

Lymphomagenèse et virus



Lymphomes et outils viraux

O.Epaulard

Maladies Infectieuses, Grenoble

Plan

- Critères pour une association
- Ontogénèse B et lymphomagénèse
- EBV
 - lymphomes de l'immunodéprimé
 - lymphomes de l'immunocompétent
- HHV8
- Autres virus

Remarques préliminaires

- Lymphomagenèse et virus :
question dominée par 2 couples
EBV / LM de l'immunodéprimé
EBV / lymphome de Burkitt
- Les immunologistes peuvent-ils sortir de la salle ?

Merci

- Les virologues aussi
- Et les hémato, tiens

Critères pour une association

“Rules of evidence required to convict a human cancer virus”

JA Blaho & SA Aaronson, PNAS 1999

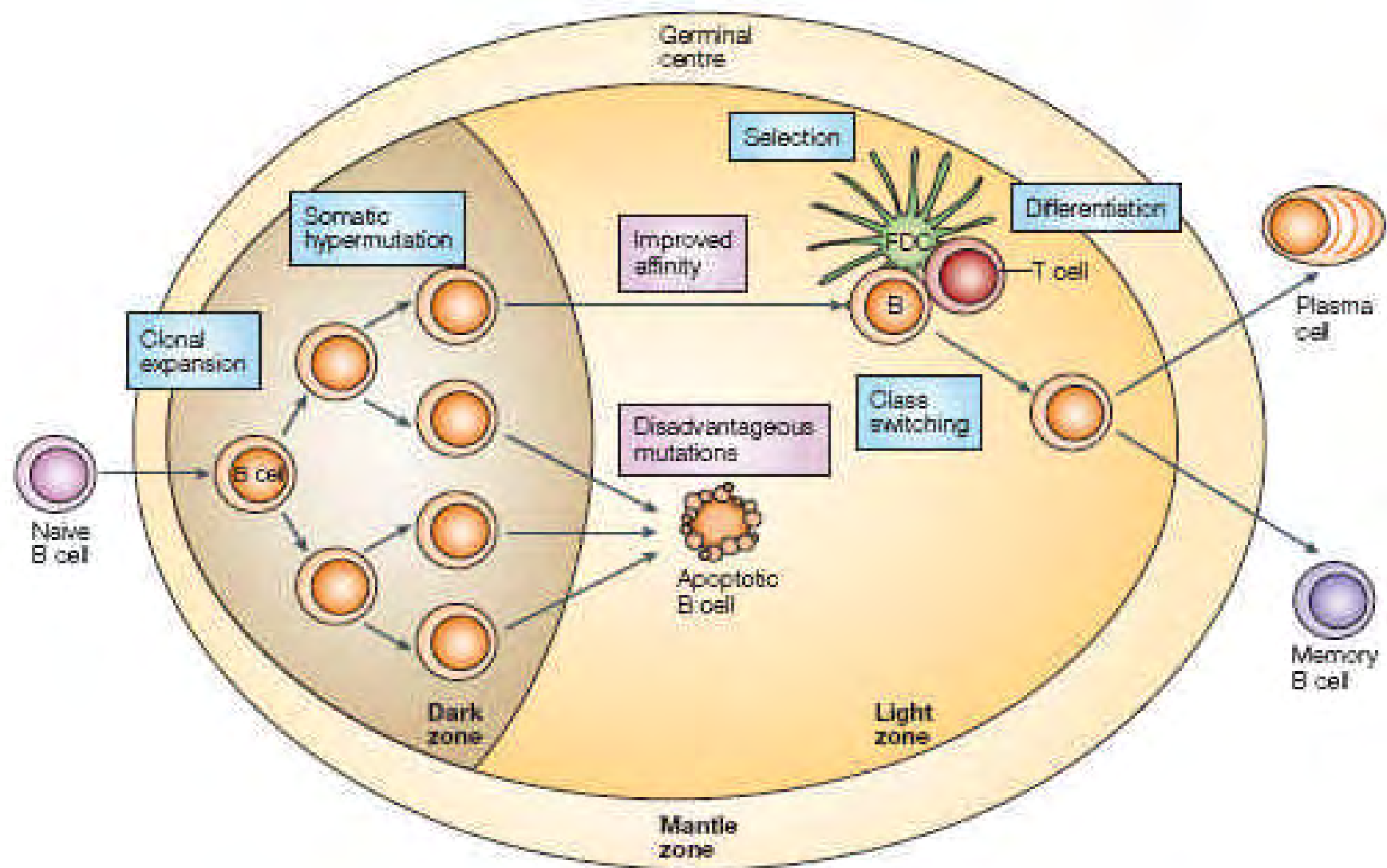
- Forte liaison épidémiologique
 - plus simple avec les virus rares ...
 - EBV / Hodgkin ; HTLV / leucémie T ; HBV / CHC ; HPV / CC
- Evolutions parallèles infection / néoplasie
- Détection de matériel viral dans le tissu tumoral
 - EBV / Burkitt ; HHV8 / Kaposi ; HPV / CC
 - travaux récents : énorme corpus d’associations ; pertinence ?
- Physiopathologie crédible : émergence de 2 groupes :
 - action claire de produits microbiens sur l’apparition de clones malins
 - hyperstimulation Ag-spécifique ou non

Lymphomes et virus : modèles

- Infection de cellules *in vitro*
 - lymphocytes B et EBV
 - cellules épithéliales et HPV
- Infection chez l'animal
 - modèles rares : spécificité humaine
- Expression de protéines virales *in vitro* et en modèle animal
 - LMP1 de l'EBV
 - TAT du HIV

Ontogénèse B

- Cellule “programmatically” à risque :
 - réarrangements de son capital génomique
 - périodes de prolifération intense
 - survie de longue durée
- Étapes :
 - moelle osseuse :
 - proB : réarrangement des gènes de la chaîne lourde d’Ig
 - préB : réarrangement des gènes de la chaîne légère
 - B immature : apoptose ou nouvelle modification des gènes si auto-réactivité
 - hors de la moelle osseuse :
 - après la rencontre avec l’antigène :
 - expansion clonale
 - commutation isotypique : nouveau réarrangement génétique
 - mutation somatique : mutations spontanées et sélection des clones affins
 - si différenciation vers B mémoire : survie prolongée

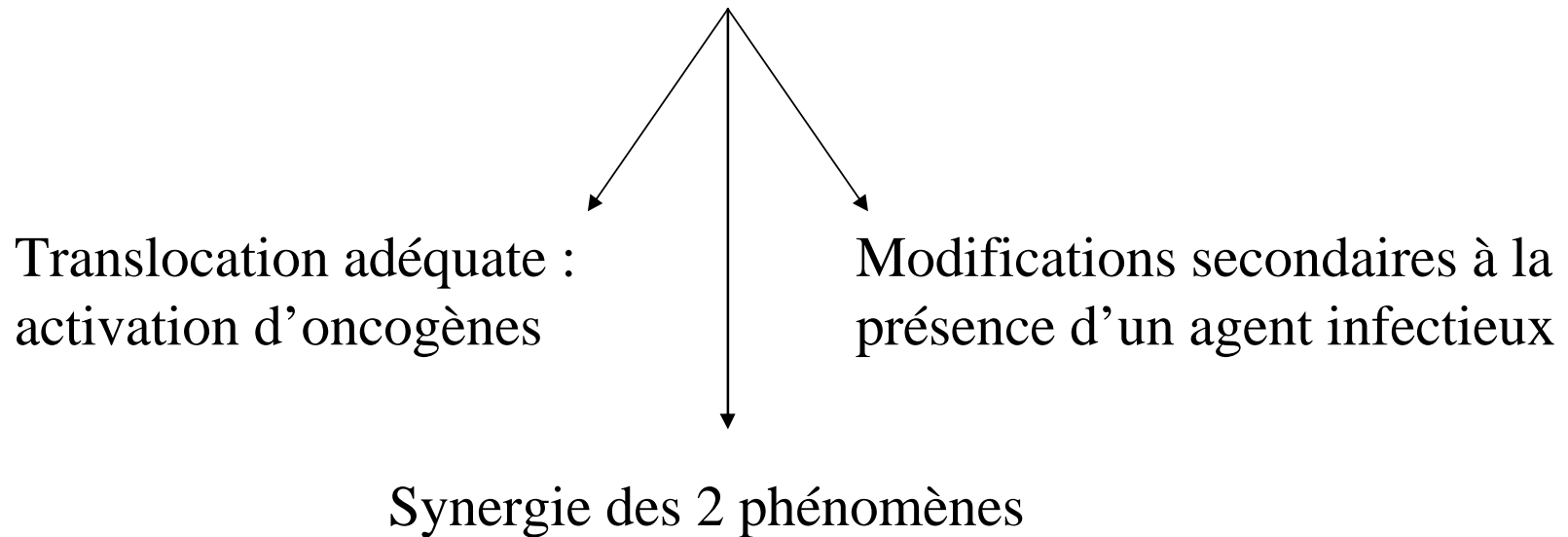


Translocations et lymphomes

- $t(8;14)$, $(8;22)$, $(2;8)$:
 - place MYC (prolifération, anti-apoptose) sous le contrôle des promoteurs des gènes des Ig
→ surexpression
 - L. de Burkitt (100%) ; L. B à grandes cellules
- $t(14;18)$:
 - surexpression de BCL-2 (anti-apoptose)
 - L. folliculaire, LBGC
- $t(11;14)$:
 - surexpression de Cycline-D1 (cycle de division cellulaire)
 - L. du manteau
- $t(3;14)$:
 - surexpression de BCL-6 (anti-apoptose)
 - LBGC
- $t(9;14)$:
 - surexpression de PAX-5
 - L. lymphoplasmocytaire

Comment obtenir un lymphome ?

Proliférer sans régulation
Ne pas rentrer en apoptose
Echapper à l'immunovigilance



EBV

- Isolé de culture de cellules de L. de Burkitt (1964)
- ?-herpes virus humain (réservoir)
- 80-90 % de la population adulte est séropositive
- Persistance du virus la vie durant

EBV et lymphome : les indices d'une association

- Transfusion = facteur de risque pour LMNH ?
- MNI = facteur de risque pour maladie de Hodgkin
- Modification des taux d'anticorps lors de MH
- Expression de protéines virales par les cellules tumorales
- Isolement du virus de culture de L. de Burkitt
- Bases rationnelles d'une physiopathologie

Terasawa 2003

Patiente 47 ans ; lymphome du manteau

RC pendant 8 ans après chimiothérapie

01/1999 : MNI (?)

05/1999 : lymphome B à grandes cellules

biomol : clone LBGC = clone L. manteau (transformation)

EBV retrouvé dans les cellules du LBGC

Dynamique de l'infection à EBV

Infection épithéliale (lytique) et lymphocytaire B (latente)

- Prolifération B polyclonale
- Réponse T anti-EBV
- Persistance de clones B infectés circulants
- Infection continue de nouveaux lymphocytes dans l'oropharynx

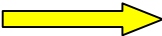
Infectabilité des cellules épithéliales ?

- infection possible in vitro ; mais
- Bruton : pas d'infection EBV
- pas de mise en évidence in vivo (sauf leucoplasie chevelue)

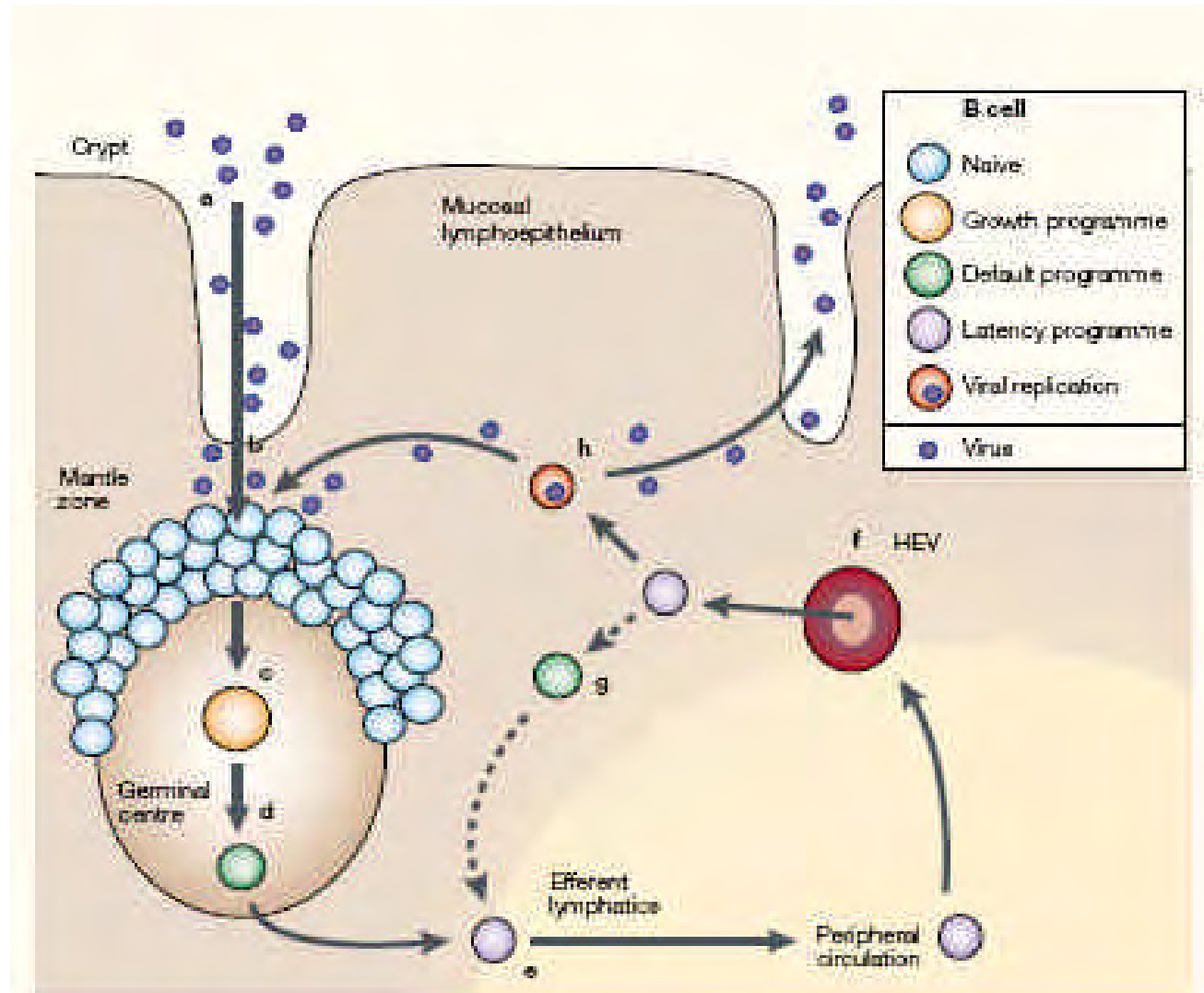
... modèle à expliciter

EBV et infection lymphocytaire

- Adhésion : interaction gp350 - CD21(R_{C3d})
- Pénétration : gp25/85/42 - CMH_{II}
- Expression de protéines virales de latence
 - persistance du génome viral
 - modification de l'expression de gènes cellulaires
→ lymphoprolifération B polyclonale
- Limitation de cette expression
 - pression T anti-EBV
 - programme viral intrinsèque

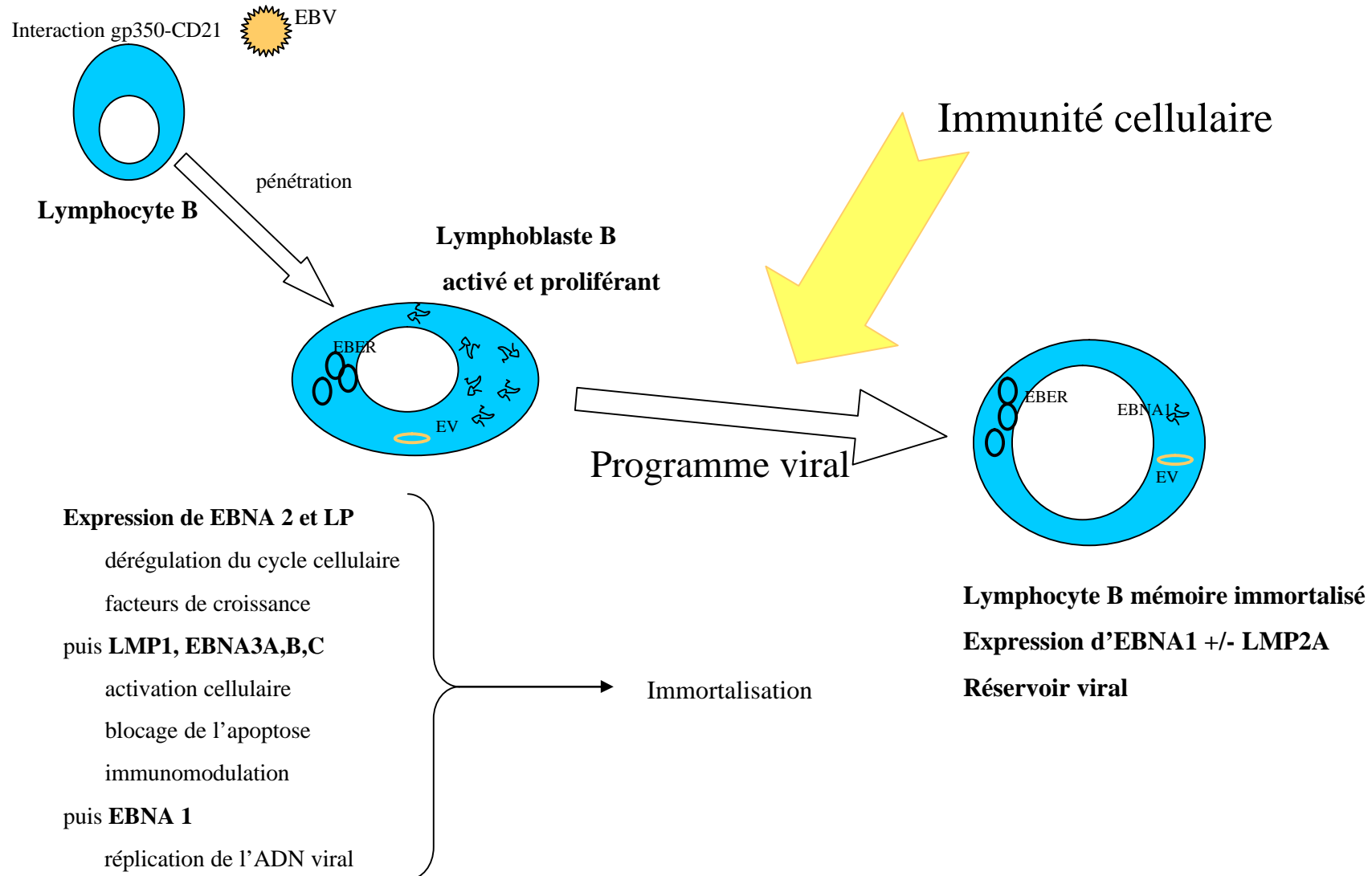
 persistance de clones infectés immortalisés
expression d'un nombre limité de protéines virales :
latence phase I

Trafic lymphocytaire et infection



Thorley-Lawson 2001

L'infection lymphocytaire par l'EBV reproduit la rencontre avec l'antigène



MNI

- Tableau en rapport avec l'absence d'immunité anti-EBV (primoinfection ou immunodépression)
- Lymphoprolifération B polyclonale par immortalisation :
 - hyperplasie lymphoïde
 - complications auto-immunes humorales
- Apparition décalée de la réponse T anti-EBV :
 - chez l'immunocompétent
 - syndrome mononucléosique biologique
 - complications auto-immunes cellulaires

Protéines virales de latence et prolifération B

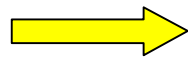
- EBV nuclear antigens (EBNA)
 - EBNA1 : réplication et persistance de l'épisome viral
inhibition du protéasome (motif gly-gly-ala) : pas de présentation CMH₁
présente dans toutes les cellules infectées
inhibition de l'apoptose
 - EBNA2 : activation cellulaire ; entrée en G1
indispensable à l'immortalisation B
- EBNA-leading protein (LP)
 - entrée en mitose
- Latent membran protein (LMP) 2A
 - mise en jeu de voies de signalisation reproduisant la stimulation antigénique
(rôle BCR-like)
 - modification des étapes de différenciation B normales

LMP1

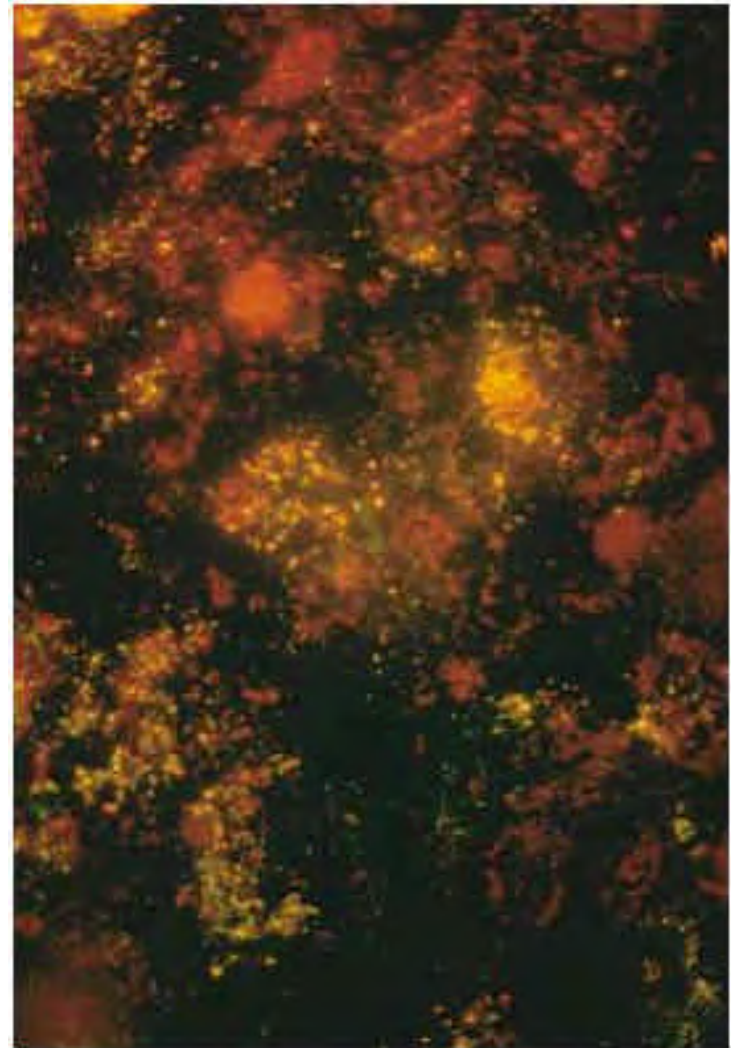
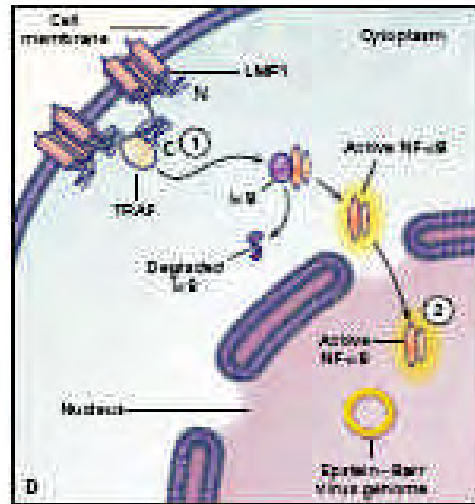
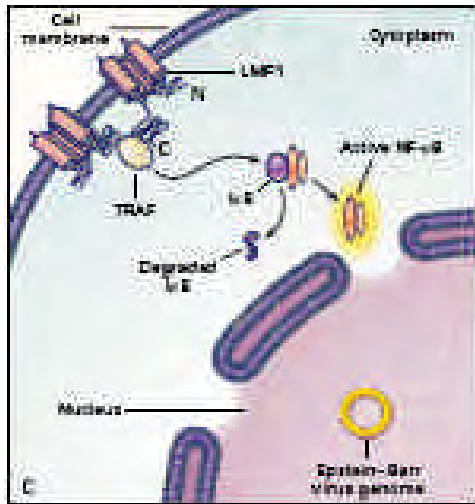
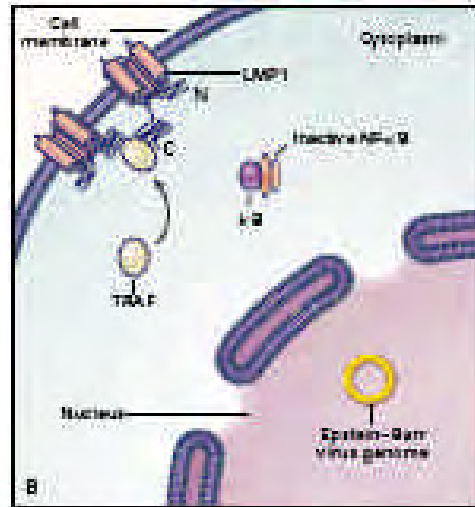
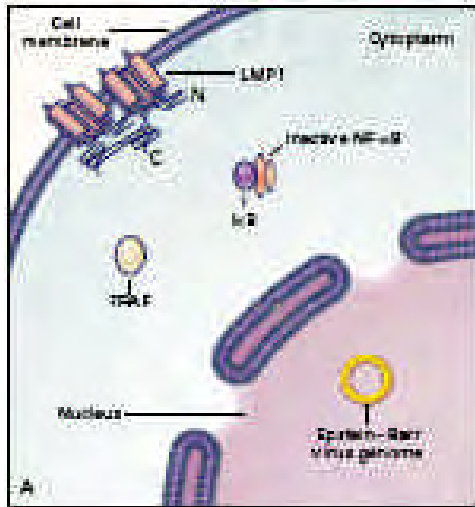
- Déclenche l'activation des mêmes messagers secondaires que CD40L
- Interaction avec famille TRAF (TNF receptor-ass. fact)

→ Activation de NFκB

- Activation d'autres voies anti-apoptotiques (bcl-2)
- Augmentation de la synthèse d'IL10

 rôle dans l'immortalisation B

- Souris transgénique / LMP1 (sous la dépendance du promoteur des Ig) : développement spontané de lymphomes

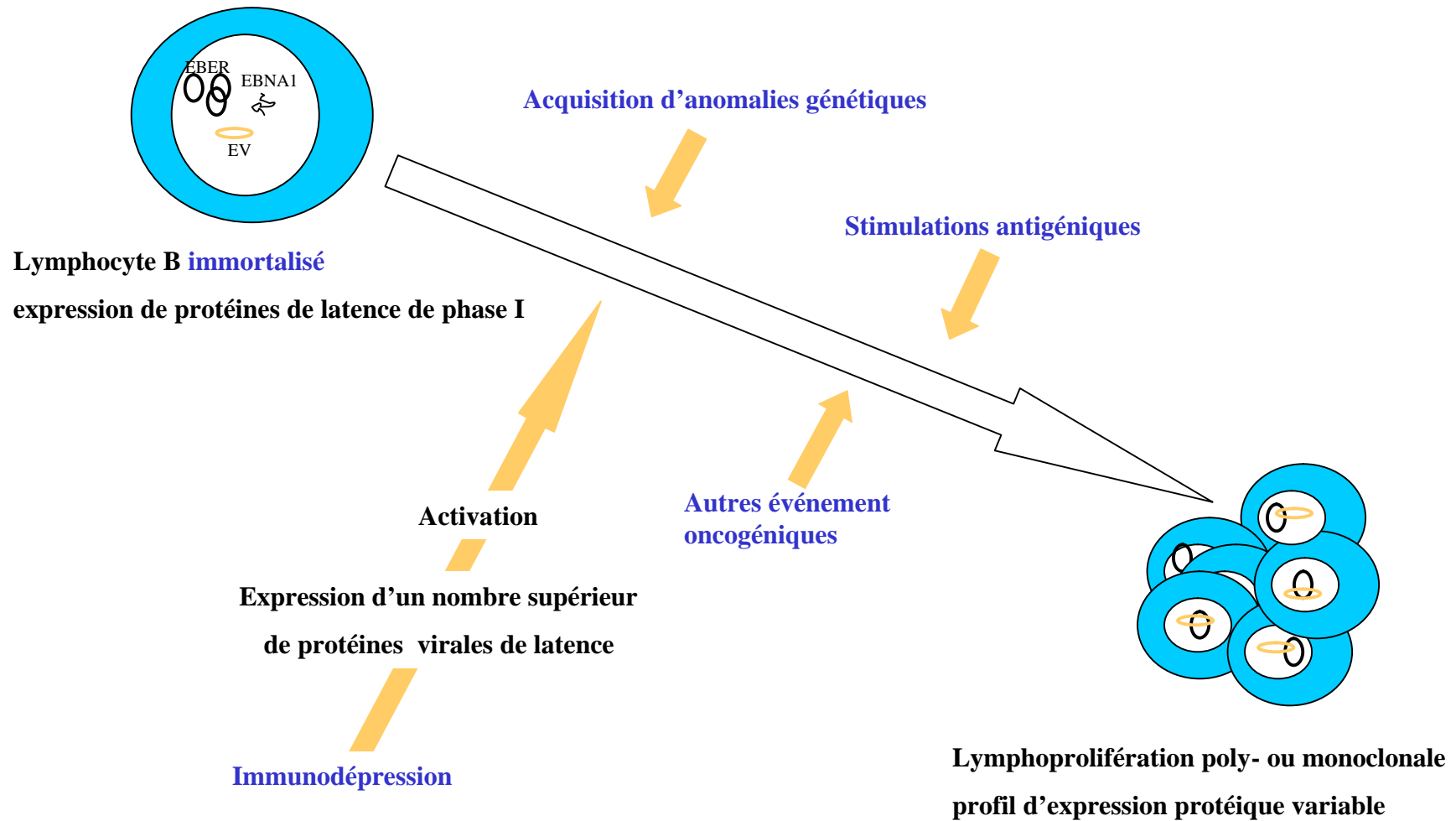


Liebowitz 1998

Les phases de latence

Phase de latence	Protéines virales	Situations
I	EBNA-1 +/- LMP2 _A	Lympho B immortalisés (sujet sain) L de Burkitt
II	Idem phase I + LMP1 LMP2 _B	Carcinome nasopharyngé Maladie de Hodgkin LNH de l'immunocompétent
III	Idem phase II + EBNA2 EBNA3 _{A,B,C} EBNA LP	Lympho B nouvellement infectés LNH de l'immunodéprimé

Lymphomagenèse et EBV



EBV et immunodépression

- Expression par les LB de protéines virales
 - immunogéniques chez l'immunocompétent
 - responsables d'une augmentation de prolifération
d'une diminution de l'apoptose

→ Prolifération B

- mono, oligo ou polyclonale
- suivant le degré d'immunodépression
- en fonction de la présence d'anomalies génétiques
à risque (translocations)

Liaison EBV-lymphomes : quels outils d'étude ?

- Sérologie
- Histologie :
 - immunohistochimie : protéines de l'EBV
 - hybridation in situ : EBER
- Biologie moléculaire : charge virale
 - sang : sang total / PBMC / plasma ...
 - autres liquides (salive, LCR ...)
 - tissu tumoral

Charge virale EBV : quel compartiment ?

- Le plus précis : LB CD19+ IgGD- CD23-
- Cellulaire :
 - leucocytes, PBMC, lymphocytes ...
 - reflète l'infection latente
- Plasmatique :
 - reflète un dommage cellulaire artefactuel
 - ou reflète une infection lytique avec production de virion
- Sang total
 - simple
 - corrélé à la CV des PBMC dans la majorité des cas

Lymphoprolifération post-transplantation : épidémio

Cockfield
Transp Inf Dis

- Risque reconnu de façon ancienne
- Variable selon :
 - le statut EBV du donneur et du receveur
receveur EBV- : RR 10-76
 - le type d'organe greffé : C. souches ou moelle vs organe solide
 - l'organe greffé : intestin > poumon > foie > rein
 - le protocole d'immunosuppression
 - polymorphisme de gènes de cytokines
Greffe de rein : 80% des patients avec LPT ont l'allèle de basse sécrétion de l'IFN?, contre 12% des patients indemnes
 - age (corrélation positive)
 - statut CMV (D+R-)
 - statut HCV (greffe de foie)

LPT

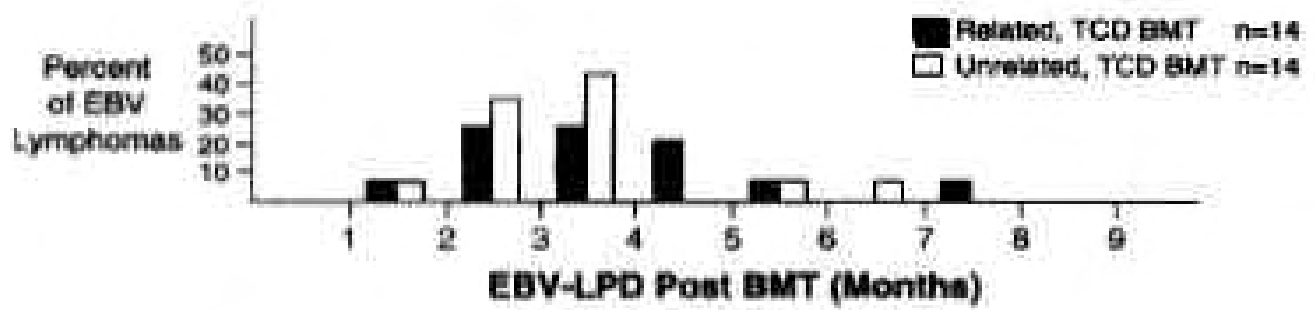
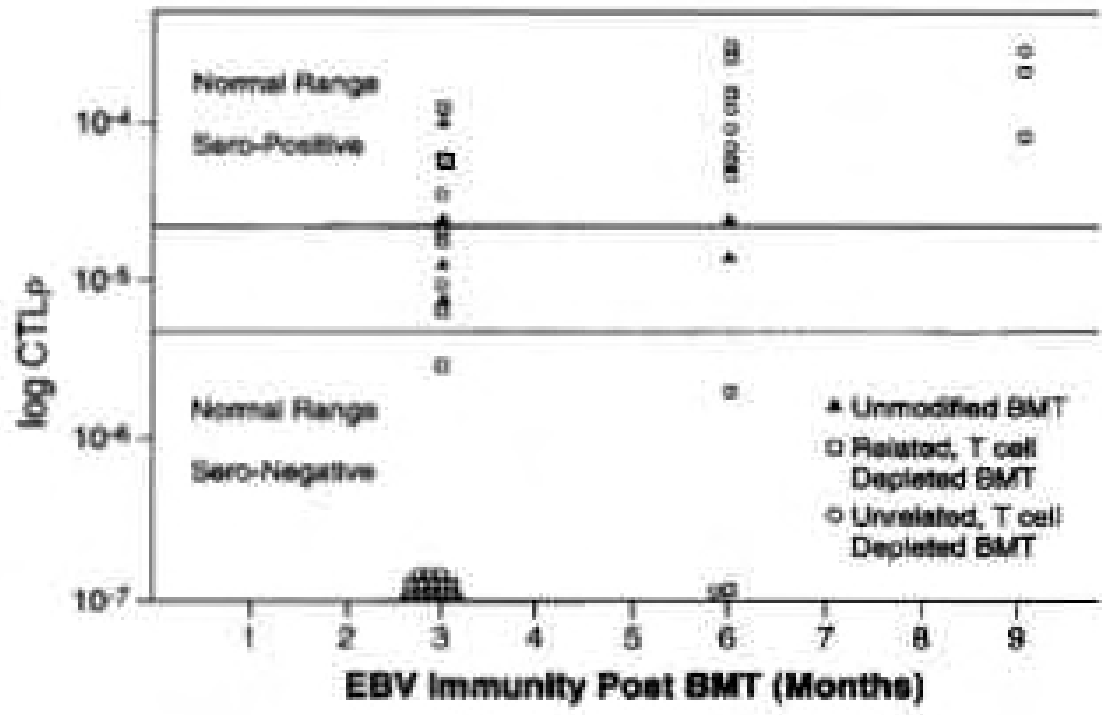
- Risque global de néoplasie : 6% (hors GMO) Penn Transplant Proc. 1996
 - tumeurs cutanées 37%
 - LPT 16%
 - SK 4%
 - carcinome rénal 3,6%
 - carcinome cervical 3%
 - carcinome vulvaire 2,6%
- Risque de LPT selon l'organe greffé :
 - 1-2,5% rein et foie
 - 2-6% cœur
 - 9-33% poumon
 - 1 % moelle osseuse et CS (hétérogénéité)
- Origine la plus fréquente :
 - greffe de cellules souches : donneur
 - greffe d'organe solide : receveur

Histologie des LPT

- Lymphome B à grandes cellules (clonalité variable)
- Lymphome T et NK (4-14%)
- Lymphome de Burkitt (<10%)
- Maladie de Hodgkin : pas de risque élevé (sauf GMO : RR faiblement augmenté)
- Association à l'EBV variable
LB : constante ; LBGC : 70%

Immunité anti-EBV et LPT

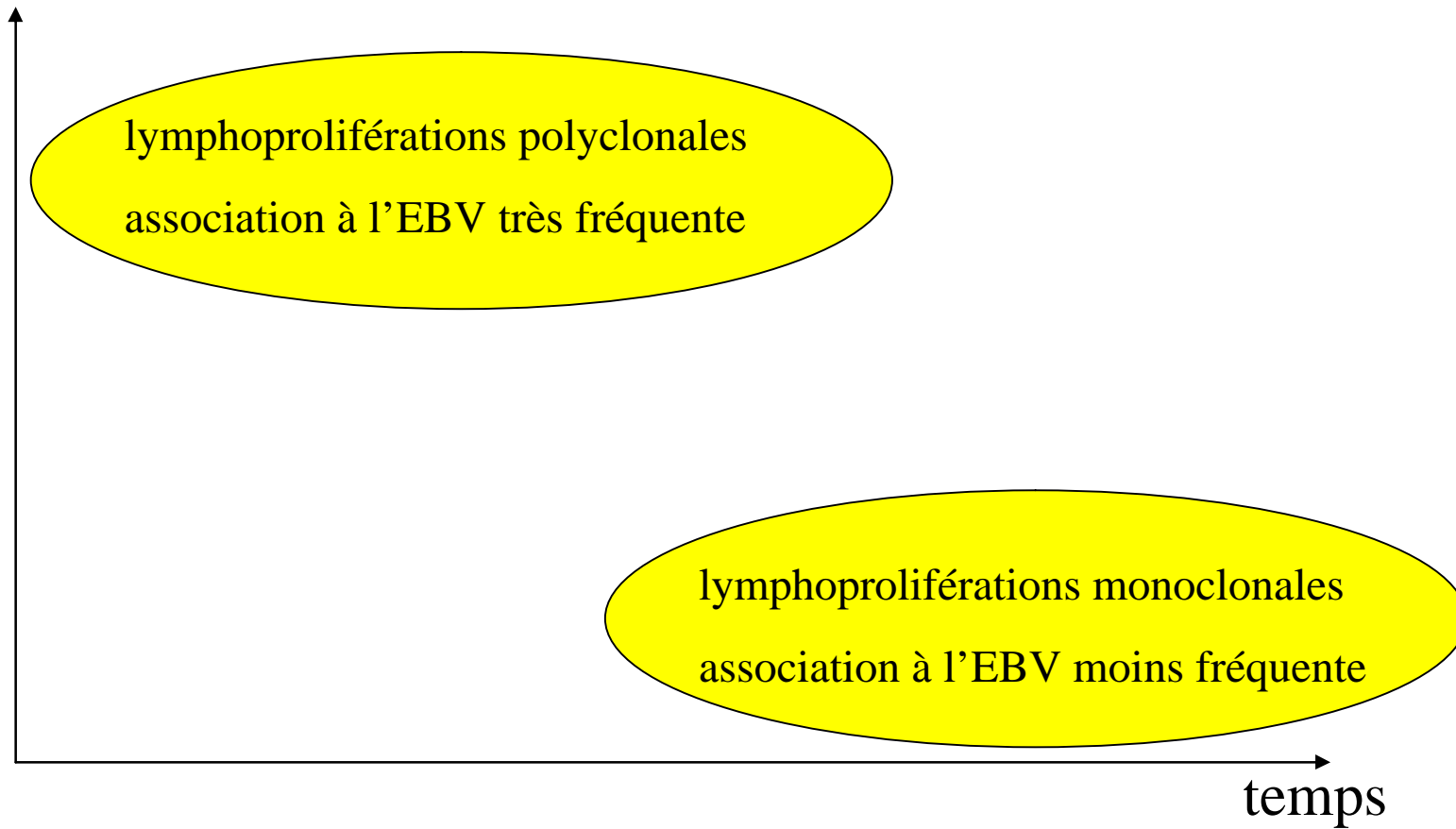
- Fréquence des TCD8+ anti-EBV après greffe de CS :
 - normalisation variable selon la déplétion T (Lucas 1996)
 - risque de lymphoprolifération accrue en cas d'absence de reconstitution du pool T anti-EBV (Meij 2003 : 2/8 vs 13/16)



Lucas 1996

Schéma d'apparition des LPT

immunosuppression

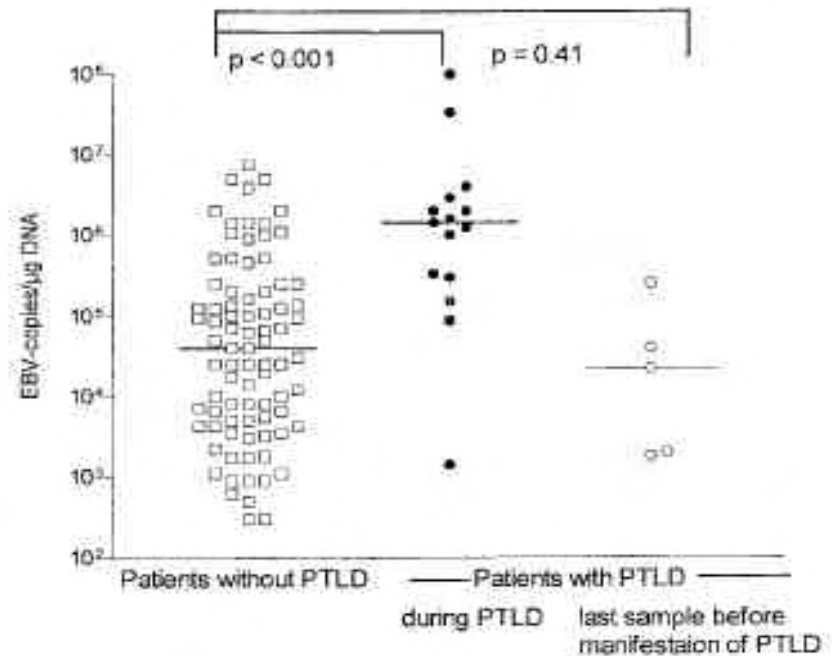
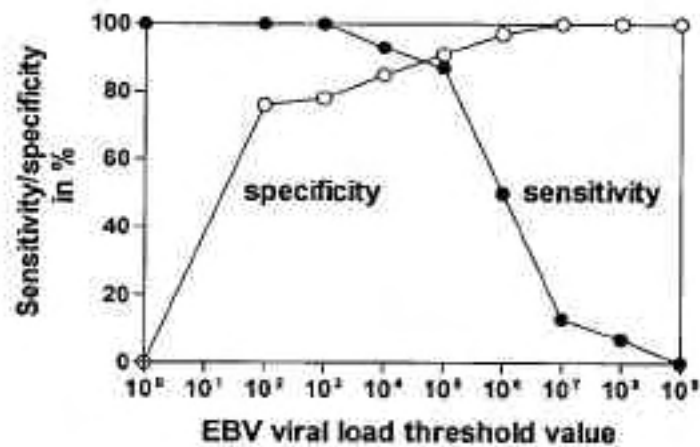


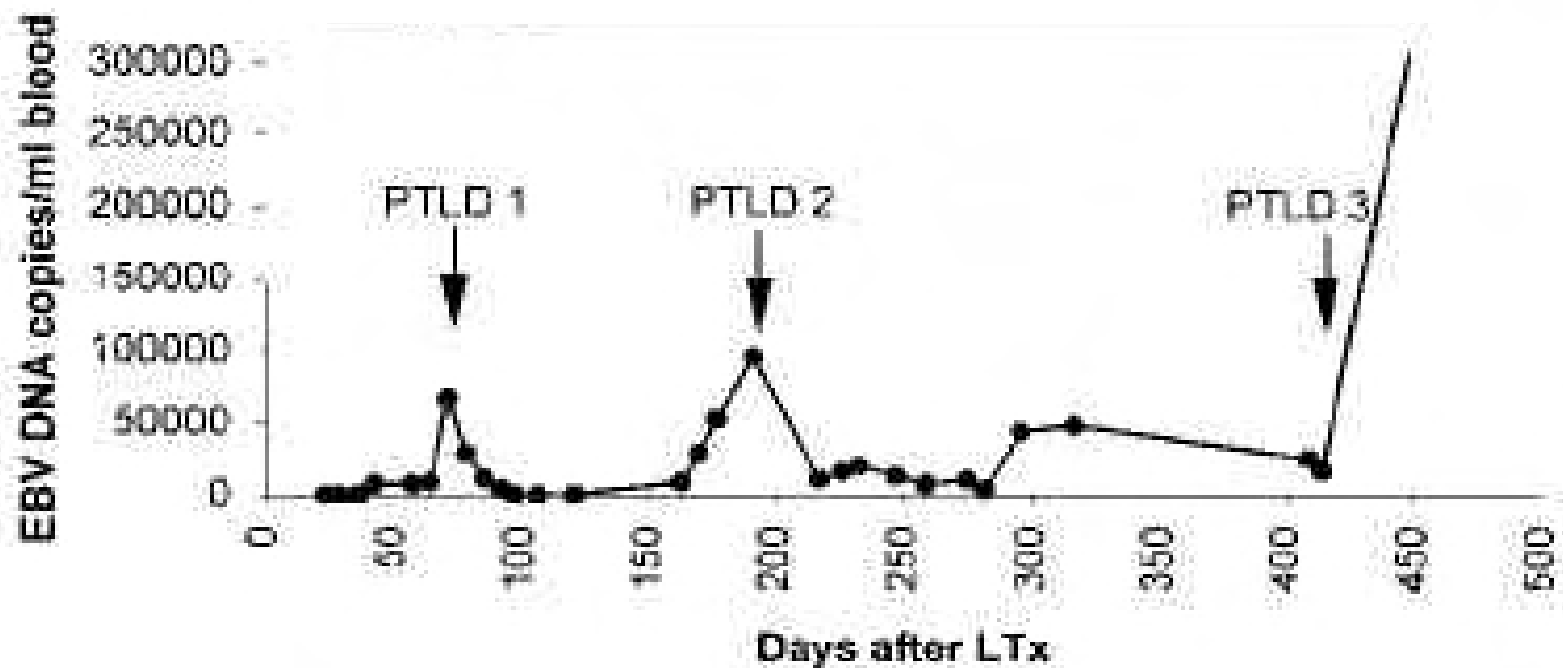
LPT et CV sanguine EBV

- Compartiments étudiés :
 - plasma : en fait corrélé à la lyse cellulaire
 - PBMC ; lymphocytes ; lymphocytes B
 - sang total : simple
 - expression des résultats hétérogène dans les études
- Détecte l'expansion d'un clone infecté
et/ou une primo-infection ou une réactivation EBV
- Monitore aussi le niveau d'immunodépression
- Outil de diagnostic précoce et de suivi

- Kenagy 1995 : 21 patients, 5 LPT
 - élévation de la CV des PBL 4-16 semaines avant le diagnostic de PTLD (organes solides)
- Van Esser 2001 : 152 patients greffe CS
 - élévation de la CV EBV plasmatique :
 - 54% si greffon T-déplété, 28% si greffon non manipulé
 - la plupart du temps asymptomatique
 - 10 PTLD (tous après T-déplétion), dont 7 monoclonales
 - 13-120 jours après l'élévation de CV
 - cut-off difficile à établir
- Jabs 2001 : 114 patients, 10 LPT
 - élévation de la CV des PBMC plus significative si rapportée à la PCR quantitative de la *C-reactive protein*
- Stevens 2001 : 14 greffés pulm, 6 LPT
 - suivi prospectif hebdomadaire ; sang total et plasma
 - si élévation : très rapide (T $\frac{1}{2}$ 56 heures)
 - intervalle élévation-PTLD hétérogène ...

- Gärtner 2002 : 59 patients / greffe C souches, 9 LPT
 - suivi prospectif sur sang total
 - 3 types de patients :
 - pas d'élévation ni de LPT
 - élévation puis diminution : réactivation EBV contrôlée ; pas de LPT
 - élévation persistante et diagnostic de LPT
délai : 20-71 jours
 - meilleur compromis sensibilité-spécificité :
 10^5 copies / μg d'ADN (87% - 91%)





LPT, EBV et autres CV

- Salive
 - élévation non corrélée à la CV sanguine
 - pas de liaison avec PTLD
 - diminution isolée sous antiviraux
- Tumorale
 - valeur pronostique ?

Traitement des LPT

- Greffe C souches
 - rituximab (anti-CD20)
 - diminution de l'immunosuppression (risque : GVH)
 - injection de lymphocytes du donneur (idem)
 - injection de TCD8+ anti-EBV
- Greffe d'organe solide
 - réduction de l'Isuppression
 - rituximab
 - chimiothérapie, radiothérapie
 - IFNa
 - injection de TCD8+ anti-EBV
- Traitement préemptif ?
 - dès l'élévation de la CV EBV
 - surtout en greffe de CS

LPT, EBV et antiviraux

- Rationnel en prophylaxie
 - receveur EBV- : éviter la primo-infection
 - receveur EBV+ : éviter l'infection de nouveaux clones
 - études rétrospectives : étude de patients sous prophylaxie anti-CMV
 - élévation de la CV chez patients déjà sous GCV (McDiarmid 1998)
 - traitement par SAL : 1 LPT /127 patients sous G/ACV vs 7/92 sans (Darenkov 1997)
 - études prospectives
 - Green 1997
 - traitement par GCV 1 an / greffe de foie / enfants
 - différence significative dans le sous-groupe des séronégatifs pour l'EBV : 5/15 sous GCV vs 8/12
 - Malouf 2002 (mais groupe de comparaison = cohorte antérieure...)
 - traitement par ACV ou GCV de 15 greffés EBV-
 - LPT cohorte de comparaison : 7/167 patients
 - LPT patients traités : 0/15 (suivi médian : 806 +/- 534 jours)

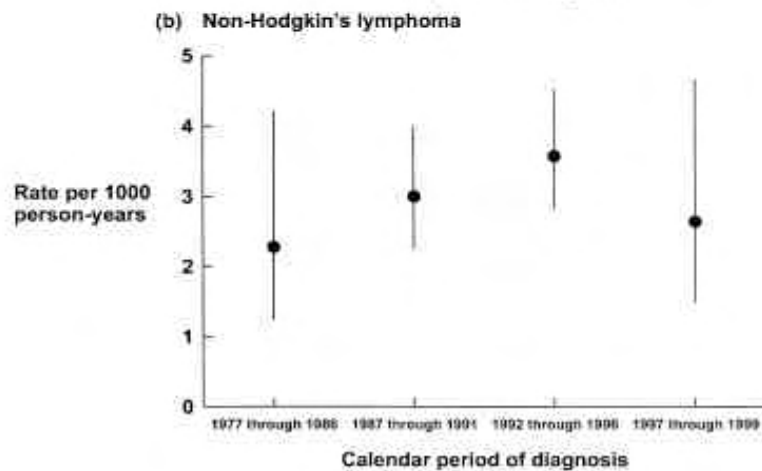
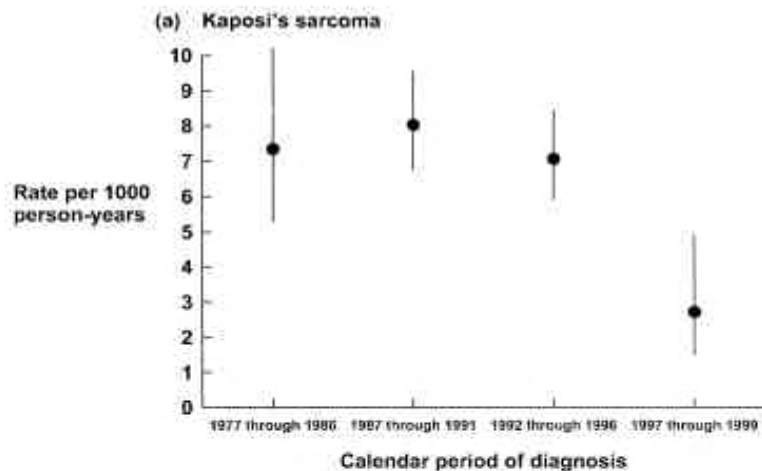
- Antiviraux en traitement curatif :
 - rationnel antiviral mince (voire inexistant)
 - historiquement largement utilisés
 - aucun essai randomisé
 - aucune étude d'utilisation sans autre moyen thérapeutique
 - rationnel antitumoral ?
 - provoquer l'entrée en cycle lytique et / ou l'expression de la TK
 - phosphorylation de ACV ou GCV
 - cytotoxicité limitée aux cellules infectées
 - agents provoquant l'entrée en cycle lytique :
 - doxorubicine
 - gemcitabine
 - butyrate d'arginine : phase I/II (Faller 2002)

LM du VIH : épidémio

- Néoplasies et VIH (Goedert 1998 ; 98336 patients) :
 - risque lié à la profondeur de la lymphopénie...
 - ... lymphome : moins simple
 - SK : RR 300-10⁵
 - LMNH : 280 (3-627)
 - carcinomes anaux : 31
 - MH : 8
 - ADK pulm : 2,5
- Lymphoproliférations (association à l'EBV) :
 - MH (constante), même hors toute histoire de lymphopénie
 - LB (40-70%)
 - LBGC (70-80%)
 - lymphomes cérébraux (constante) ; immunodépression requise
 - LT
 - lymphomes des séreuses

LMNH, VIH et antirétroviraux

- Lymphopénie = facteur de risque
 - RR : +50% par palier de 100/mm³
- Correction de la lymphopénie et RR :
 - études initiales : AZT=facteur de risque de LMNH !
 - Tardivement et dans les métaanalyses:
 - diminution de l'incidence des LM cérébraux et des LBGC
 - pas de diminution de l'incidence des LB et des MH



Study	Adjusted incidence rate per 1000 per year (No.)		Rate ratio (RR) for 1997 through 1999 versus 1992 through 1996	
	1992 through 1996	1997 through 1999	RR (SE)	RR (99% CI)
Amsterdam	22.7 (53)	7.7 (7)	0.34 (0.14)	
Aquitaine	18.5 (170)	3.3 (18)	0.18 (0.04)	
ASD	15.1 (527)	5.5 (115)	0.37 (0.04)	
CASCADE	10.4 (149)	3.1 (8)	0.30 (0.11)	
DMI-2	15.5 (156)	8.1 (5)	0.52 (0.24)	
HERS	0.4 (1)	0.0 (0)	0.00	
HOPS	21.0 (104)	9.4 (29)	0.45 (0.09)	
MACS	29.3 (189)	4.2 (7)	0.14 (0.06)	
MHCS	0.7 (2)	0.0 (0)	0.00	
RHIHP	0.3 (1)	0.0 (0)	0.00	
SFOCC	37.3 (37)	8.6 (1)	0.23 (0.23)	
ALL STUDIES	15.2 (1489)	4.9 (190)	0.32 (0.03)	

lymphomes du VIH et CV EBV sanguine

- Pas de liens établis
 - CV EBV / risque de lymphome EBV+ (controversé)
 - CV EBV / HAART
 - CV EBV / TCD4+
- } Sauf une étude (Ling 2003)

LM cérébraux et CV EBV LCR

- Premières études : masse cérébrale et CV EBV élevée dans le LCR : pathognomonique d'un LM cérébral
- Puis publications discordantes

LM du VIH et immunité anti-EBV

- Pas de relation taux T anti-EBV / survenue de lymphome EBV+
- van Baarle 2001 : sujets VIH avec lymphome :
 - nombre normal de TCD8+ anti-EBV
 - diminution de leur capacité à synthétiser de l'IFN-?
 - corrélation avec la profondeur de la lymphopénie TCD4+

LM du VIH, antirétroviraux et chimiothérapie

- Meilleure réponse tumorale sous HAART
corrélation avec la réponse viro-immuno

Hoffmann 2003

- Meilleure survie sans événement tumoral
sous HAART

Antinori 2001, Gérard 2003

- Faisabilité de l'association

LM du VIH et antiviraux

- Curatifs ou prophylactiques :
débat identique aux LPT
- Etudes rétrospectives :
 - patients en prophylaxie II^{aire} anti-CMV ou traités pour une infection à CMV, HSV, VZV
 - RR de lymphome : 0,27 (Fong 2000)

Lymphomes de l'immunodéprimés et CV EBV tumorale

- Étude menée sur 25 lymphoproliférations :
 - 14 LM du VIH
 - 11 LPT (poumon, foie, rein, CS)
- Facteur pronostique (cut-off : 5.5 Log)
- Absence de corrélation avec la lymphopénie (VIH+)
- Absence de différence transplantés / VIH+

CVEBV tumorale et survie

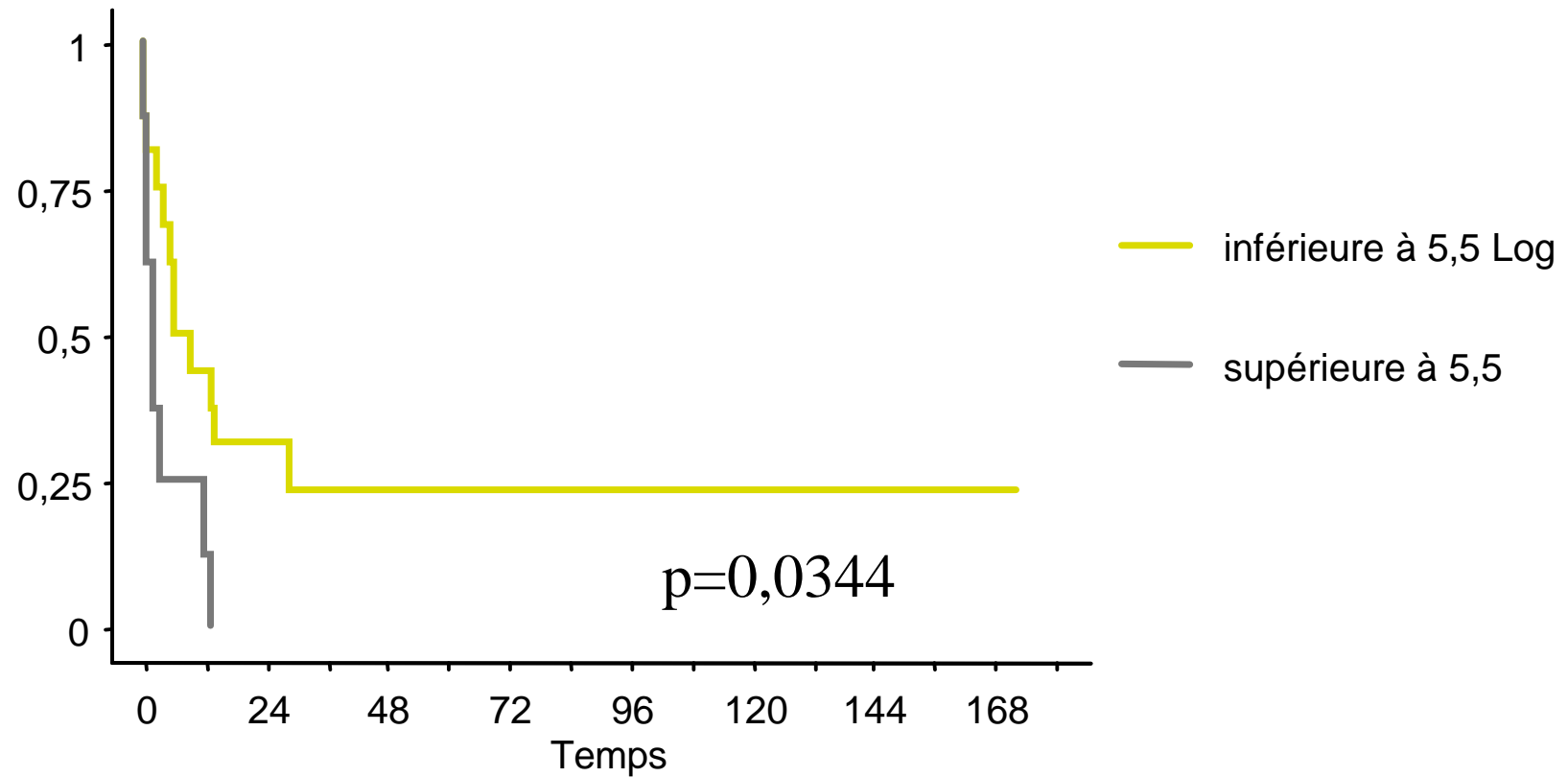
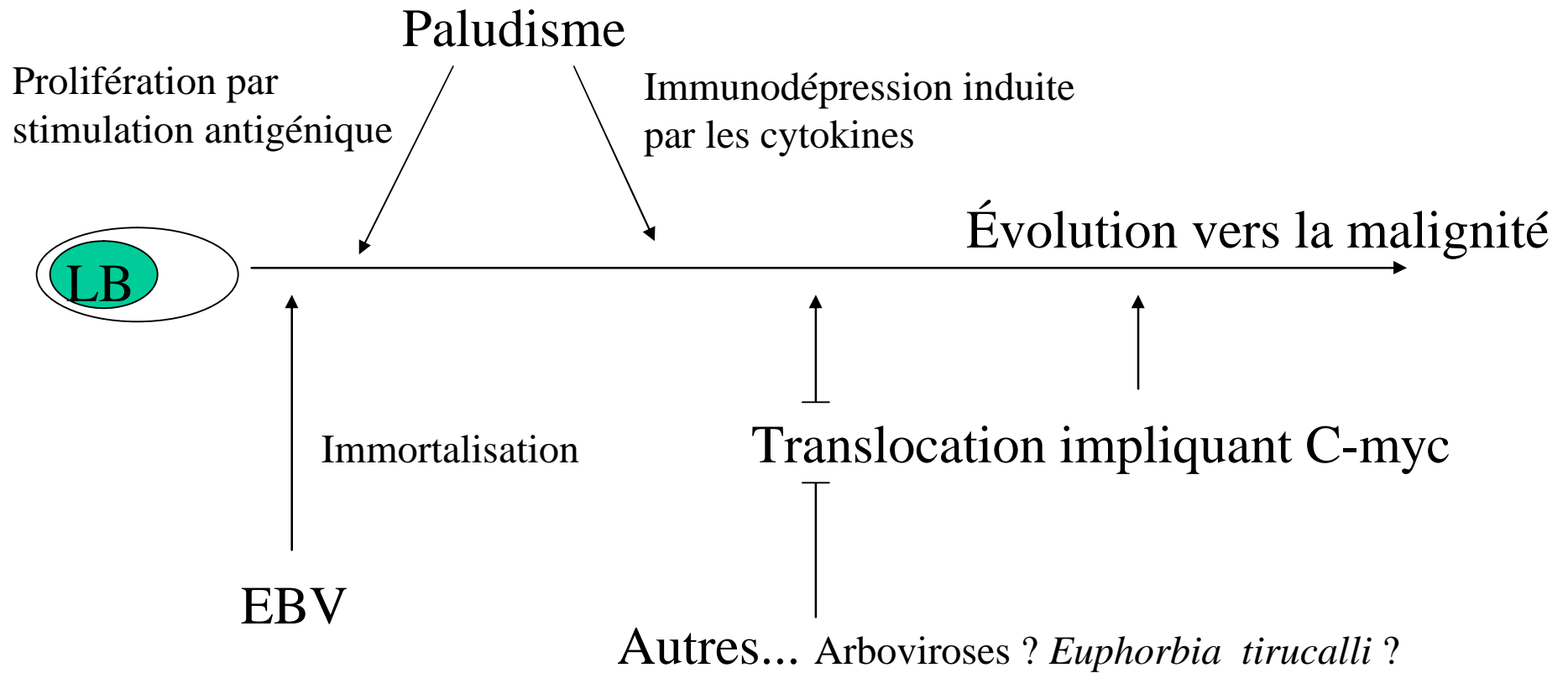




Figure 2. The lymphoma belt. Burkitt's lymphoma is endemic in regions with high endemicity. Interpretation: Burkitt's lymphoma is endemic in regions with high endemicity. Interpretation: Burkitt's lymphoma is endemic in regions with high endemicity.

Lymphome de Burkitt endémique

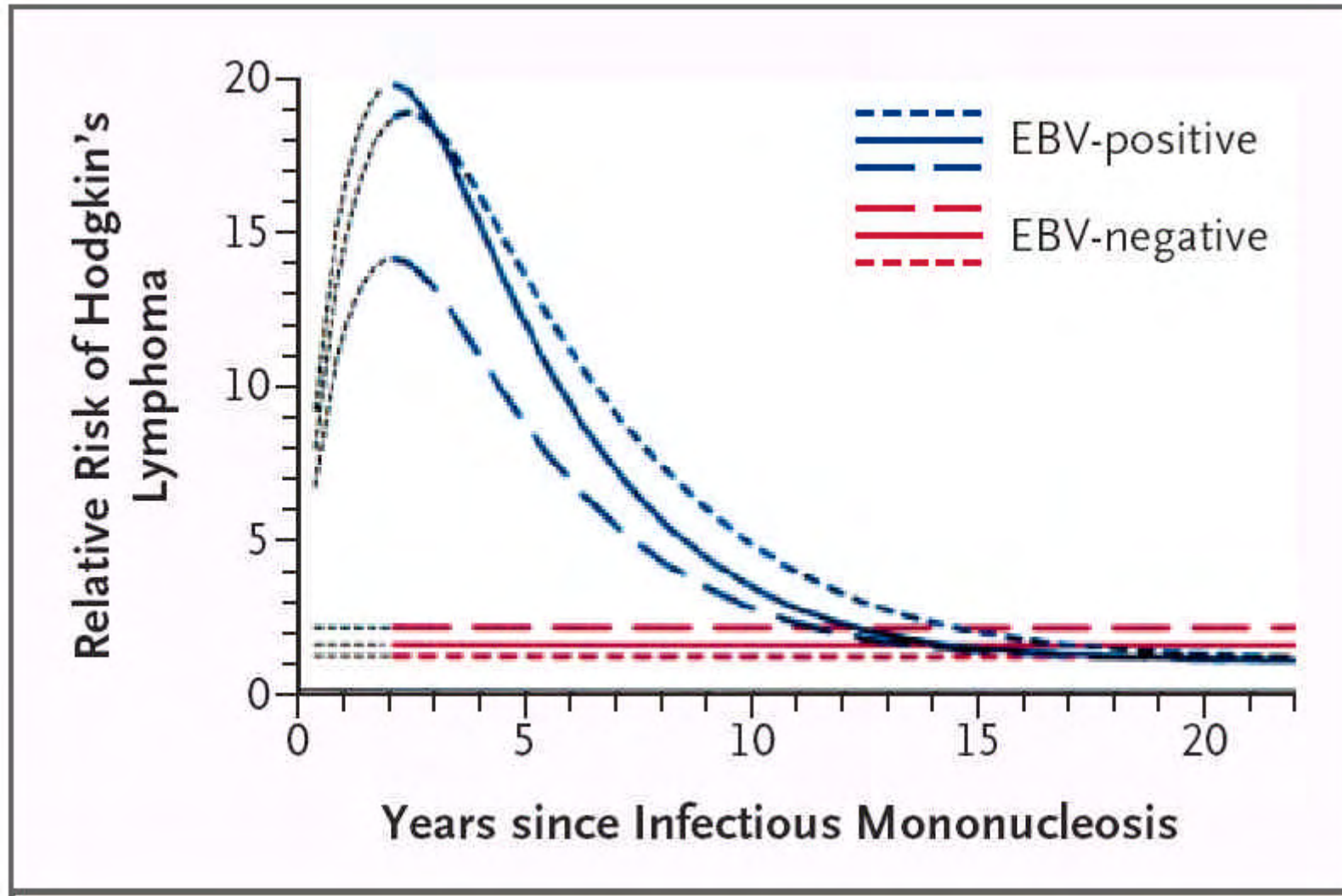
D'après van den Bosch, 2004



Maladie de Hodgkin et EBV

- Lymphome d'origine B (post-germinal)
- Arguments épidémiologiques pour une association :
 - risque augmenté après une MNI
 - RR 2-4
 - délai moyen 4 ans
 - risque augmenté en cas de transfusion sanguine (controversé)
- Fréquence de l'association (latence type II) :
 - MH classique : 50 à 80 % des cas
 - MH scléronodulaire : 15 à 30 %
 - MH associé au VIH ou en pays tropical : constant
- Origine de l'absence de réaction anti-protéines de phase II ?

Risque post-MNI de MH



Hjalgrim 2003 (46 MH)

MH, EBV et échappement immunitaire

- Altération de la présentation par le CMH I
- Délétions et mutations (LMP1)
- Anergisation des lymphocytes T intratumoraux
 - malgré une réponse T anti-EBV générale conservée (Frisan 1995)
 - hypersécrétion d'IL10 par les cellules de RS (Herbst 1996) (via LMP1)
- Intérêt d'une immunothérapie cellulaire passive anti-EBV (Roskrow 1998)

EBV et lymphoprolifération liée à l'X

- Mutation de la Slam Associated Protein (SAP ou SH2D1A)
- Vie normale jusqu'à la primo-infection EBV
 - MNI fulminante
 - SAM
 - lymphoprolifération poly- ou monoclonale
 - décès +/- rapide
- relation entre SAP et immunité anti-EBV ??
 - Présence de TCD8+ anti-EBV
 - mais absence de contrôle de la lymphoprolifération B médiée par l'EBV

EBV et lymphoproliférations : en conclusion

- Oncogénicité
 - croissante avec l'immunodépression
 - immortalisation B
 - LMP1 = oncogène
- Diminution de l'immunogénicité
- Potentialisation d'autres oncogènes
 - immortalisation \longrightarrow sommation des anomalies

HHV8

- γ -herpes virus isolé de culture de SK (1994)
- Séroprévalence (USA) :
 - 25% des adultes sains, 90% des adultes VIH+
 - 9% des enfants sains
- Voie de contamination : salivaire > sexuelle
- Populations infectées :
 - lympho B et T
 - macrophage
 - cellules endothéliales
- Primo-infection :
 - enfant : éruption fébrile
 - adulte : presque jamais décrite

HHV8 et néoplasie

- **SK** (classique, endémique, de l'immunodéprimé)
 - tumeur d'origine endothéliale
 - HHV8 constamment présent
- **Maladie de Castleman** (localisée, systémique)
 - lymphoprolifération polyclonale d'origine B
 - forme du sujet VIH : association quasi-constante à HHV8
- **Lymphome des séreuses** (primary effusion lymphoma)
 - circonstances : VIH+ ; pyothorax du sujet âgé
 - lymphoprolifération monoclonale B sans contingent solide
 - associé à HHV8 dans 100% des cas VIH+
 - association à l'EBV > 90%

HHV8 et lymphoproliférations

- Protéines de HHV8 potentiellement impliquées :
 - vIL6 : homologue de l'IL6
 - vbcl2, vFLIP : anti-apoptotique (apoptose Fas-médiée)
 - vGPCR, vMIP-II : pro-angiogénique
 - vCyclin D2 : entrée en mitose
- Expression de protéines de latence (LS) ou du cycle lytique (MC)
- Charge virale sanguine (PBMC) : reflet de l'évolution néoplasique (MC ++)

VIH et lymphomes

- Pas de détection de génome VIH dans le clone tumoral
- Diminution de l'immunosurveillance
- Stimulation antigénique chronique
- Environnement cytokinique particulier
- Lymphomes du VIH : moindre fréquence de translocation impliquant des oncogènes
présence d'autres facteurs oncogènes puissants ?

Tat : un oncogène

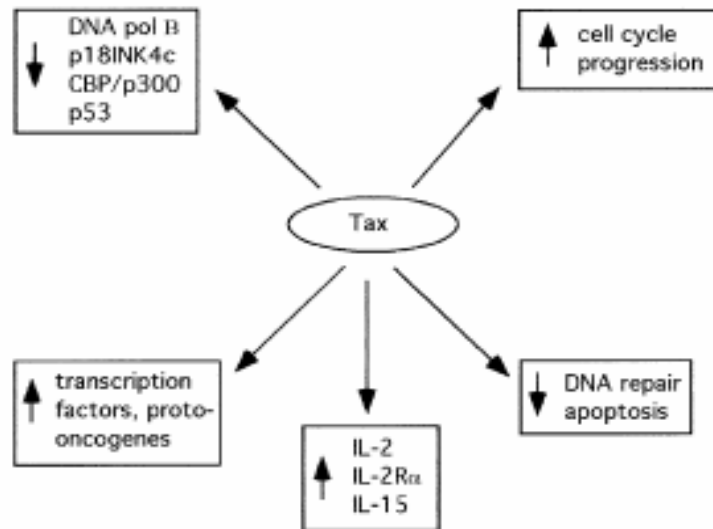
- Activation de NF κ B par le biais de JKR
- Souris transgéniques exprimant Tat :
fréquence élevée de lymphoproliférations

HTLV-I

- Séroprévalence : Japon, Caraïbes, Amérique du sud, Afrique de l'ouest, Mélanésie
- Transmission : sexuelle, sanguine, materno-fœtale
- Infection des lymphocytes T puis persistance sous forme latente (présence de l'ADN proviral, mais pas de protéines virales)
- Isolé de culture de leucémie/lymphome T de l'adulte
- Origine infectieuse de LLT suspectée sur l'épidémiologie
- Risque de LLT en cas de séropositivité : 1-4%
probable intervalle moyen infection-LLT : 30-50 ans
risque supérieur en cas de contamination muqueuse

Lymphomagénèse et HTLV-I

- Principal effet : immortalisation
- Principal effecteur : protéine Tax



- Présence de cofacteurs

HCV et lymphomes

- HCV : lymphotropisme mal élucidé
 - infection lymphocytaire démontrée
 - cryoglobulinémie mixte type II : reflet d'une population lymphocytaire clonale ; LNH vrai dans 5 à 8 % des cas
 - RR de LNH chez HCV+ : 5,7 (Matsuo 2004)
- Physiopathologie ?
 - Immunocytomes du sujet HCV+ : sous-type particulier de gènes VBJ : en faveur d'une stimulation antigénique initiale
 - CD81 = récepteur putatif de HCV
= voie d'activation lymphocytaire B