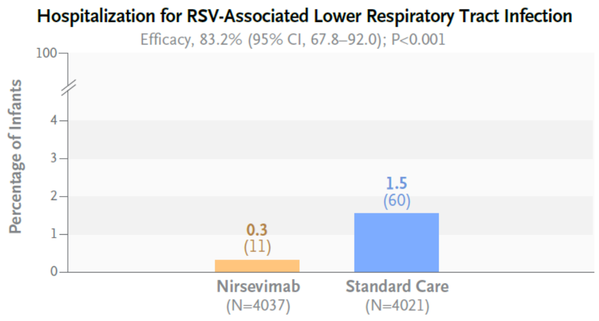

→ Ajouter mutations YTE (M252Y/S254T/T256E) au domaine Fc
↑ demi-vie sérique 2 à 4 fois par rapport l'anticorps d'origine

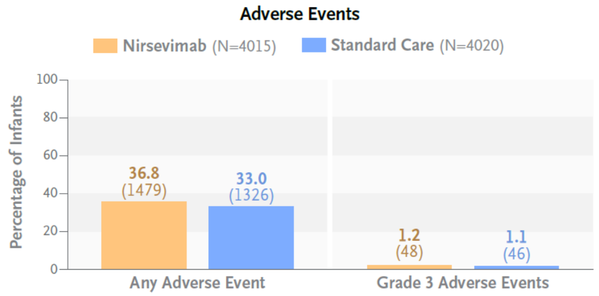
"MEDI8897" = Nirsevimab
**Permettrait 1 seule dose**

**3. Essais cliniques (Phase III HARMONIE trial)**
Drysdale et al. NEJM 2023 PMID :38157500

Enfants <12 mois avant première saison VRS (08/08/22 – 28/02/23)
Allemagne/France/Royaume-Uni
Pas éligible ttt Palivizumab

1 seule dose (50 mg ou 100 mg)



# VRS / situation actuelle

**VRS en France**

- touche environ 30 % des nourrissons tous les ans
- 480 000 cas / an !

**Saison 2022-23, France hexagonale**

- 73 000 passages aux urgences
- 26 000 hospitalisations

**Nourrissons concernés**

| | |
|---|---|
| Moins de 5 kg : 1 dose unique de 50 mg | 5 kg et plus : 1 dose de 100 mg |

**Beyfortus® (Nirsevimab)**

Autorisé (et recommandé) pour tous les nouveaux-nés en France dès automne 2023

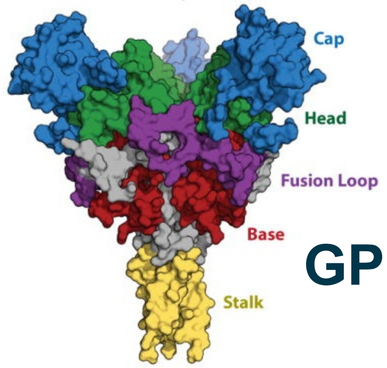
250 000 doses administrés

2024-25 : 600 000 doses disponibles !

Efficacité estimée de 76 à 81 %
(Prévention de bronchiolite à VRS en réanimation)
5800 hospitalisations évitées en 2023-24

Données selon Santé Publique France

# Virus Ebola Zaire (ZEBOV): AcM thérapeutiques




**GP**

- **ZMapp**
- Cocktail de 3 AcM dirigés contre la GP
- 2 Ac neutralisants. Blocage du changement conformationnel de GP nécessaire à la fusion
- 1 non neutralisant. Facilitation ADCC?
- **MAb 114**
- Dérivé de cellule B mémoire d'un survivant
- Activité neutralisante ++. Se lie à une région conservée de la GP, inhibe l'interaction avec le récepteur NPC-1 dans les endosomes tardifs. Se fixe également à sGP
- Activité ADCC également
- **REGN-E3**
- Cocktail de 3 AcM obtenus par immunisation de souris humanisées
- Les 3 AC se lient à des épitopes différents de la GP → diminue le risque d'échappement
- Plusieurs modes d'action associés: neutralisante + ADCC + ADCP /non neutralisante +ADCC+ADCP+ liaison sGP / neutralisante seule

# Ebola Virus _ AcM thérapeutiques

**Essai clnique pendant l'épidémie DRC 2018-19**
Mulangu et al. NEJM 2023 PMID :31774950

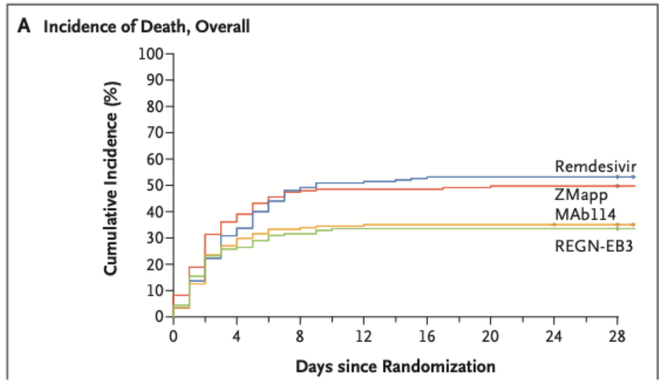
Tout patient avec RT-PCR +ve
Randomisé 1:1:1:1 entre différents thérapeutiques (n=681)
→ pas de groupe placebo !

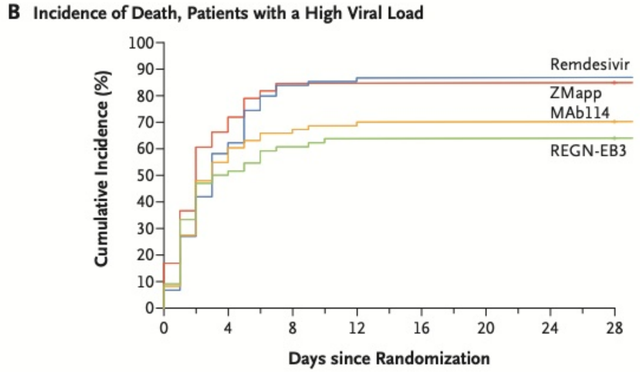
Zmapp : 50 mg/kg 3 doses
MAb114 : 50 mg/kg 1 dose
REGN-EB3 :150 mg/kg 1 dose

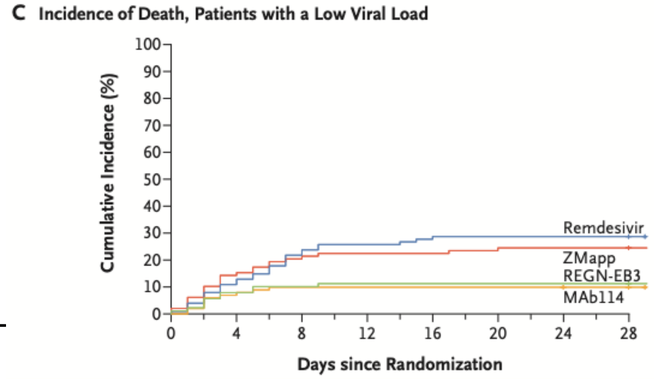
End-point : mortalité à 28j

- Efficacité partielle, plus efficace si administré tôt, charge virale faible

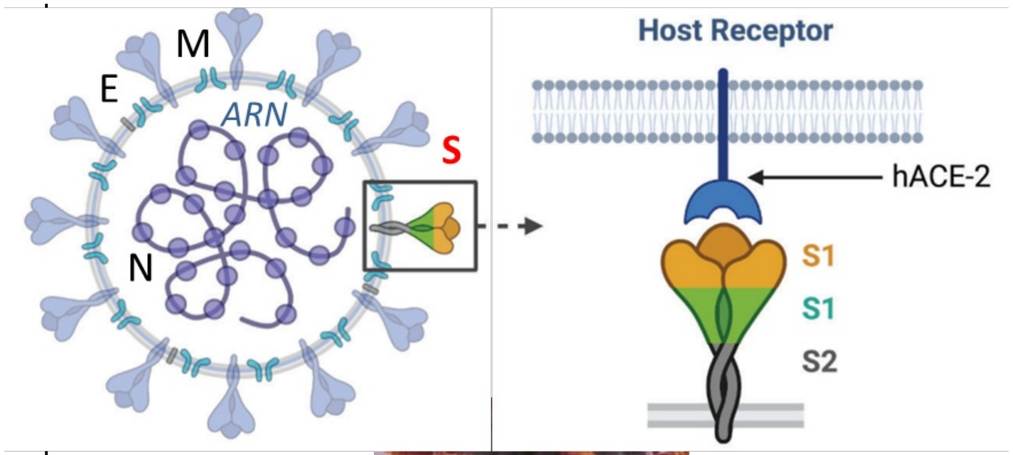
REGN-EB3, MAb114 > ZMApp

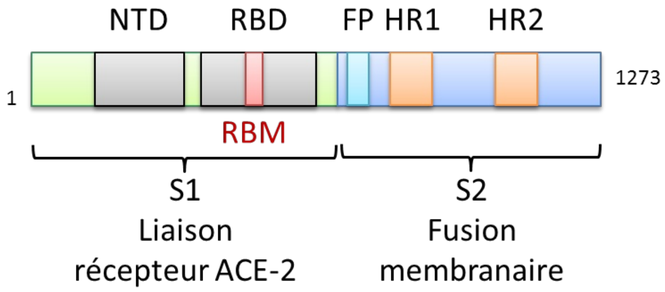


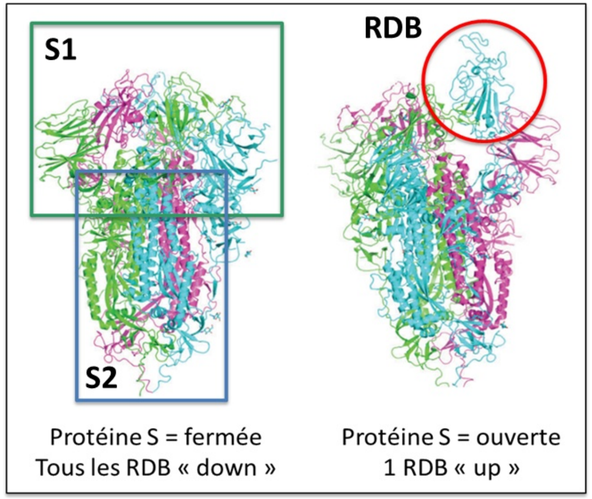



# La cible virale des Ac anti-SARS CoV-2 = protéine S

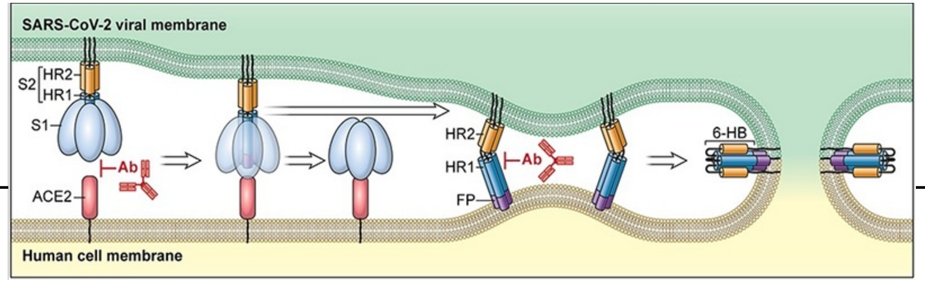




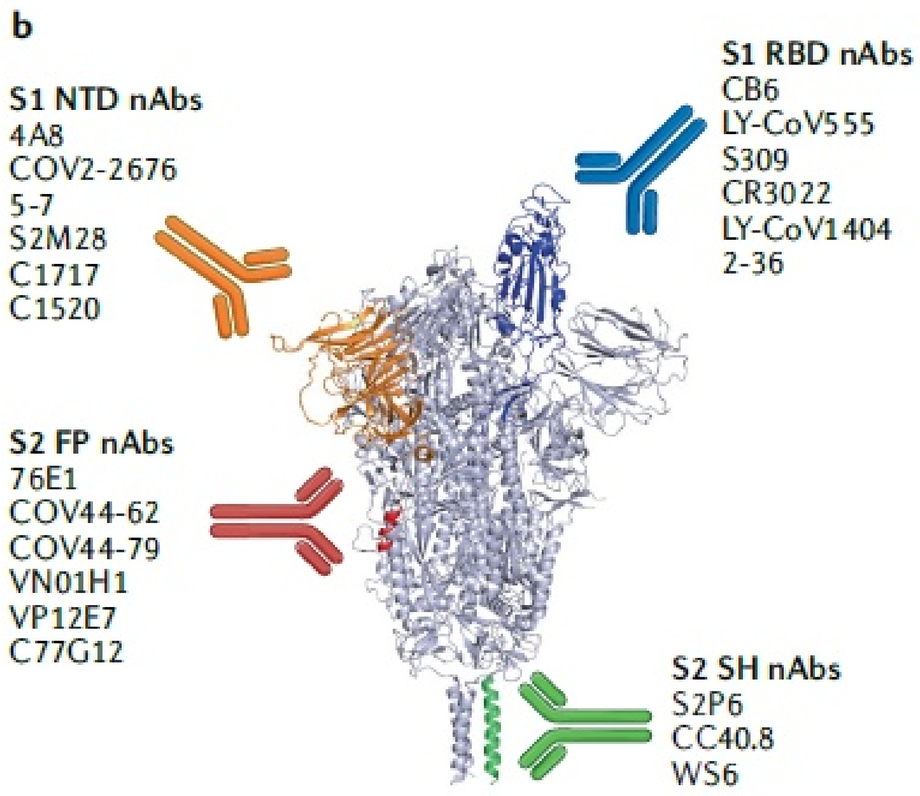

**Protéine glycolysée**
**NTD** = *N terminal domain* *(amino-acides 13-303)*
**RBD** = *receptor-binding domain* *(aa 319-541)*
**RBM** = *receptor-binding motif* *(aa 437-508)*
**HR** = *hepta-repeats* *(aa 920-970 et 1163-1208)*
**FP** = peptide de fusion




Conformation « up » du RBD nécessaire pour liaison à ACE-2



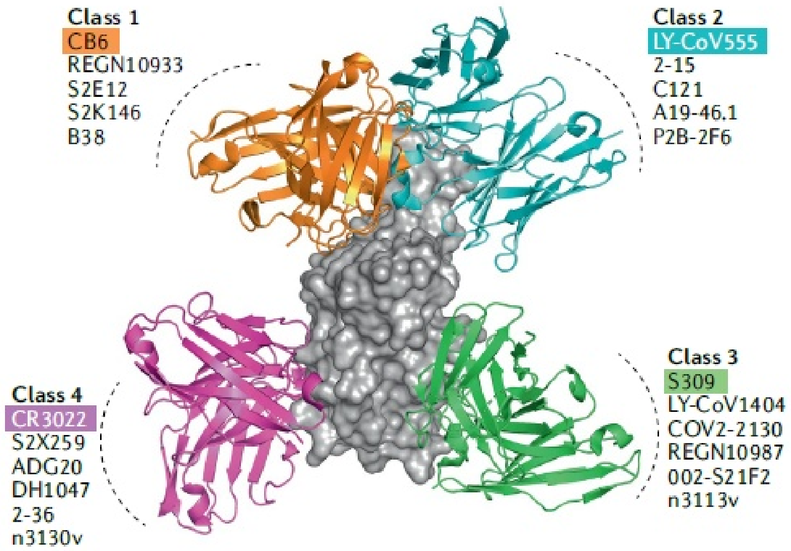
# Epitopes neutralisants sur la glycoprotéine S




Quatre zones cibles sur la Spike

Image credits :
Chen et al. Nat. Rev. Immunol. 2022

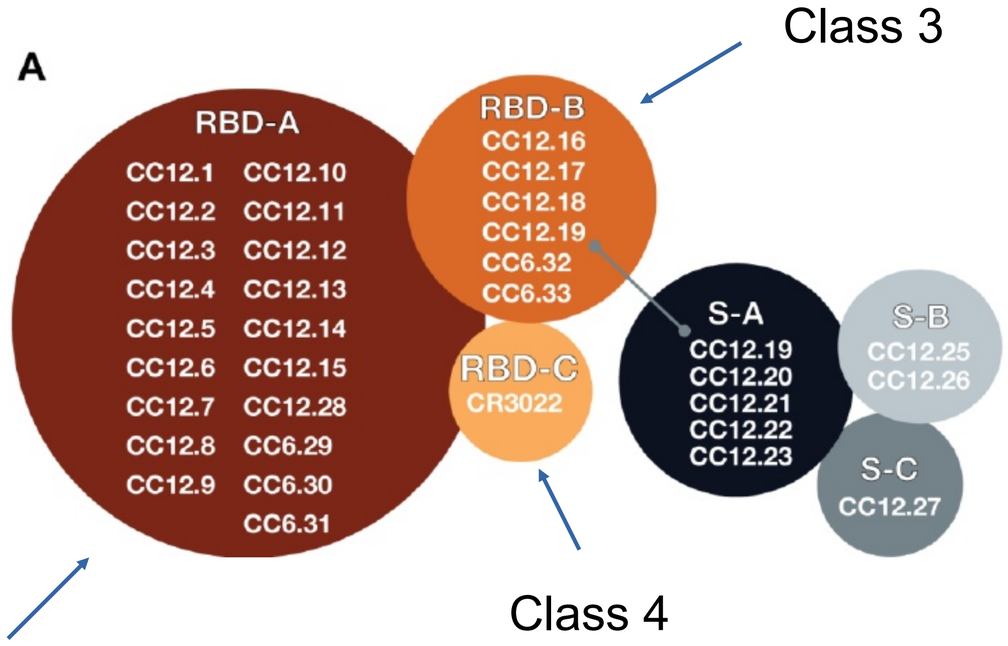
4 classes of RBD NAbs defined by Cryo-EM study of spike-Ab complexes (Barnes et al. Nature 2020)
Pam Bjorkman lab, CalTech



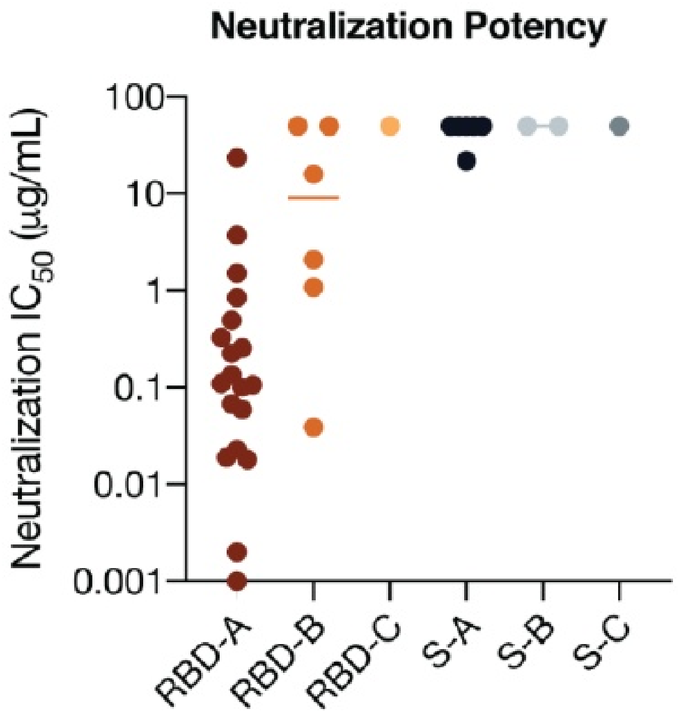

| Class | Overlaps ACE2 binding site ? | Conformation RBD |
|---|---|---|
| 1 | Yes | Up |
| 2 | Yes | Up / Down |
| 3 | No | Up / Down |
| 4 | No | Up |

# Pouvoir neutralisant des mAb visant différentes régions de la Spike

Tri de lympho B par des trimer de Spike trimers – tester neutralisation
Rogers et al. Science (Burton lab, Scripps, La Jolla)




Compete with ACE2 :
Class 1 and 2 NAb



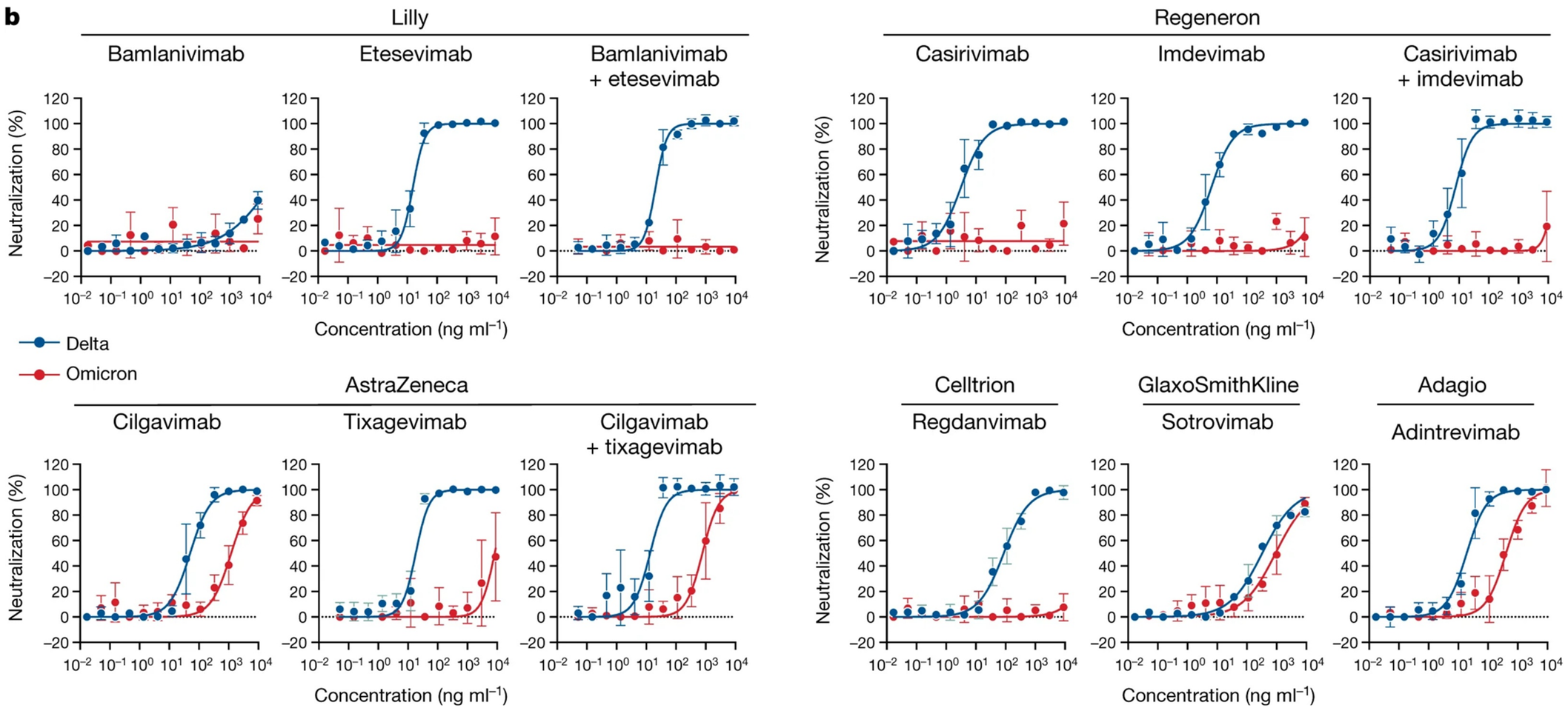

**NAb RBD de classe 1 et 2 sont les plus puissants**

# MAb anti-SARS-CoV-2 autorisés en Sept. 2021

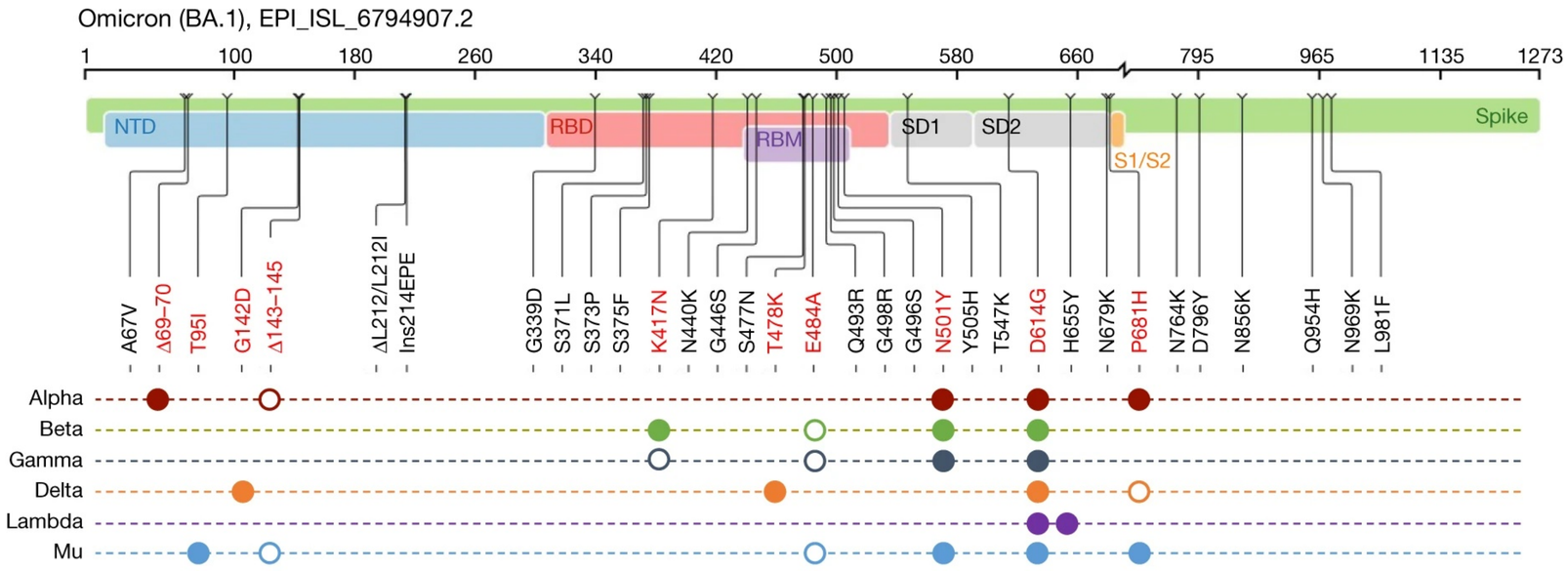
| Commercial name | Antibody | Class | Company | Efficacité pré-Omicron |
|---|---|---|---|---|
| Casirivimab | REGN10933 | RBD 1 | Regeneron | ↓ mortalité de 55 % chez les patients séronégatifs hospitalisés (RECOVERY) PMID : 35895508 |
| Imdevimab | REGN10987 | RBD 3 | Regeneron | |
| Cilgavimab | COV2-2130 | RBD 3 | AstraZeneca | ↓ 50 % Covid sévère ou décès chez patients ambulatoires (TACKLE) PMID : 35688164 |
| Tixagevimab | COV2-2196 | RBD 1 | AstraZeneca | |
| Bamlanivimab | Ly-CoV555 | RBD 2 | Eli Lilly | ↓ 70 % Covid sévère ou décès chez patients ambulatoires avec facteurs de risque. (BLAZE-1) PMID : 34260849 |
| Etesevimab | Ly-CoV016 | RBD 1 | Eli Lilly | |
| Sotrovimab | S309 | RBD 3 | GSK / Vir Biotech | ↓ 80 % Covid sévère ou décès chez patients ambulatoires avec facteurs de risque. (COMET-ICE) PMID : 35285853 |
| Regdanvimab | CT-P59 | RBD 1 | Celltrion | |

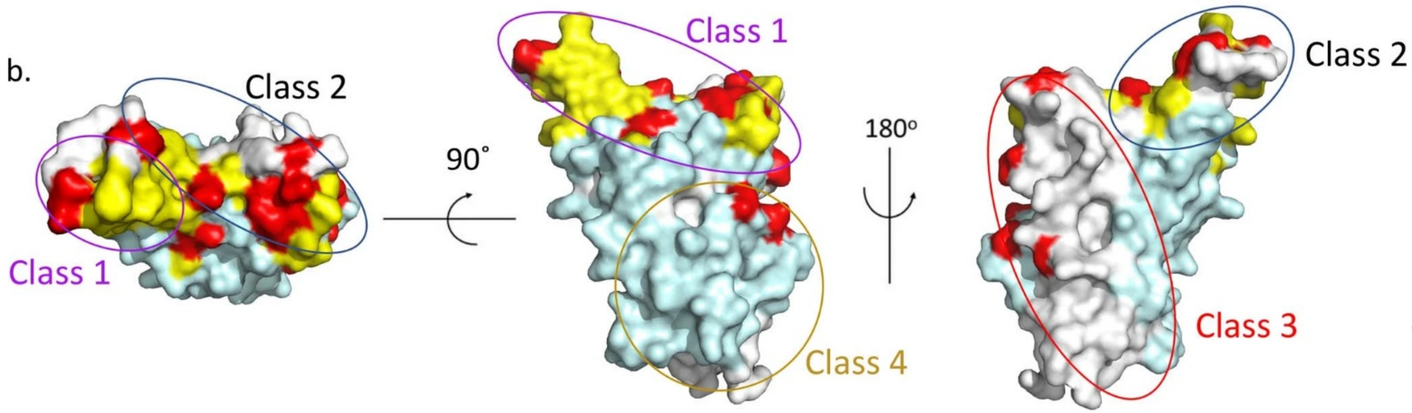
Data in : Kumar et al. PloS Pathogens 2021

# Variant Omicron du SARS CoV-2 : échappement aux anticorps monoclonaux



# Variant Omicron du SARS CoV-2 : pourquoi il échappe à la réponse AC?




Data from
[Planas et al. Nature 2022](#)
PMID: 35016199

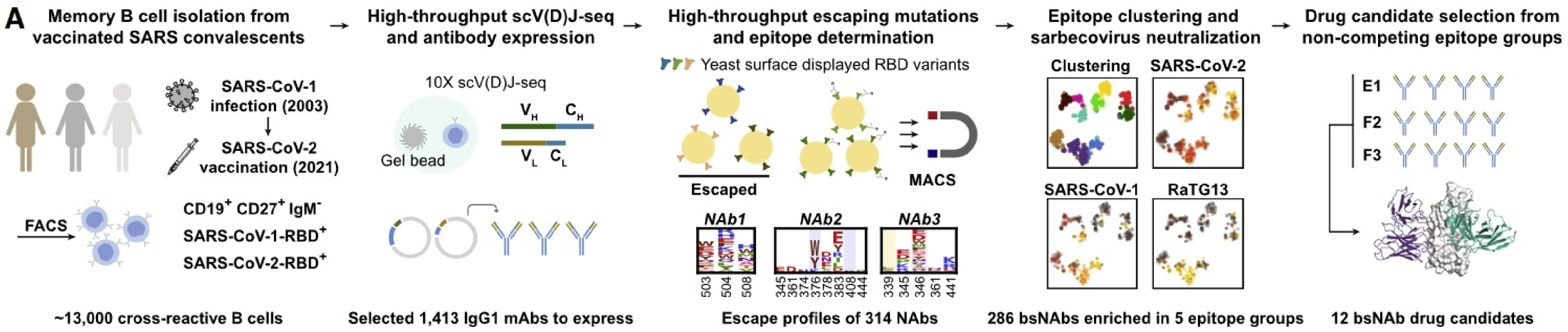
- ACE2 Binding site
- Mutated in Omicron

Nantes Université

# Quelle est la particularité de Sotrovimab ?

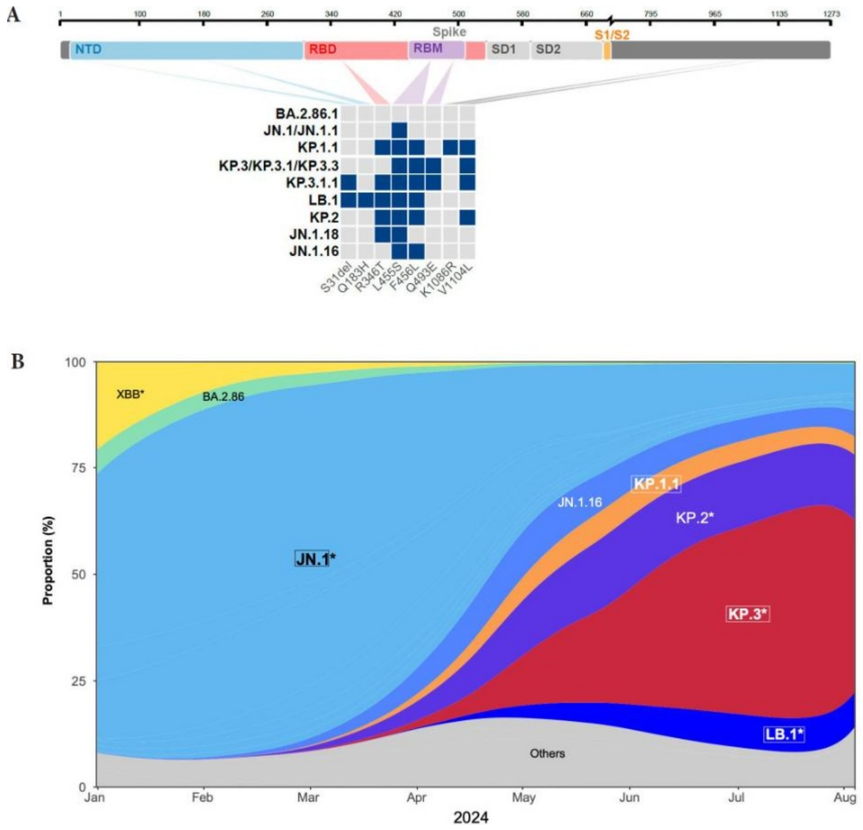
S309 (Sotrovimab) isolé à partir de lympho B mémoires d'un patient infecté par le SARS-CoV-1 en 2003 (Pinto et al Nature 2020) : réactivité croisée avec SARS-CoV-2

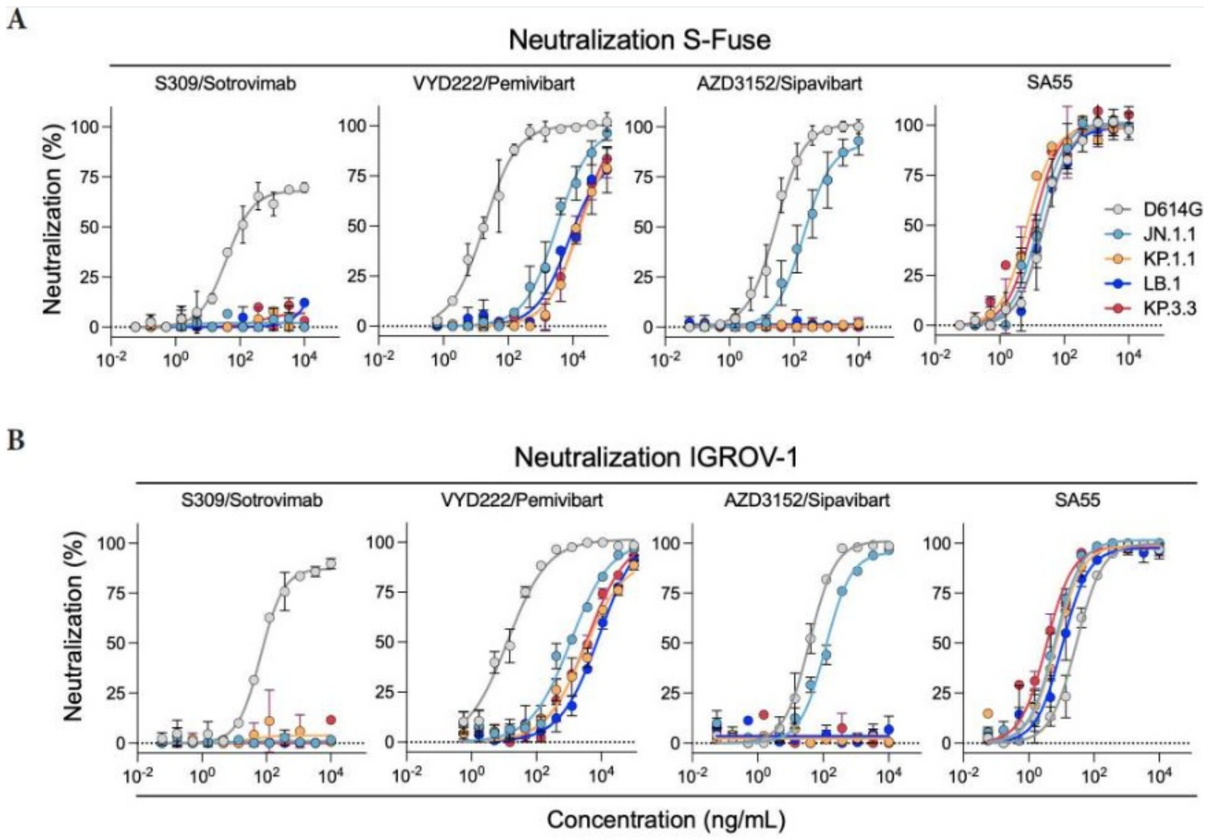
SA55 isolé à partir de lympho B mémoires d'un patient infecté par le SARS-CoV-1 en 2003, puis vacciné contre le SARS-CoV-2 (Cao et al. Cell Reports 2022)




E7 isolé à partir de lympho B mémoires d'un patient SARS-CoV-1 en 2003, vacciné contre le SARS-CoV-2 (Chia et al. Science Advances 2023 - équipe différente avec la même idée !)

# Anticorps neutralisant SARS-CoV2 post-Omicron




D'après [Planas et al. Pathog. Immun. 2024]
PMID: 39391808

SA55 garde son activité!
….. pour l'instant

# Points importants

- les anticorps dirigés contre les protéines virales de surface peuvent inhiber l'entrée du virus dans les cellules cibles
- production **d'anticorps neutralisants protecteurs** au cours de l'infection
- **échappement** possible des virus à l'action des Ac par variabilité génétique
- utilisation pour le **diagnostic sérologique**
- induction d'une protection par **vaccination**
- **protection passive par injection d'Ig** d'origine humaine
- production d'**Ac monoclonaux**