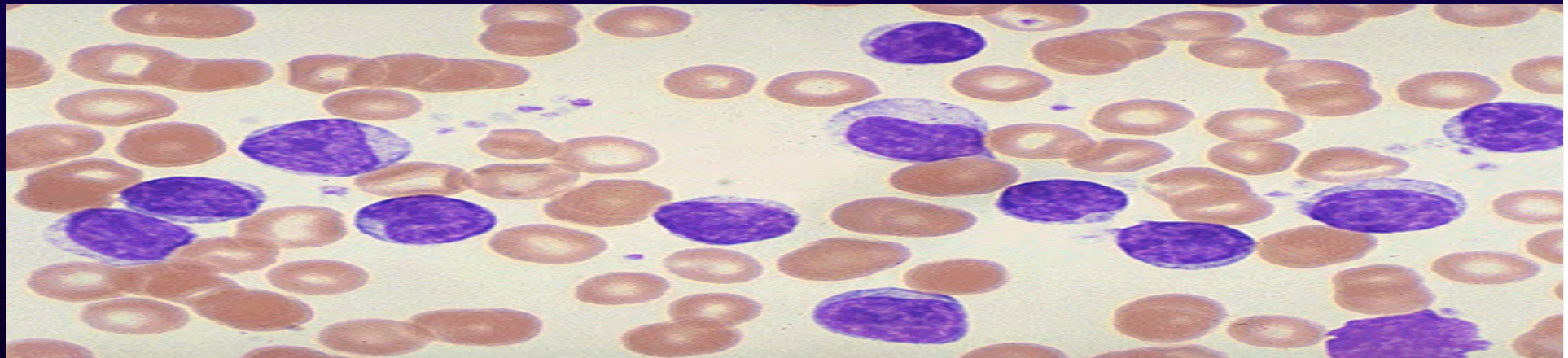


EBV et lymphoprolifération

DESC Pathologie infectieuse et Tropicale

Dr Corinne AMIEL
Virologie - Hôpital Tenon
UPMC Paris VI – H.Pitié Salpêtrière

Lundi 24 janvier 2011



Le virus EBV

EBV : 47 ans ...



EPSTEIN MA, BARR YM

Cultivation in vitro of human lymphoblasts from Burkitt' malignant lymphoma

[Lancet 1964, Feb 1; 41 : 252-3](#)

EPSTEIN MA, BARR YM

Virus particles in cultures lymphoblasts from Burkitt' lymphoma

[Lancet 1964, Mar 28; 15:702-3](#)

EPSTEIN MA, WOODAL JP, THOMSON AD

Lymphoblastic lymphoma in bone-marrow of African green monkeys inoculated with material from a child with Burkitt' lymphoma

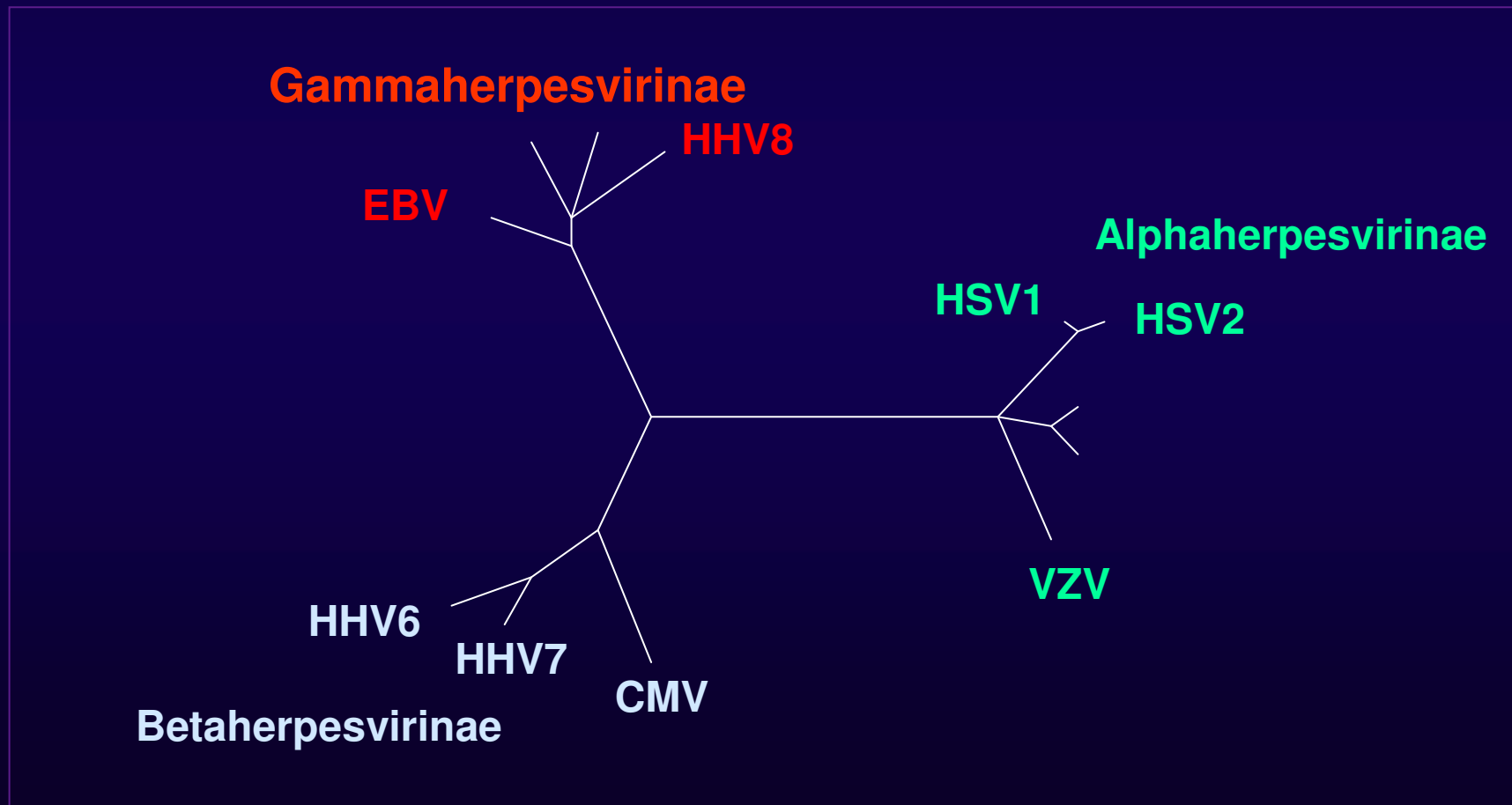
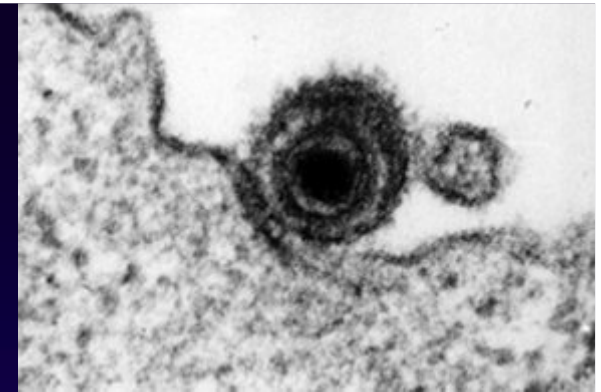
[Lancet 1964, Aug 8; 13:288-91](#)

Classification des virus à ADN

Symétrie capside	Enveloppe	Conformation ADN	Famille	Pathologies associées
icosaèdre	nu	Linéaire SS	PARVO <i>viridae</i>	Parvovirus B19 →Megaleryth (5è) → Erythroblastopénies
		Circulaire DS	PAPILLOMA <i>viridae</i>	Papillomavirus →condylome; papillomatose
		Linéaire DS	ADENO <i>viridae</i>	Adénovirus →respir, ocul (APC), intest
	enveloppé	Linéaire DS	HERPES<i>viridae</i>	HSV, CMV, VZV, EBV , HHV6-7-8
		Circulaire DS	HEPADNA <i>viridae</i>	HBV
complexe	enveloppe complexe	Linéaire DS	POX <i>viridae</i>	Variole, vaccine Molluscum contagiosum

La famille des Herpes virus

EBV / HHV8 = gamma herpesvirus
Latence = LB
pathologies tumorales chez l'homme



>90 % de la population mondiale EBV+

Contamination salivaire



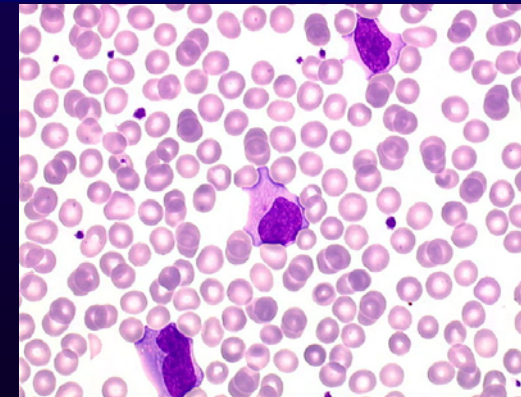
+ contamination par transfusion; greffe moëlle; greffe organe
et sexuelle ? ...

Paradoxes de l'EBV ...



**Le plus haut pouvoir transformant
... mais aucun signe clinique chez la majorité des sujets**

**Entraîne une réponse immunitaire cellulaire intense (CTL)
... mais n'est jamais éliminé des lymphocytes B**



Cycle biologique et tropisme cellulaire

Épithélium
Oropharyngé

(+/- inf c.épith)

Inf LB naïf
CD21

LB naïf

Contrôle NK
et CTL (CD8)

Réactivation et transfo
plasmocyte → réplication
gènes du cycle lytique

Lymphoprolifération :
gènes de latence I,II,III

1) activation et prolifération LB

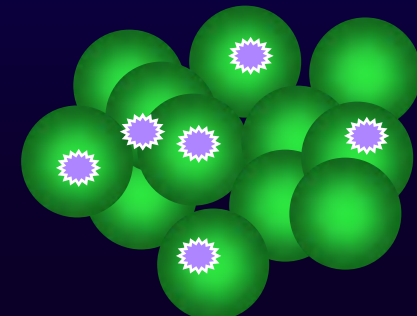
(gènes latence III)

2) différenciation (CG)

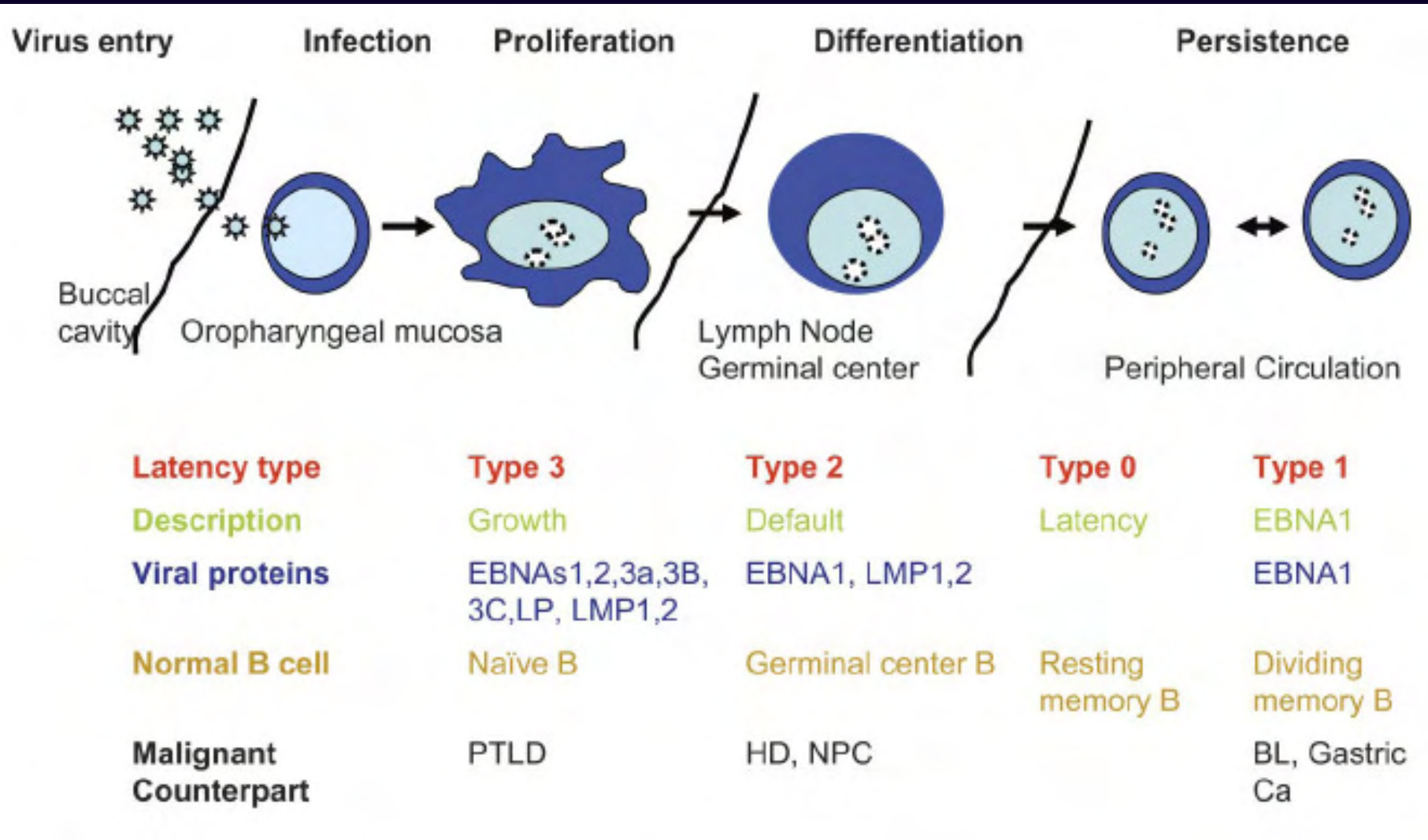
en cell B mémoire

(gènes latence II)

3) Latence 0



Cycle biologique et tropisme cellulaire



1) LB naïf infecté
 → Latence 3 avec activation et prolifération (lymphoblaste)

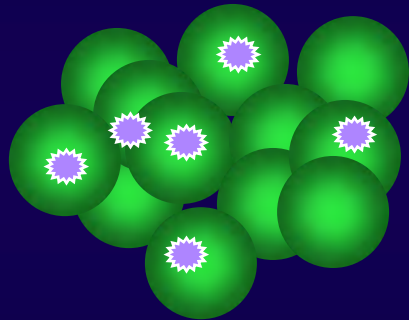
2) différenciation dans centres germinatifs : latence 2

3) pour donner LB mémoires à longue durée de vie : latence 0

Les LB infectés ont 5 programmes de transcription

4 programmes de latence

(latence absolue ou lymphoprolifération)

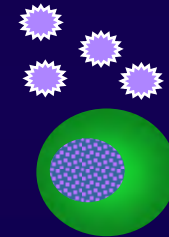


→ *expression gènes de latence (I, II, III) : 10*

- 6 EBNA (EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C, LP)
- 3 LMP (LMP1, 2a, 2b)
- *EBER (ARN NC)*

1 programme du cycle lytique

(réplication plasmocytes → lyse)



→ *expression gènes du cycle lytique : 100*

- BZLF1 (Zebra)
- *polymerase, TK, ...*

Rôles des gènes de latence

EBNA 1 : **maintien génome** (coordonne réplication épisome qd division cellulaire)

EBNA 2 : **oncogène** viral; transactive gènes cellulaires et autres gènes de latence

EBNA 3A et 3B : activent gènes cellulaires

EBNA 3C : **oncogène** viral; augmente expression LMP1

EBNA LP : co-active gènes activés par EBNA2; augmente efficacité **immortalisation**

LMP1 : **oncogène viral**; induit activation B; protège de l'apoptose (**signal de survie**)

LMP2A: répression cycle lytique; augmente survie LB (**signal de survie**)

2 signaux de survie dans centres germinatifs pour LB normaux :

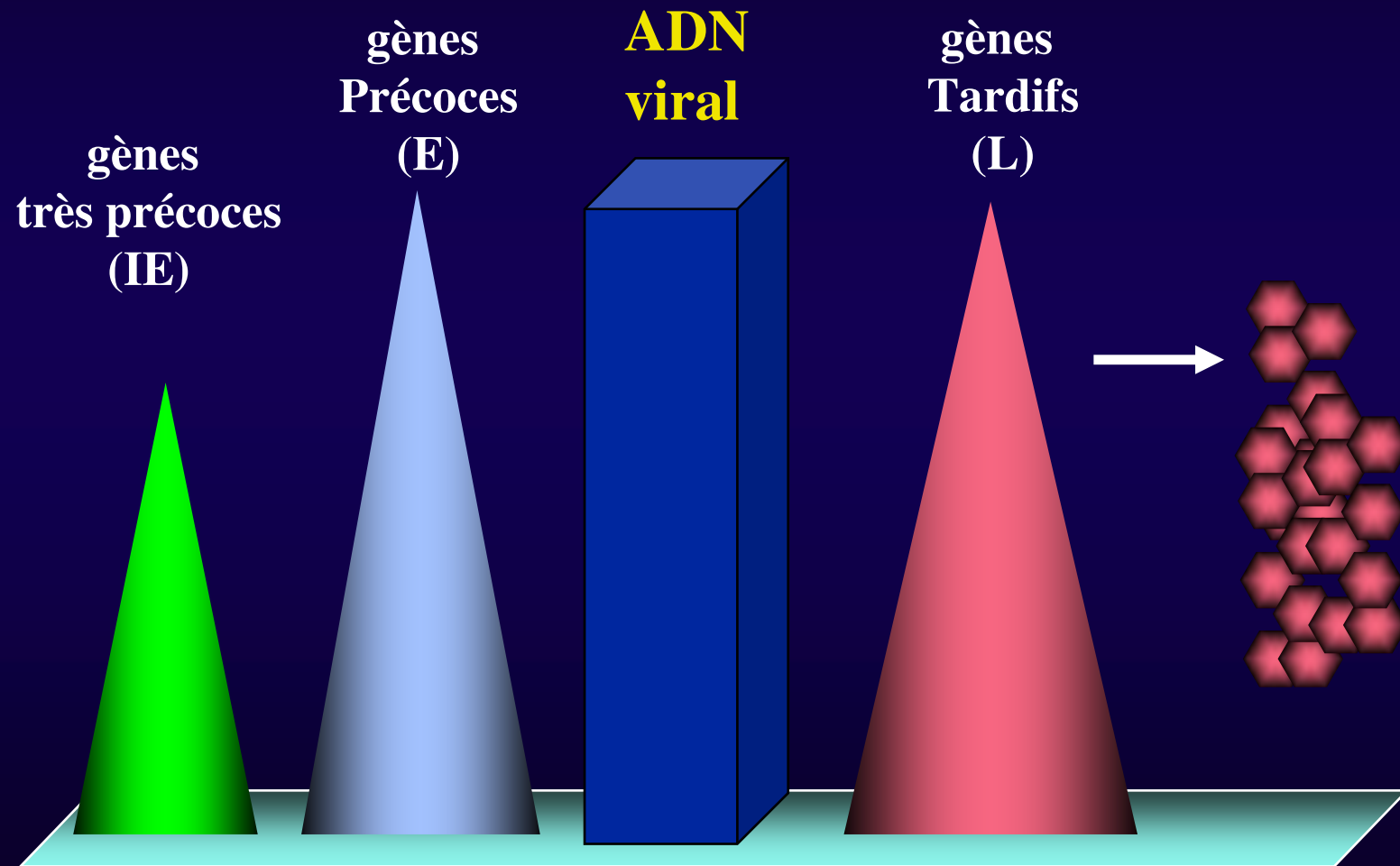
- 1 signal = liaison CD40 du LB au LT helper

→ LMP1 = homologue de CD40

- 1 signal = engagement du BCR (B cell receptor) : se lie à son Ag présenté par cellule dendritique

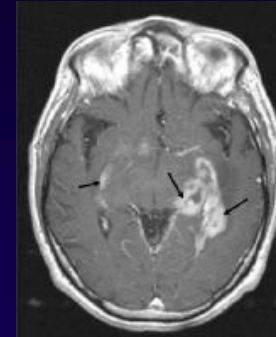
→ LMP2A mime engagement du BCR

Les 3 phases du cycle réplcatif : transcription des gènes IE, E, L



Latence 0, I, II, III

réplication



Sujet
sain

L. Burkitt
L. Séreuses
Division LB

CNP
Hodgkin
Lymphome T
K gastrique

Lymphome ID

Primoinfection
Réactivation
CNP
LCL

0
+/-EBNA1
(division cell)
+/- LMP2A

EBNA 1

EBNA 1
LMP1 et/ou
LMP2 A,B

EBNA 1
EBNA 2
EBNA LP
EBNA 3 A,B,C
LMP1
LMP2 A,B

P lytiques
IE, E, L (80)

Latence 0

Latence I

Latence II

Latence III

qq latences I/II

La réponse immune

Réponses immunes anti-EBV en Primo-infection (IC)

→ Réponses Immunes Non Spécifiques :
- *cellules NK, cytokines (IFN)*

→ Réponses Immunes Spécifiques :

- *Réponse humorale*

- *Réponse cellulaire CD8 ++++*

→ *hyperlymphocytose*

→ *symptomatologie clinique*

et Sd mononucléosique biologique

La réponse humorale en primo-infection

- Apparition chronologique :

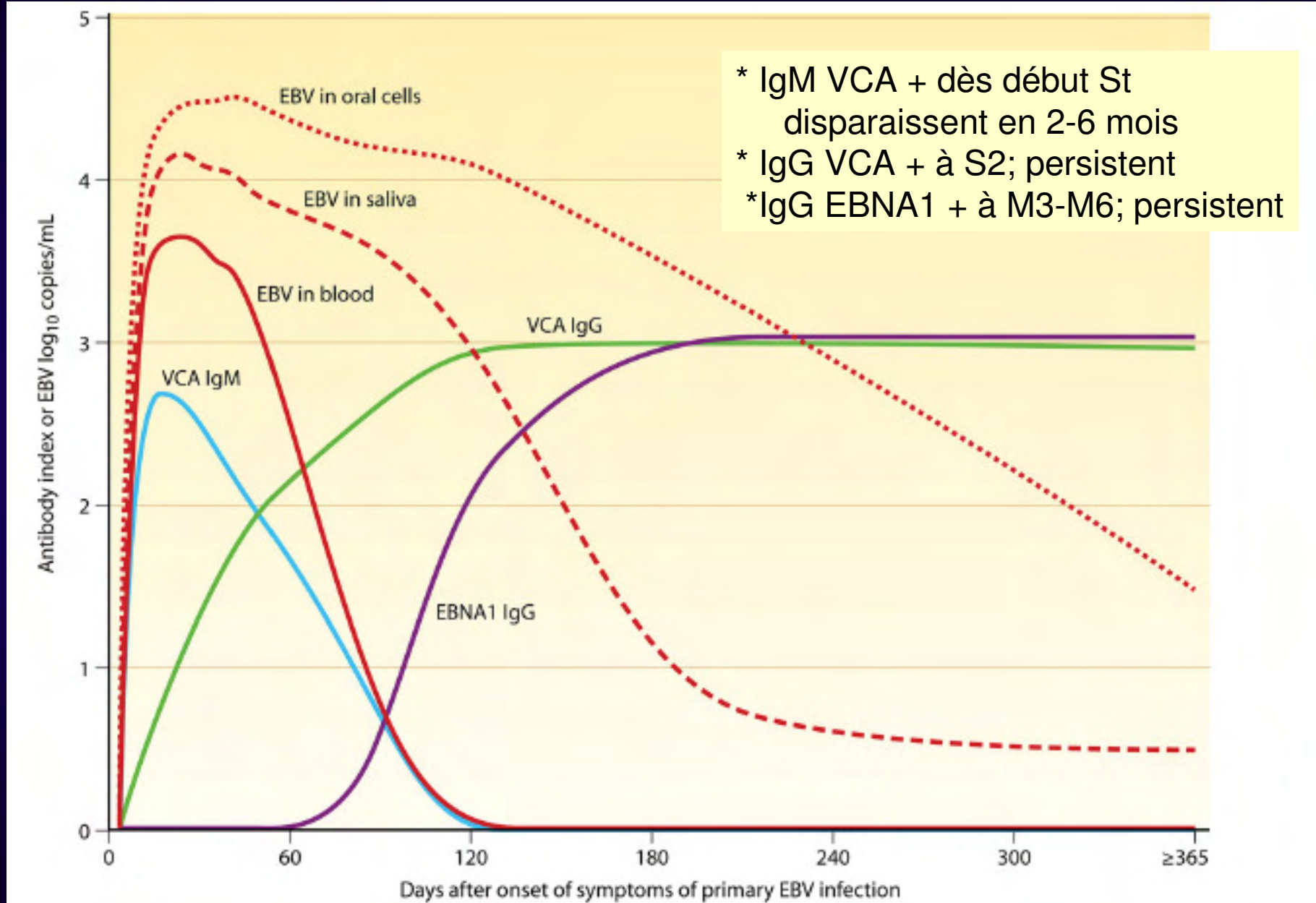
Ac anti protéines cycle **lytique (L, E, IE) puis** anti protéines **latence**

- 1) IgM, IgG : nucléocapside (anti-**VCA**), enveloppe
- 2) IgG : IE et E (anti-**EA**),
- 3) IgG : **EBNA** 1, 2

- Existence d'anticorps neutralisants : anti-gp350, anti-MA gp85
= apparition relativement tardive au cours de la primo-infection

- pas de contrôle sur la dissémination du virus

Cinétique d'évolution des Anticorps anti-EBV



La réponse CD8 en primo-infection

= *primo-infection* = maladie lymphoproliférative limitée dont symptômes associés à libération cytokines par LT CD8+ activés

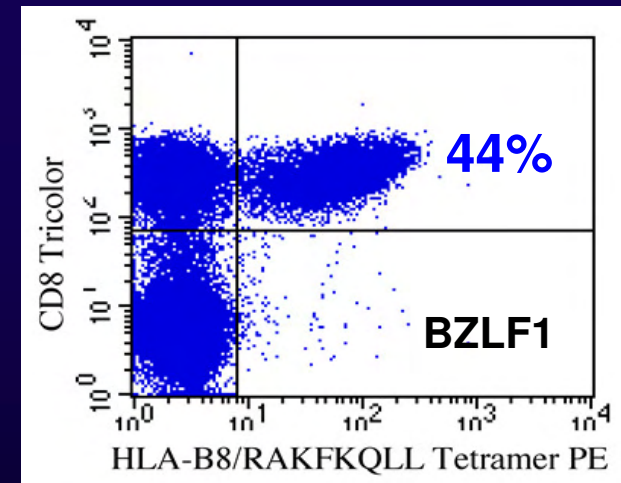
→ Expansion CD8 SPECIFIQUES de l'EBV +++

Jusqu'à 60% des cellules mononucléées circulantes = CD8 anti EBV

→ Expansion OLIGOCLONALE

= dirigée contre un nombre limité d'épitopes immunodominants

→ surtout = cellules CD8 spécifiques d'Ag du **cycle LYTIQUE**



(Callan et al 1998 J. Exp. Med.)

Réponse CD8 en primo-infection

```
graph TD; A[Réponse CD8 en primo-infection] --> B[Libération de facteurs cytotoxiques]; A --> C[Libération de facteurs solubles antiviraux]; B --> D[Lyse des cellules infectées]; C --> E[Inhibition de la réplication virale];
```

Libération de facteurs
cytotoxiques

(Perforine, granzymes)



Lyse des cellules infectées

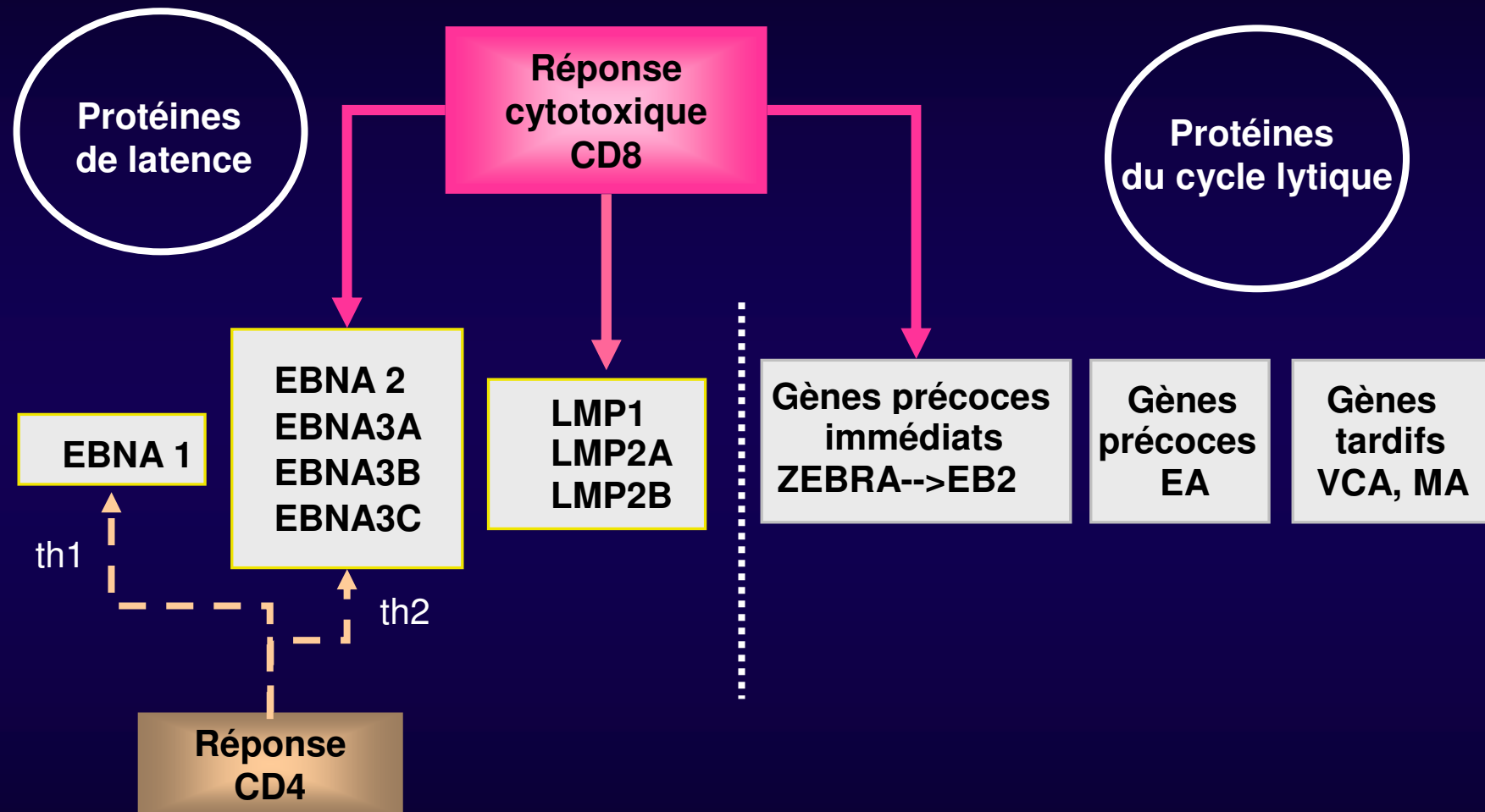
Libération de facteurs
solubles antiviraux

(ck: IFN-g, TNF- α
(chk: MIP1- α/β , RANTES)



Inhibition de la réplication virale

Réponse immunitaire spécifique cellulaire (CD8++)



EBNA1 : répétitions Gly/ala réduisent son processing et sa présentation dans contexte HLA I (=CD8)

Et pourtant persistance virale

3 conditions remplies

- 1) Le virus infecte la cellule sans la détruire**
- 2) Il maintient son génome dans la cellule**
- 3) Il échappe au système immunitaire : évasion immune**

Le virus maintient son génome dans la cellule

= épisomes viraux fixés au chromosome avec réplication simultanée des génomes viraux et cellulaires grâce à EBNA1

Le virus échappe au système immunitaire

← **Il ne se fait pas reconnaître** : expression restreinte Ag viraux : latence

← **Il empêche le bon fonctionnement de l'immunité**

= activité anti NK; anti CTL; anti-apoptose

*virokines et virorécepteurs → « immunoévasines »
(50 % des P codées par Herpesviridae)*

Différentes stratégies pour survivre dans LB

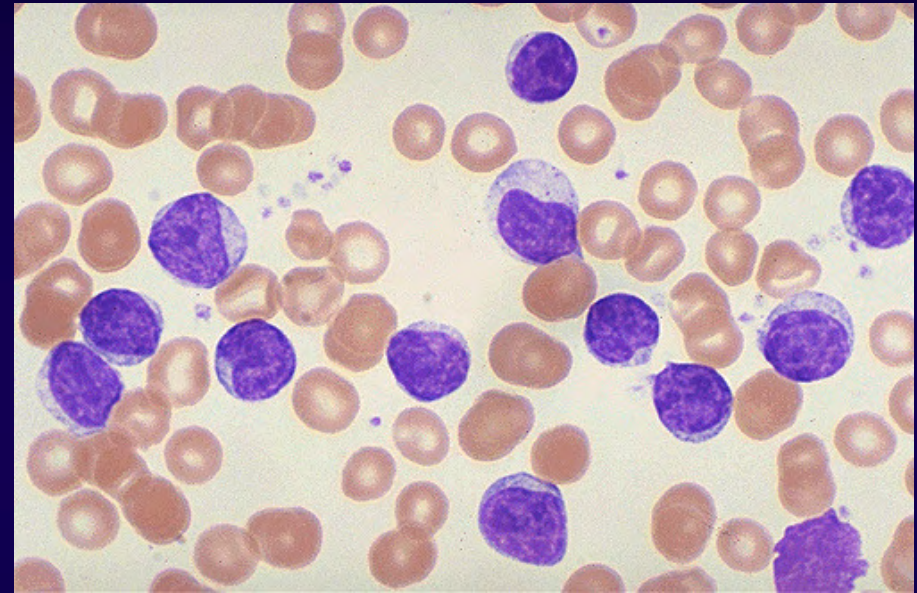
- 1) Persistance virale par activation de **réplication** dans quelques cellules infectées
- 2) Les protéines les + immunogènes = protéines de latence ne s'expriment pas
- 3) L'expression des protéines lytiques **interfère avec processing des Ag et présentation par HLA**
 - Production d'homologue de cytokine :
ex la virokinine vIL-10 (BCRF1) retient le CMH ds rétic endoplasmique
 - Downmodulation HLA I/II par # protéines (BNLF2A, BILF1, BGLF5)
- 4) Production de **signaux anti apoptotiques** (analogue Bcl2)

Les pathologies EBV induites

Pouvoir pathogène de l'EBV: lympho et épithélio-prolifération

	Primo-infection	Latence
Immuno compétent	<ul style="list-style-type: none">• Infections inapparentes• MNI +/- complications	<ul style="list-style-type: none">• Réactivations inapparentes• Lymphoproliférations B (et T)• Carcinomes (<i>épithélioma</i>)
Immuno déprimé	<ul style="list-style-type: none">• Syndrome de Purtilo	<ul style="list-style-type: none">• Lymphoproliférations B (et T)<ul style="list-style-type: none">- Post greffe : PTLD- Infection HIV- autres IS• Leucoplasie orale chevelue (HIV)• Léiomyosarcomes

Le virus EBV : la mononucléose infectieuse



Le syndrome mononucléosique

clinique

biologique

Primoinfection

- ▶ **Asymptomatique**
- ▶ **MNI**

Complications

- ▶ **atteintes neurologiques** centrales ou périphériques
(*Guillain Barré, paralysie faciale, myélite transverse, mononévrite, névrite optique, méningite, encéphalite, Sd cerebelleux*)
- ▶ **foie** : cytolysse hépatique, ictère, hépatite fulminante
- ▶ **poumon** : pneumopathie interstitielle;
- ▶ **rate** : rupture rate, infarctus splénique,
- ▶ **lignées sg** : thrombopénie, anémie hémolytique,
- ▶ **rein** : hématurie, néphrite interstitielle,
- ▶ **cœur** : myocardite, péricardite, arythmie
- ▶ **Syndrome activation macrophagique**

Primoinfection

Syndrome activation macrophagique

Plutôt dire « syndrome d'activation lympho-histiocytaire » (SALH)
« Lymphohistiocytose hémophagocytaire » (HLH)

Physiopathologie :

= déficit activité cytolytique NK et CTL (perforine/granzyme)
→ activation persistante lymphocytes et histiocytes
→ réponse inflammatoire +++

→ défaillance multiviscérale et hémodynamique avec hémophagocytose

Histiocyte Society 2004

Panel 2: Diagnostic guidelines for haemophagocytic syndrome

The diagnosis of haemophagocytic syndrome is established by fulfilling one of the following criteria:

- 1 A molecular diagnosis consistent with haemophagocytic syndrome (eg, PRF mutations, SAP mutations, MUNC13-4 mutations)
- 2 Having five out of eight of the following
 - Fever
 - Splenomegaly
 - Cytopenia (affecting more than two cell lineages, haemoglobin ≤ 9 g/dL, $<100\,000$ platelets per μL , neutrophils <1000 cells per μL)
 - Hypertriglyceridaemia (triglycerides ≥ 265 mg/dL) and/or hypofibrinogenaemia (fibrinogen ≤ 150 mg/dL)
 - Haemophagocytosis in the bone marrow, spleen, or lymph nodes without evidence of malignancy
 - Low or absent natural killer cell cytotoxicity
 - Hyperferritinaemia (ferritin ≥ 500 ng/mL)
 - Elevated soluble CD25 (interleukin-2R α chain ≥ 2400 IU/mL)

5/8 parmi :

- **Fièvre**
- **SMG**
- **Cytopénie (≥ 2):**
 - Hb ≤ 9
 - plaq < 100.000
 - PNN < 1000
- **Hyper TG $\geq 2,65$ g/l et/ou hypofibrinogène $< 1,5$ g/l**
- **Hyperferritinémie ≥ 500 ng/ml**
- **Hémophagocytose**
- **↘ activité NK**
- **↗ CD25s**

EBV

- 3/4 SAM enfant
- IC/ID
- MNI
- lymphoprolif
- mortalité 50-75%

Panel 1: Haemophagocytic syndrome classification

Primary or genetic haemophagocytic syndrome

- * Familial haemophagocytic lymphohistiocytosis
- * Immune deficiency syndromes
 - Chediak-Higashi syndrome
 - Griscelli syndrome
 - X-linked lymphoproliferative syndrome
 - Wiskott-Aldrich syndrome
 - Severe combined immunodeficiency
 - Lysinuric protein intolerance
 - Hermansky-Pudlak syndrome

Secondary or reactive haemophagocytic syndrome

- * Infection associated haemophagocytic syndrome
 - Virus-associated haemophagocytic syndrome
 - Herpes virus infection (herpes simplex virus, varicella zoster virus, cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, human herpesvirus 6, human herpesvirus 8)
 - HIV
 - Other viruses: adenovirus, hepatitis viruses, parvovirus, influenza
 - Other infections associated with haemophagocytic syndrome
 - Bacteria including mycobacteria and spirochaetes
 - Parasites
 - Fungi
- * Malignancy-associated haemophagocytic lymphohistiocytosis (especially lymphoma-associated haemophagocytic lymphohistiocytosis)
- * Macrophage activation syndrome (associated with autoimmune diseases)

**primaires
ou génétiques**
(familial / DI)

**secondaires
(acquis) :**

- infections (virales)
- hémopathies malignes
- maladie de système :
lupus, Still...

*N.Rouphael
Lancet inf Dis 2007*

Traitement des SAM

- **traitement étiologique**

- *ttt infection*
- *chimio*
- *anti-IL2-R α ; anti CD20 ;*

- **dexamethasone, cyclosporine, étoposide** (VP 16 :150 mg/m² IV) (Ig IV)

à donner le plus tôt possible

- **greffe de moëlle**

Primoinfection

► Infection chronique active à EBV (CAEBV) :

- fièvre, adp, HSMG > 6 mois
- hépatite, SMG, pneumopathie interstitielle, hypoplasie médull
- mortalité élevée par insuff hépatique, sepsis, SAM, lymphoprolif B/T/NK
- absence Ac anti EBNA; ADN EBV élevée
- *ttt = greffe moëlle / immunothérapie adoptive (CTL)*

Complications chez ID

► Lymphoproliférations post greffe (PTLD)

- **Syndrome de Purtillo** (XLP) = lymphoprolifération liée à l'X;
 - forme fatale de MNI
(nécrose hépatique due à infiltration CTL et libération ck; hémophagocytose
 - mutation gène codant prot SAP (exprimée par LT et NK qd activation cell)
 - déficit SAP → activation T incontrôlée + libé ck +++++
 - *ttt = étoposide / greffe moëlle*

Latence

- Lymphoproliférations

▶ Lymphoproliférations B

- Lymphome de Burkitt (15-95%)
- Lymphome de Hodgkin
- Lymphome malin non Hodgkinien (10-80%)
- PTLD (>95% 1^o année)
- Lymphome cérébral primitif (>95%)
- Lymphome des séreuses (>90%)
- Lymphome B angioimmunoblastique (>80%)

▶ Lymphoprolifération T/NK

- Lymphome nasal T/NK (>95%)
- Leucémie lymphome agressive NK (30-60%)
- Lymphome T angioimmunoblastique (>80%)

- Epithélioproliférations

- Carcinome nasopharyngé (CNP) (*Chine; Asie S-E*)
- +/- carcinome gastrique, thymus, amygd, poumon, sein, peau ...

Translocation chromosomique impliquant le locus des Ig à l'origine de nombreux lymphomes B

Table 2 | **Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis**

Lymphoma	Chromosomal translocations	Tumour-suppressor gene mutations	Viruses	Other alterations
Mantle-cell lymphoma	<i>CCND1-IgH</i> (95) ¹⁰⁷	<i>ATM</i> (40) ^{108,109}		Deletion on 13q14 (50–70) ^{110*}
B-cell chronic lymphocytic leukaemia	–	<i>ATM</i> (30) ^{111,112} , <i>TP53</i> (15) ¹¹³	–	Deletion on 13q14 (60) ^{114*}
Follicular lymphoma	<i>BCL2-IgH</i> (90) ^{12–14}	–	–	–
Diffuse large B-cell lymphoma	<i>BCL6</i> –various (35) ^{115,116} , <i>BCL2-IgH</i> (15–30) ¹¹⁷ , <i>MYC-IgH</i> or <i>MYC-IgL</i> (15) ¹¹⁸	<i>CD95</i> (10–20) ²⁵ , <i>ATM</i> (15) ¹¹⁹ , <i>TP53</i> (25) ^{120,121}	–	Aberrant hypermutation of multiple proto-oncogenes (50) ¹⁸
Primary mediastinal B-cell lymphoma	–	<i>SOCS1</i> (40) ¹²²	–	Aberrant hypermutation of multiple proto-oncogenes (70) ¹²³
Burkitt's lymphoma	<i>MYC-IgH</i> or <i>MYC-IgL</i> (100) ^{124,125}	<i>TP53</i> (40) ¹¹³ , <i>RB2</i> (20–80) ¹²⁶	EBV (endemic, 95; sporadic, 30) ²⁸	–
Post-transplant lymphomas	–	–	EBV (90) ²⁸	–
Classical Hodgkin's lymphoma	–	<i>IKBA</i> (10–20) ^{127–129} , <i>IKBE</i> (10) ¹³⁰ , <i>CD95</i> (<10) ¹³¹	EBV (40) ²⁸	<i>REL</i> amplifications (50) ¹³²
Lymphocyte-predominant Hodgkin's lymphoma	<i>BCL6</i> –various (48) ¹³³	–	–	–
Splenic marginal-zone lymphoma	–	–	–	Deletion on 7q22–36 (40) ^{134*}
MALT lymphoma	<i>API2-MALT1</i> (30) ¹³⁵ , <i>BCL10-IgH</i> (5) ^{136,137} , <i>MALT1-IgH</i> (15–20) ¹³⁸ , <i>FOXP1-IgH</i> (10) ¹³⁹	<i>CD95</i> (5–80) ^{25,140,141†}	Indirect role of <i>Helicobacter pylori</i> in gastric MALT lymphomas ⁸⁵	–
Lymphoplasmacytoid lymphoma	<i>PAX5-IgH</i> (50) ¹⁴²	–	–	–
Primary effusion lymphoma	–	–	HHV8 (95) ¹⁴³ , EBV (70) ²⁸	–
Multiple myeloma	<i>CCND1-IgH</i> (15–20) ¹⁴⁴ , <i>FGFR3-IgH</i> (10) ¹⁴⁵ , <i>MAF-IgH</i> (5–10) ¹⁴⁶	<i>CD95</i> (10) ¹⁴⁷	–	Various <i>MYC</i> alterations (40) ¹⁴⁸ , <i>RAS</i> mutations (40) ¹⁴⁹ , deletion on 13q14 (50) ^{150*}

EBV - Association controversée

- Arthrite rhumatoïde
- Lupus erythémateux disséminé
- Sclérose en plaques
- Cancer mammaire
- Syndrome de fatigue chronique

Les lymphoproliférations post greffe

(post transplant lymphoproliferative disorder)

(PTLD)

Les lymphoproliférations post greffe (PTLD)

- ▶ lymphoprolifération B lié à un déficit T (CTL)
- ▶ 60-95% EBV-induit (>95% dans 1^o année)
- ▶ surviennent lors d'une infection primaire ou d'une réactivation
= 1 semaine à 9 ans après transplantation (50% mortalité)
moelle = 3 - 6 mois (90% décès) = LB du donneur jusqu'à M6
organe = 6 - 12 mois (40-70% décès) = LB du receveur
- ▶ diagnostic difficile (mime rejet greffe; GVHD; infection)
- ▶ groupe hétérogène de lymphoprolif (hyperplasie polyclonale → LMNH agressif)

Les lymphoproliférations post greffe (PTLD)

Table 1. PTLD histologic classification (WHO classification 2008)

Category	Clonal status	EBV status
"Early" lesions		
Plasmacytic hyperplasia, infectious mononucleosis-like lesion	Polyclonal	Always EBV+
Polymorphic PTLD	Monoclonal	Always EBV+
Monomorphic		
B-cell lymphomas (DLCL, Burkitt, plasma cell myeloma, Plasmacytoma-like lesions)	Monoclonal	Frequently EBV+
T-cell lymphoma (peripheral T-cell lymphoma, hepatosplenic)		Rarely EBV+
Classic Hodgkin lymphoma-like PTLD	Monoclonal	Frequently EBV+

Data from Swerdlow et al.¹⁰

Les lymphoproliférations post greffe (PTLD)

- incidence = 10% des transplantés (1- 30%) et dépend de # facteurs :

←organe : intestin = 30% > poumon = cœur > foie = rein (1-9%)

moelle: autogreffe 1-2%; allogreffe déplétée en LT = 24%

Registre greffés rénaux ; étude sur 6 ans; S.Caillard (Am J Transplant 2006)

Incidence : 1ère année = 0,46 % pers/an; 1,2% de PTLD à 5 ans

60% survie à 5 ans (PTLD greffon : 81% survie à 5 ans; PTLD cérébral = 53%)

← type durée et intensité IS (déplétion T ↗ risque : SAL, OKT3)

← statut immunitaire D/R (D+/ R- → primo-infection: risque PTLD x 70)

**EBV et
infection HIV**

EBV et infection HIV

▶ **Leucoplasie chevelue de la langue** : réplication virale

▶ **Pneumopathie lymphoïde interstitielle** : stt enfants;
infiltrats interstitiels diffus

▶ **LMNH** :

- Risque chez HIV+ = 60 fois > pop générale
- 50-60% sont EBV+;
- **lymphomes immunoblastiques** (*SIDA sans réarrangt c-myc*)
- **lymphome de Burkitt** (*sans DI sévère; avec réarrangt c-myc*)
- **rare lymphome à grandes cellules**
- **lymphome cérébral primitif** (*> 95% EBV+*); *svt immunoblastique avec DI sévère; intérêt PCR EBV LCR ?*
- **lymphome des séreuses HHV8+**
- **Leiomyosarcomes** (tube dig; génito-urin)



Lymphome de Burkitt

Tsuchiya; Clin Rev Onco/Hemato 2002
God et Haque; J Oncology 2010

Lymphome de Burkitt

- = LB CD19+ CD20+ CD21+ Igs+ (origine = centre germinatif)
- haut grade de malignité; temps de doublement des tumeurs le + élevé

3 types : endémique ; sporadique ; associé au HIV

- **endémique** : os face (machoïre) ; 4-7 ans;
95% associé à EBV;
intérêt prévention palu qui diminue incidence eBL
- **sporadique** : estomac; tractus respir sup (anneau waldeyer); 30 ans;
15% (à 88%) EBV+
- **associé au SIDA** : ganglions et moëlle osseuse; 40% EBV+
- 20% des LMNH des pts HIV+ = BL
- HIV+ = 200 à 1000 x + de risque de dév BL

translocation chromosomique entre locus de c-myc (chr 8) et locus de chaîne lourde ou légère Ig : t(8;14)= 80%; t(8;22); t(2;8)

→ dérégulation et expression constitutive de c-myc → prolifération incontrôlée

latence I (EBNA1, EBER1/2)

*Tsuchiya; Clin Rev Onco/Hemato 2002
God et Haque; J Oncology 2010*

**Maladie
de
Hodgkin**

Maladie de Hodgkin

- 40 à 65% EBV+
- présence EBV variable selon type histol; âge (jeunes); pays (PVD); statut immunit (HIV+)
- **Clinique** : fièvre; sueurs nocturnes; fatigue, perte poids, prurit; adp; HMG +/- SMG
- **Sérologie** : titres élevés Ac anti VCA avant lymphome
- **Anapath** : cellules géantes de Reed-Sternberg + réaction inflammatoire
- 4 types histologiques
 - 1) *sclérose nodul (EBV+/-)*
 - 2) *cellularité mixte (EBV++)*
 - 3) *à déplétion lymphocytaire (EBV+/-)*
 - 4) *à prédominanc lymphocytaire (EBV-)*
- latence II : EBNA1, LMP1 et 2

Le diagnostic biologique de l'infection EBV

Le diagnostic de l'infection EBV

Diagnostic direct
par mise en évidence
de l'agent infectieux

Diagnostic indirect
par titrage des anticorps
sériques

Isolement
viral sur
culture
cellulaire

Diagnostic
moléculaire

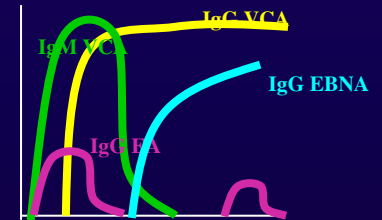
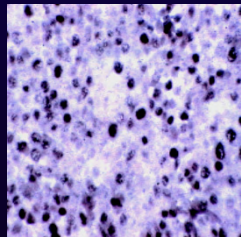
Immunohistochimie
(m.e.e. prot lyt ou lat)

Sérologie

Hybridation
in situ (Eber)

PCR
qualitative

PCR
quantitative



Intérêt des techniques d'hybridation in situ et d'immunohistochimie

- définir si la tumeur est associée à l'EBV**
- préciser la latence**
- préciser la réactivation**

***LNH ou maladie de Hodgkin associé à l'EBV
= pronostic de survie meilleur***

**Le diagnostic direct :
Le diagnostic moléculaire**

**PCR
qualitative**

**PCR
Quantitative**

supprimer dogme:

« présence ADN EBV dans LCR = lymphome cérébral »

Brink, Sharvell, Howard, et al

Table 1 Correlation between CSF polymerase chain reaction (PCR) results for the detection of Epstein-Barr virus (EBV) and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) DNA and clinical manifestations in 115 patients infected with HIV

Diagnosis	Patients (n)	EBV DNA in CSF (supernatant)		KSHV DNA in CSF (pellet)	
		Detected	Not Detected	Detected	Not Detected
Lymphoma:					
Cerebral	7	7	0	0	5
Cerebral and systemic	2	2	0	0	1
Systemic	10	0	10	1	6
Total	19	9	10	1	12
Other neurological conditions:					
→ HADC	27	1	26	0	9
→ Cryptococcal meningitis	17	0	17	0	1
→ CMV encephalitis (one also had CMV polyradiculopathy)	13	2	11	0	3
→ CMV retinitis (two also had CMV polyradiculopathy)	7	3	4	1	2
→ Self limiting headache	6	1	5	0	3
→ Toxoplasmosis	3	1	2	0	1
Mononeuritis multiplex	2	0	2	0	0
Transient ischaemic attack	2	0	2	0	0
Sepsis, or confusional state	2	0	2	0	1
Isolated cranial nerve palsy	2	0	2	0	0
Acute retinal necrosis	2	0	2	0	0
→ Disseminated MAI infection	2	0	2	0	0
→ TB meningitis	1	1	0	0	1
Myelopathy	1	0	1	0	1
Miscellaneous conditions	9	0	9	0	0
Total	96	9	87	1	22

HADC = HIV associated dementia complex; CMV = cytomegalovirus; MAI = *Mycobacterium avium-intracellulare*; TB = *Mycobacterium tuberculosis*.

Miscellaneous conditions includes a single case each of sinusitis, prolapsed intervertebral disc, postviral encephalitis, idiopathic epilepsy, viral encephalitis (aetiology undetermined), disseminated Hodgkin's disease, disseminated extraneural cryptococcosis, and cerebellar astrocytoma.

La charge virale EBV

**Site de latence de l'EBV dans le sang périphérique
= lymphocyte B mémoire (CD27+)**

**chez le sujet sain EBV+
= 1 à 50 copies d'EBV / 10⁶ lymphocytes B**

**⇒ ADN de l' EBV (« charge virale EBV »)
souvent non quantifiable
en périphérie (30 à 70% !)**

Technique de quantification de l'ADN de l'EBV = PCR en temps réel...

→ rapide, sécurité d'emploi; kits commerciaux ... mais coût appareils

Différents prélèvements *cellules mononucléées, sérum, plasma, sang total...*

Différentes techniques *techniques « maison », trousse commercialisées*

← extraction *(manuelle, automatique)*

← gammes *(plasmidiques, cellulaires, gamme commercialisée)*

← chimie *(sondes hydrolyse, hybridation, beacon, ...)*

← contrôle *(contrôle interne (ctl extr et ampl); gène cellulaire)*

Différents appareils *(lightcycler, Abiprism; Rotor gene)*

Différentes unités *cop/ml sang; / μ g ADN; /M PBMC*

Différentes seuils d'intervention



Pas de technique consensus possible...

⇒ *garder la même technique*

Pour info : 1 μ g d'ADN dans 150.000 cellules

Attention à l'interprétation des résultats Intérêt de la valeur de base



Quantification Herpesvirus chez donneurs sang (Hudnall; Transfusion 2008)

- ◆ 100 donneurs de sang randomisés (Texas); RT nested PCR à partir de sang total
- ◆ **94% positifs pour au moins 1 virus ;**
- ◆ **17% positifs pour 3 virus (16 EBV + HHV-6 + HHV-7)**

Détection ADN:

HSV-1, HSV-2, VZV et HHV-8 : 0% des cas

EBV : 72% des cas (autres études = 5-88 %...)

HHV-7 : 65% des cas (autre étude = 87 %...)

HHV-6 : 30% des cas (type B) (autres études = 5-36 %...)

CMV : 1% des cas (autres études = 0 à 33 %...)

QEBV

et greffes

EBV et greffes

➤ **QEBV - prédictive d'évolution vers PTLD**
- indication d'un traitement anticipé

- intérêt du suivi longitudinal
- aide au diagnostic
- peut même précéder signes cliniques (3 semaines)
- seuils à définir ...

EBV et greffes

Intérêt surveillance traitement :
↘ QEBV (ttt anticipé ou curatif)

- possible ré-ascension QEBV sans PTLD
- possible QEBV indétectable et PTLD



*attention : lymphocytes EBV+ sang périph CD20+ sensibles au rituximab;
mais cellules tumorales responsables de PTLD pas forcément CD20+
⇒ continuer à surveiller*

QEBV

et infection HIV

Early Impairment of CD8⁺ T Cells Immune Response Against Epstein-Barr Virus (EBV) Antigens Associated with High Level of Circulating Mononuclear EBV DNA Load in HIV Infection

JÉRÔME LEGOFF,^{1,6} CORINNE AMIEL,² OLIVIER CALISONNI,³ DELPHINE FROMENTIN,³ BAKOLIARISOA RAJOELY,⁴ NISEN ABUAF,⁴ ERIC TARTOUR,⁵ WILLY ROZENBAUM,² LAURENT BÉLEC,¹ and JEAN-CLAUDE NICOLAS³

↘ intensité réponse CTL

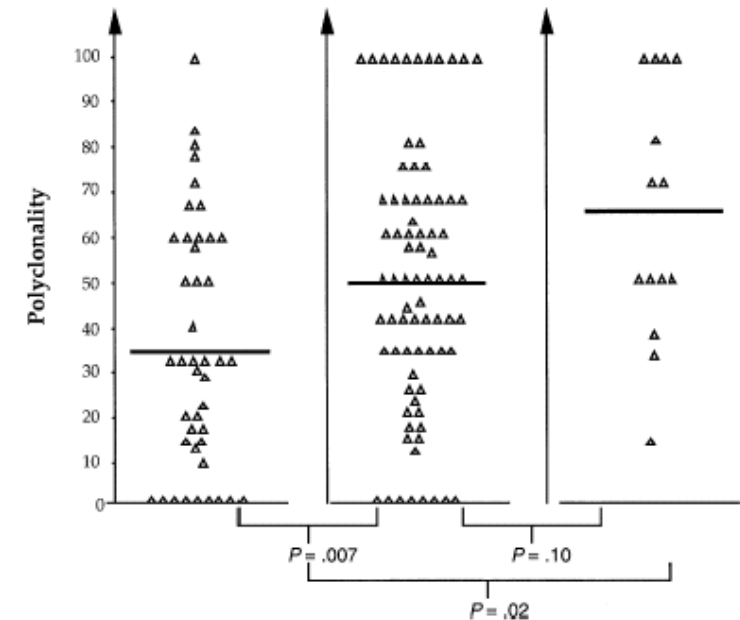
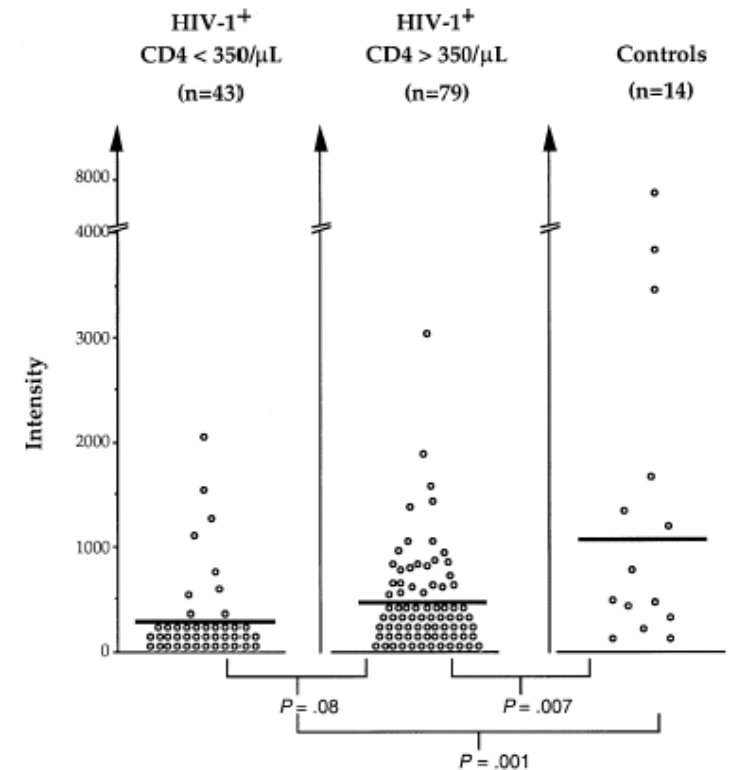
↘ diversité réponse CTL

réponse CTL
Ag lytique > Ag latence

Corrélation inverse
entre CTL et ADN

↓
Infection HIV :

possible réactivation de l'EBV
et perte contrôle par CTL



J Acquir Immune Defic Syndr • Volume 50, Number 4, April 1, 2009

Epstein-Barr Virus Load
in Whole Blood
Correlates With HIV
Surrogate Markers and
Lymphoma: A French
National
Cross-Sectional Study

Corinne Amiel, MD PhD*
Jérôme LeGoff, PharmD, PhD†
François Xavier Lescure, MD‡
Marianne Coste-Burel, MD§
Claire Deback, MD||
Samira Fafi-Kremer, PharmD, PhD¶
Marie Gueudin, PharmD, PhD#
Marie-Edith Lafon, MD, PhD**
Marianne Leruez-Ville, MD, PhD††
Catherine Mengelle, PharmD‡‡
Christopher Payan, PhD§§
Sylvie Pillet, PharmD, PhD|||
Jean-Marie Seigneurin, MD, PhD¶¶
for the French Agence Nationale de
Recherche sur le SIDA et les Hépatites
AC11-EBV Study Group

Etude transversale multicentrique (ANRS)

12 laboratoires → QEBV dans sang total et plasma (PCR en temps réel)

- ◆ Evaluer intérêt de la charge virale EBV dans le plasma
- ◆ Etudier corrélation avec CD4 et ARN plasmatique HIV
- ◆ QEBV = marqueur prédictif de lymphoprolifération ?

TABLE 1. Frequency of Detection and Levels of EBV DNA Loads in Whole Blood and Plasma from HIV-1–Infected Adults, According to the CD4⁺ Lymphocyte Count

	Total	CD4 Lymphocyte		P
		>200/mm ³	<200/mm ³	
No. patients	582	369	213	—
Whole blood				
<u>No. positive samples (%)</u>	380 (65.5)	225 (61.2)	155 (72.8)	0.03
<u>EBV DNA load in positive samples</u>	3.54	3.41	3.69	< 0.001
Range	1.30–6.48	1.30–6.22	1.79–6.48	—
Plasma				
No. positive samples (%)	28 (4.8)	14 (3.8)	14 (6.6)	0.09
EBV DNA load in positive samples	2.57	2.61	2.35	0.215
Range	1.18–3.73	1.92–3.40	1.18–3.73	—

The EBV DNA loads are the medians for positive samples and are expressed in log₁₀ copies per milliliter.

- Faible intérêt de la charge virale plasmatique
- ADN EBV + souvent détectable et + élevé chez patients < 200 CD4
- **QEBV dans sang total corrélée à CVp-HIV et taux CD4 (p < 0,001)**
- QEBV lymphome > QEBV sans lymphome (p=0.005) (3 lymphomes !)
- QEBV élevées sans lymphoprolifération connue (surtout < 200 CD4)

QEBV

et autres compartiments que le sang

Quelques exemples

QEBV dans le LCR (copies/ml)	LCR	sang total
cryptococcose NM	2 809	7850
BK méningée +/- pulm	449	12 256
zona thoracique, encéphalite HIV	2 479	36 933
lymphome cérébral HIV	923	8 209
lymphome cérébral HIV	16 619	7540
lymphome cérébral HIV	189 043	1 643

QEBV dans d'autres sites	autre site	sang total
Liquide d'ascite (cirrhose et lymphome)	42 505 070	111 207
Liquide pleural (lymphome des séreuses)	2 818 722	771
Liquide pleural (hyperlymphocytose CD8 HIV)	619 388	4 211 724
plasma MNI J0	1 092	140 326
plasma MNI J17	254	200

Charge virale EBV ... indications au labo ...

- ▶ **Mononucléose infectieuse** (ST/plasma)
- ▶ **Recherche lymphoprolifération**: patients immunodéprimés ++
 - ← Greffés (PTLD) ... rein ; moelle
 - ← hémopathies +/- chimiothérapie
 - ← HIV
 - ← autres ID chimio-induites (patho inflamm intest et rhum)
- ▶ **Syndrome d'activation macrophagique**
- ▶ **Carcinomes naso-pharyngés**

EBV et traitements

- Antiviraux
- Immunothérapie

•K.Straathof; *The oncologist* 2003; 8:83-98

•J.Kohen; *N.Engl.J.Med* 2000; 343 (7): 481-92

•AW Loren; *Bone Marrow Transplantation* 2003; 31: 145-55

Les antiviraux efficaces sur l'EBV

Acyclovir, Ganciclovir, Foscarnet

(GCV 8 x + puissant qu'ACV in vitro + anti-CMV)

→ inhibent ADN polymerase

OUI MAIS ...

efficace si réplication virale ...

or patho EBV = prolifération cellulaire ...

Nécessité études randomisées multicentriques...

EBV et antiviraux

la MNI

- = **réplication virale**
- **Essais avec (val)acyclovir +/- corticoïdes**
- réduit charge virale dans cavité buccale; pas dans sang
- Effet modeste sur symptomatologie À poursuivre ...

La leucoplasie chevelue de la langue

- = **réplication virale**
- **efficacité reconnue de l'ACV;**
- mais intérêt ???; et ne se voit plus...

EBV et antiviraux

Les pathologies lymphoprolifératives

- **Pas de réplication donc peu d'utilité des antiviraux**

Toujours sujet controversé

Quelques publications de traitement préventif par ACV ou GCV dans greffes (moelle)

- **Chez HIV+ : intérêt surtout = restauration immune sous antirétroviraux (HAART)**

- *Essais avec arginine butyrate : induction expression TK (latence → lytique) puis ttt par ganciclovir ...*

**EBV
et
immunothérapie**

Traitement des PTLD

→ Traitement portant sur les cellules T

- **diminuer l'immunosuppression**
- **immunothérapie adoptive : transfert de CTL**

→ Traitement portant sur les cellules B

- **Rituximab (anti CD20)**
- **Chimiothérapie - à faible dose (CP +/- anti CD20)**
 - **cytotoxique (CHOP)**
- **Chirurgie** (complications : hémorrh; compression)
- **Radiothérapie** (PTLD SNC)

Ac anti cellules B

- Attention car expression variable des différents Ag sur cellules B
- Pour PTLD : mauvais pronostic si patho multiviscérale, apparition tardive (> 1 an), atteinte SNC
- Initialement Ac murins : anti-CD21 (rct EBV); anti-CD24 (pan B)
- Actuellement Ac chimérique **murin/humain**:
 - Ac anti CD-20 (rituximab – MabThera*)**
 - intérêt en curatif et préemptif (pour PTLD)
 - bonne tolérance
 - intérêt quantification EBV

Immunothérapie cellulaire ou adoptive : Le transfert de CTL

Intérêt prouvé surtout chez greffés après déplétion T ou greffe HLA-mismatched

► **Expansion ex vivo de CTL spécifiques de l'EBV**

- 1) CTL donneur dans PTLD post greffe moëlle (cellules donneur)
- 2) CTL autologues dans PTLD post greffe organe (cellules receveur)
- 3) *en cours* : Banque de CTL allogéniques partiellement matchés HLA

Essais en cours : PBMC stimulés par cellules dendritiques pulsées par lysats de cellules infectées irradiées ou peptides EBV avec IL-12, IL15 ,

Ac anti LB versus CTL EBV spécifiques

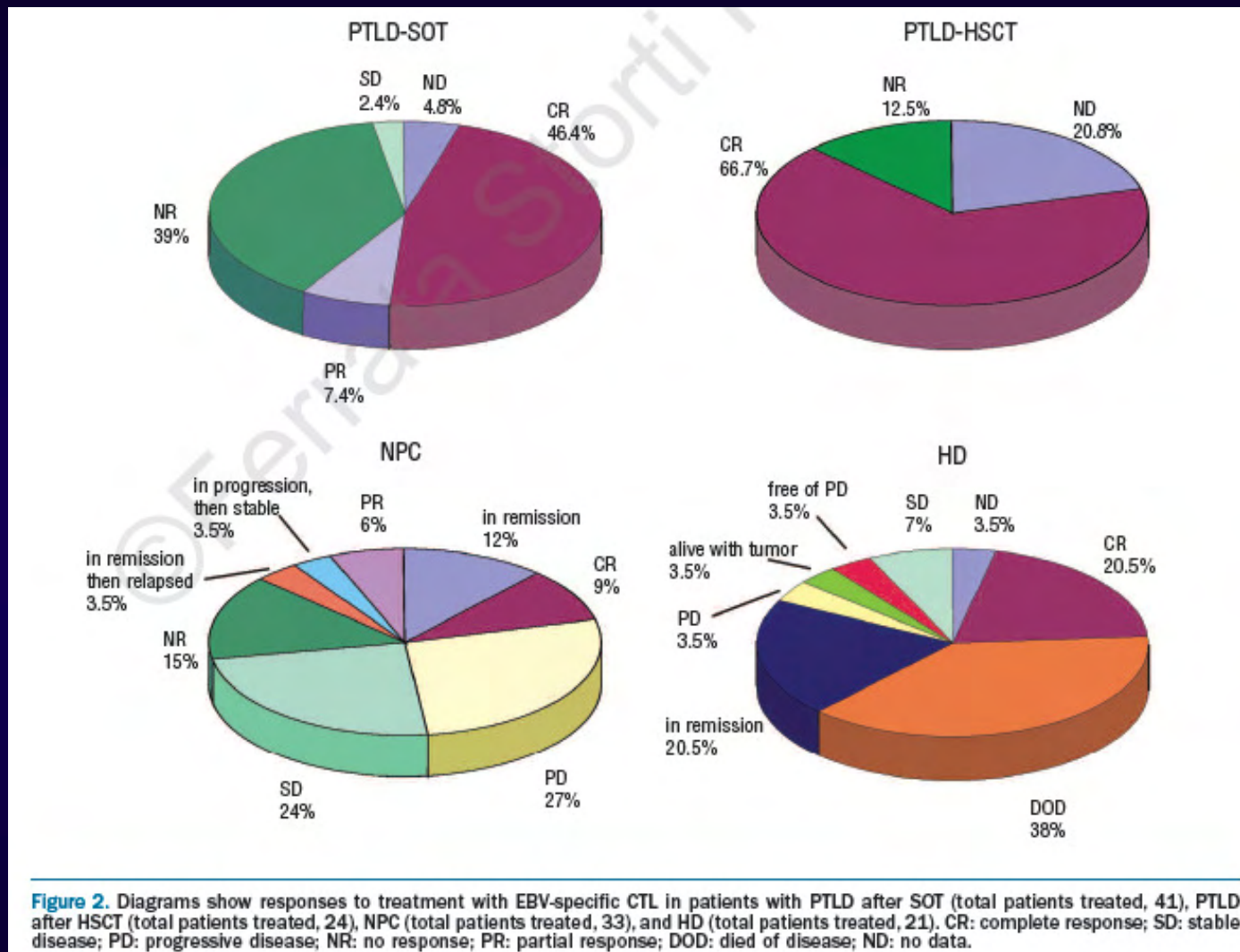
- Inconvénients du Rituximab

- profonde déplétion B augmente le DI
- tumeurs avec expression hétérogène de CD20 : risque sélection cellules proliférantes CD20-
- retarderait immunité anti-EBV (pas d'exposition T aux cellules B infectées)
- concentration locale (en particulier SNC) suffisante ?

- Inconvénients du Transfert de CTL

- Serait plus sûr en prophylaxie ou en curatif de maladie **minime**
- Nécessite 2-3 mois de « fabrication »

Traitement des PTLD



Traitement de la maladie de Hodgkin

- Survie 90% stades précoces à 5 ans; 60-85% stades tardifs
- Sur les 10-15% qui échappent seuls 50% entreront en rémission

- ▶ **Chimiothérapie (ABVD); radiothérapie**

- ▶ **greffe moëlle autologue**

- ▶ **CTL (– efficace)** ← latence 2 (peu d'Ag exprimé)

← sécrétion par tumeur de ck (TGF β , IL10, IL13) immunosuppressives et qui orientent vers profil Th2

- ▶ **Ac anti CD20 (rituximab)** *en cours d'essai*

- ▶ **Ac anti CD30 + antitubuline** (*brentuximab vedotin; en phase 1; Younes NEJM 2010*)

- ▶ **Inhibiteurs histone déacétylases**

.....

Carcinome nasopharyngé

Radiothérapie; chimiothérapie; CTL - efficaces

Lymphome de Burkitt

- **chimiothérapie**
- **pb CTL** car pas d'expression des Ag de latence sauf EBNA1 lequel est reconnu par CD4 et non CD8 : CTL CD4+?

Infection HIV

- **Restaurer l'immunité (ARV) + +**
- traitement id autres ID; essais avec anti-CD20, CTL ...

Vaccination anti EBV

- **virus de la vaccine exprimant gp350**
- **vaccin polyépitopique**
 - = vaccin adénovirus ou poxvirus codant pls épitopes LPM1 et LMP2 :
réponse CTL forte et spécifique
 - *Très encourageant in vitro et chez souris*
 - *Intérêt dans CNP et Hodgkin (expriment EBNA1 et LMP1-2)*
 - *Pb actuel : HLA restreint*

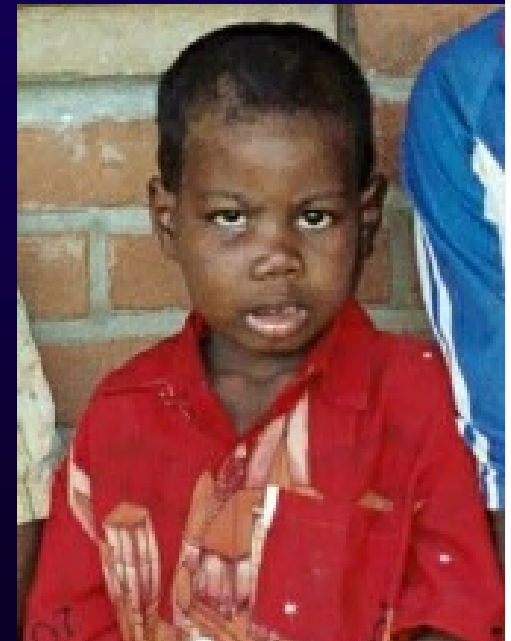
Conclusion

- **EBV \Rightarrow prolifération cellulaire plutôt que réplication virale**

Cible = Ag de latence (+/- lytique)

\Rightarrow Immunothérapie plutôt que antiviraux

- **Principe thérapeutique :**
 - diminuer le déficit immunitaire,
 - détruire les cellules proliférantes (anti CD20)
 - augmenter l'immunité spécifique (CTL)
- **Intérêt de la QEBV dans le suivi des patients**



FIN

