

2m11.2863.6

Université de Montréal

Étude de marqueurs pour le développement de la maladie lymphoproliférative (PTLD)
liée au virus Epstein-Barr (EBV) chez les transplantés
pédiatriques d'organes solides

Par

Linda Carpentier

Département de sciences biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès science (M.Sc.)
en **sciences biomédicales**

Août, 2000

© Linda Carpentier, 2000

Université de Montréal



W
4
U58
2001
v.073

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire est intitulé

Étude de marqueurs pour le développement de la maladie lymphoproliférative (PTLD)
liée au virus Epstein-Barr (EBV) chez les transplantés
pédiatriques d'organes solides

présenté par

Linda Carpentier

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Mémoire accepté le :

Sommaire

La maladie lymphoproliférative post-transplantation (PTLD) liée au virus Epstein-Barr (EBV) est une préoccupation majeure dans le milieu de la transplantation et tout particulièrement chez les transplantés pédiatriques puisqu'une infection primaire à EBV survenant dans les mois qui suivent une transplantation est un facteur de risque important pour le développement de cette maladie. Le diagnostic clinique de cette dernière est compliqué par le fait : 1- qu'il existe des similarités cliniques entre le rejet de l'organe transplanté et le PTLD et 2- qu'il existe un large spectre clinique d'une infection à l'EBV chez les transplantés pédiatriques (fièvre, malaise, diarrhée, pharyngite, adénopathies, splénomégalie, syndrome mononucléosique, atteintes du système nerveux central). C'est pourquoi il est important de définir des marqueurs fiables qui nous permettront de poser un diagnostic précis.

La détermination de la charge virale spécifique à EBV dans les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) est un bon marqueur prédictif négatif de la maladie, puisque lorsque la charge virale est basse ou non-déTECTABLE, le risque de PTLD est également très bas. Mais elle est beaucoup moins utile comme marqueur prédictif positif de la maladie, puisqu'avec une charge virale très élevée comparable, certains transplantés ont développé un PTLD alors que d'autres n'ont pas développé de PTLD. Ainsi, dans ce projet, la recherche des anticorps contre l'antigène précoce EA de l'EBV qui est un autre marqueur d'une infection active à EBV, a été étudiée en parallèle avec la charge virale EBV sanguine afin d'évaluer leur valeur combinée pour prédire le développement d'un PTLD.

Pour ce faire, nous avons sélectionné de façon rétrospective 26 transplantés pédiatriques d'organes solides (23 transplantés de foie, 2 de rein, 1 de cœur) qui ont été suivis du moment de la transplantation à en moyenne 15.1 mois [1.5 - 44.0 mois] suivant la transplantation. Ces patients devaient avoir présenté des charges virales élevées (≥ 1 copie de génome EBV / 1000 PBMC) au cours de leur suivi post-greffe puisque c'est dans ce contexte que nous voulions étudier le développement des anticorps EA. Les patients ont ensuite été divisés en trois groupes : 1) les patients avec une haute charge virale ayant développé un PTLD (n=6), 2) les patients avec une haute charge

iv) Établissement de l'infection latente et transformation du lymphocyte B infecté

Lorsqu'infecté de façon latente, le lymphocyte B va exprimer 6 différentes protéines nucléaires (ou EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C et LP), 3 différentes protéines intégrales de la membrane (LMP1, 2A et 2B) et 2 petits ARNs non-polyadénylés (EBER1 et 2). Les produits de ces gènes viraux maintiennent l'infection latente et induisent les lymphocytes B préalablement au repos à proliférer de façon continue. L'effet sur la prolifération cellulaire est immédiat et très efficace puisque la plupart des cellules infectées débutent leur synthèse d'ADN dans les 48 à 72 heures suivant l'infection.

Environ 10% des lymphocytes B infectés *in vitro* sont capables de proliférer indéfiniment en culture comme lignées cellulaires lymphoblastoïdes (ou LCL). Chez l'individu EBV-séropositif normal, on retrouve environ 1 à 50 lymphocytes B infectés de façon latente sur 10^6 lymphocytes isolés du sang périphérique (45). *In vitro*, ces lymphocytes B infectés de façon latente vont soit proliférer en LCL ou vont entrer dans le cycle lytique où les virus produits transformeront à leur tour les lymphocytes B non-infectés contenus dans la culture initiale.

Des deux différents variants d'EBV ayant été caractérisés à partir de polymorphismes alléliques impliquant les gènes codant pour les antigènes nucléaires EBNA-2, 3A, 3B et 3C, l'EBV de type 1 produit la protéine EBNA-2A qui lui confère un pouvoir immortalisant plus marqué que le type 2 qui exprime la protéine EBNA-2B. On observe également des différences de répartition des 2 types viraux en fonction des pathologies associées à EBV et en fonction de leur origine géographique.

L'expression des gènes de latence a d'abord été étudiée dans les cellules issues de lignées lymphomateuses BL ou de lignées lymphoblastoïdes (LCL pour lymphoblastoid cell line) à partir desquelles 3 types de latence ont été définies en fonction de l'éventail des protéines virales traduites (141) (figure 3).

Latence de type 1

Ce premier type de latence est défini par l'expression de l'antigène de latence EBNA1 et des transcrits EBERs. Cette forme de latence a été observée dans des lymphocytes B issus de biopsie provenant d'un lymphome de Burkitt (115). Cependant, les lignées cellulaires dérivées de ce type de lymphome ne sont pas stables *in vitro* et tendent avec le temps à exprimer toutes les protéines de latence caractéristiques de la latence de type 3.

Latence de type 2

La latence de type 2 est caractérisée par l'expression des transcrits de LMP1, LMP2A, LMP2B, EBNA1 et des EBERs en l'absence des autres EBNA. Ce type de latence a été observé chez des cellules provenant de carcinomes nasopharyngés (CN) (115, 127, 274), de lymphomes de Hodgkin (LH) (17, 47, 90, 175) et de lymphomes de cellules T/NK (85, 106, 239).

Latence de type 3

Ce dernier type de latence a été largement étudié chez les cellules dérivées de LCL obtenues suite à l'infection de lymphocytes B par l'EBV *in vitro* (115). Il a également été observé dans les lymphoproliférations associées à EBV chez des individus immunocompromis (36) et au cours d'une infection primaire à EBV comme c'est le cas de la mononucléose infectieuse (141, 162). Les 6 antigènes EBNA (EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C et LP) de même que les 3 LMPs (LMP1, 2A et 2B) et les EBERs (EBER1 et 2) sont exprimés, ce qui rend les cellules exprimant ce type de latence plus accessibles aux lymphocytes T cytotoxiques. C'est sans doute la raison pour laquelle on ne retrouve pas ce type de latence dans les lymphocytes B infectés circulant dans le sang périphérique d'un porteur sain, mais que l'on peut assister à une prolifération de lymphocytes B exprimant ce type de latence dans le cadre d'une immunosuppression où la réponse cytotoxique est affectée.

virale n'ayant pas développé de PTLD (n=14), et 3) les patients d'un groupe contrôle avec une charge virale modérée à basse qui n'ont pas développé de PTLD (n=6). La charge virale a été déterminée par réaction de polymérase en chaîne semi-quantitative en utilisant des dilutions sériées de PBMC. La sérologie EA IgG a été effectuée par la technique d'immunofluorescence indirecte.

Au total, six patients ont développé un PTLD. Tous ont démontré une charge virale d'au moins une copie de génome EBV par 1000 PBMC au moment du diagnostic de PTLD. De plus, aucun de ces patients n'a démontré une augmentation significative de leur titre d'anticorps anti-EA au moment du PTLD jusqu'à plusieurs mois suivant le diagnostic. Par contre, parmi les 14 patients ayant présenté une haute charge virale (≥ 1 copie de génome EBV / 1000 PBMC) et n'ayant pas développé de PTLD, 13 ont rapidement développé des anticorps anti-EA (en moyenne ≥ 1000) parfois même de façon persistante.

En conclusion, la charge virale EBV sanguine combinée à la sérologie EA semblent pouvoir nous permettre d'évaluer le degré d'immunosuppression net du patient et pourraient donc constituer des marqueurs de risque pour le développement d'un PTLD.

Présentations à des congrès scientifiques

Cette étude a été présentée dans le cadre de 3 congrès scientifiques dont :

1) Par affiche

Carpentier L and Alfieri C.

« Viral load analysis versus early-antigen serology for prognosis / diagnosis of Epstein-Barr virus lymphoproliferative disease in pediatric transplant patients ». 14th Annual Clinical Virology Symposium, Clearwater Beach (Floride), 28 avril-2 mai 1998.

Prix: Abrégé sélectionné pour l'une des bourses de voyage accordée par la «Pan American Society for Clinical Virology».

2) Par affiche

Carpentier L, Alfieri C, Mantha M-M, Tapiero B, Alvarez F, Viau C.

« Prognostic markers for the development of Epstein-Barr virus lymphoproliferative disease in pediatric solid organ transplant patients». 16th Annual Clinical Virology Symposium, Clearwater Beach (Floride), 30 avril-3 mai 2000.

Prix : Abrégé sélectionné pour l'une des bourses de voyage accordée par la «Pan American Society for Clinical Virology».

3) Présentation orale

Carpentier L, Alfieri C, Tapiero B, Alvarez F, Viau C.

Étude de marqueurs pour le développement de la maladie lymphoproliférative (PTLD) liée au virus Epstein-Barr (EBV) chez les transplantés pédiatriques d'organes solides. Congrès Annuel de l'Association des Médecins Microbiologistes Infectiologues du Québec (AMMIQ), Québec (Qc), 7-9 juin 2000.

Prix : Prix de l'Association des Médecins Microbiologistes-Infectiologues accordé à la meilleure présentation des étudiants à la maîtrise et au doctorat.

Table des matières

	Page
Identification du jury	i
Sommaire	ii
Présentations à des congrès scientifiques	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	x
Liste des sigles et abréviations	xi
Dédicace	xiii

CHAPITRES :

I) Revue de la littérature	1
1) Le virus Epstein-Barr	
A) Sommaire	2
B) Structure du virion	3
C) Génome de l'EBV	3
D) Infection des lymphocytes B par l'EBV	4
i) adsorption du virus à la surface du lymphocyte B	5
ii) pénétration et décapsidation	5
iii) réplication du génome viral	6
iv) établissement de l'infection latente	8
v) persistance de l'ADN viral	12
vi) infection lytique	14
E) Réponse immunitaire normale de l'hôte	15
2) Pathologies associées au virus Epstein-Barr	
A) Pathologies associées au cycle lytique	
- La mononucléose infectieuse	20

B) Pathologies associées au cycle latent	
- Le lymphome de Burkitt.....	23
- Le lymphome de Hodgkin.....	24
- Les lymphomes des cellules T.....	25
- Les syndromes lymphoprolifératifs chez les patients immunosupprimés.....	26
3) PTLD chez les transplantés	
A) Pathogénèse du PTLD.....	28
B) Rôle des cytokines dans la pathogénèse du PTLD.....	29
C) Facteurs de risque dans le développement d'un PTLD	
i) Le type et l'intensité de l'immunosuppression.....	30
ii) Le statut EBV en pré-greffe.....	31
iii) Le type d'organe transplanté.....	31
iv) La stimulation antigénique chronique.....	32
v) L'infection concomittante au cytomégalovirus.....	32
D) Diagnostic d'un PTLD.....	33
E) Traitements.....	35
F) Prévention.....	39
4) Méthodes de détection virale	
A) Méthodes de détection directe	
a) Les méthodes morphologiques	
i) L'hybridation <i>in situ</i>	41
ii) L'immunohistochimie.....	42
b) Les méthodes non-morphologiques	
i) La réaction de polymérase en chaîne (PCR).....	43
ii) Le Southern blot.....	46
B) Méthodes de détection indirecte	
- La sérologie EBV.....	48

II) Article	49
Abstract	
Introduction	
Materials and methods	
Results	
Discussion	
Acknowledgments	
References	
Figure legends	
Tables	
Figures	
III) Discussion et conclusions générales	81
IV) Bibliographie	91
Annexe 1	119
Annexe 2	121
Remerciements	123

Liste des tableaux

MÉMOIRE :

Tableau I

Comparaison des formes de latence exprimées *in vivo* et *in vitro*..... 13

Tableau II

Les antigènes et les ARNs transcrits au cours du cycle latent et du cycle lytique de l'EBV..... 16

Tableau III

Mécanismes de contrôle de l'infection par l'EBV..... 17

Tableau IV

Profil sérologique d'un individu immunocompétent suite à une infection par l'EBV..... 18

Tableau V

Pathologies associées au cycle lytique et/ou latent de l'EBV..... 21

Tableau VI

Les diverses présentations cliniques des PTLD..... 34

Tableau VII

Classification des PTLD..... 36

Tableau VIII

Les diverses options thérapeutiques pour traiter un PTLD..... 37

Tableau IX

Stratégies pour prévenir la survenue d'un PTLD	40
--	----

ARTICLE :Table 1

Summary profile of pediatric transplant recipients	74
--	----

Table 2

Immunosuppressive regimen of high-risk patients	75
---	----

Table 3

Clinical findings in patients with PTLD	76
---	----

Table 4

Prognostic values of EA antibodies in the 20 solid organ transplant recipients with high viral load	77
---	----

ANNEXE 1:Tableau X

Infection primaire avec le virus Epstein-Barr et le Cytomégalovirus (CMV) suite à une transplantation chez des patients séronégatifs	120
--	-----

Liste des figures

MÉMOIRE :

Figure 1

Représentation schématique de la structure du génome EBV 4

Figure 2

Infection et transformation d'un lymphocyte B par l'EBV 7

Figure 3

Les différents types de latence de l'EBV 10

Figure 4

Étude de la structure des termini du génome EBV par Southern blot
pour déterminer la clonalité des cellules infectées 47

ARTICLE :

Figure 1

Correlation between Epstein-Barr virus load in peripheral blood
mononuclear cells (PBMC) and early antigen (EA) titer following
transplantation in: A) four patients with PTLD 78

B) four patients without PTLD 79

Figure 2

Ste-Justine Hospital algorithm for EBV testing in pediatric
transplant recipients 80

ANNEXE 2 :

Figure 5

Effet d'une infection herpétique sur l'infection EBV
suite à une transplantation 122

Liste des sigles et abréviations

ADCC :	cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps
ALG/ATG :	globulines anti-lymphocytaires
CMH :	complexe majeur d'histocompatibilité
CMV :	Cytomégalovirus
CN :	carcinome nasopharyngé
CR2 :	récepteur du complément de type 2
CsA :	cyclosporine A
DIG :	digoxigénine
EBER :	ARN non-polyadénylés du virus Epstein-Barr
EA :	antigènes précoces du virus Epstein-Barr
EBNA :	antigènes nucléaires du virus Epstein-Barr
EBV :	virus Epstein-Barr
GMO:	greffé de moëlle osseuse
GVHD:	«graft versus host disease»
H :	cellules typiques de Hodgkin
HHV:	Human Herpes Virus
HIS :	hybridation <i>in situ</i>
HIV :	virus de l'immunodéficience humaine
HLA :	antigènes leucocytaires humains
HSV:	Human Simplex Virus
IgG:	immunoglobuline de type G
IgM :	immunoglobuline de type M
IHC :	immunohistochimie
IL :	interleukine
INF- α :	interféron- α
IR :	séquences répétitives internes du virus Epstein-Barr
IVIG :	gammaglobulines intraveineuses
LAK :	lymphocytes tueurs autologues

LB :	lymphome de Burkitt
LCL :	lignée lymphoblastoïde
LH :	lymphome de Hodgkin
LMP:	protéine de latence membranaire du virus Epstein-Barr
MA :	antigènes membranaires du virus Epstein-Barr
MI :	mononucléose infectieuse
NPV :	valeur prédictive négative
pb :	paire de base
PBMC :	cellules mononucléées du sang périphérique
PBS :	phosphate-buffered saline
PCR :	réaction de polymérase en chaîne
PPV :	valeur prédictive positive
PTLD :	syndrome lymphoprolifératif post-transplantation
RS :	cellules de Reed-Sternberg
SCID :	syndrome d'immunodéficience congénitale
SIDA :	syndrome d'immunodéficience acquise
SOT :	transplanté d'organe solide
TPA :	phorbol 12-myristate 13-acetate
TR :	séquence répétitive terminale du génome EBV
U :	domaines uniques du virus Epstein-Barr
VCA :	antigènes de la capside du virus Epstein-Barr
ZEBRA :	transactivateur du virus Epstein-Barr (« <i>BamZ</i> Epstein-Barr replication activator»)

I

REVUE DE LA LITTÉRATURE

Revue de la littérature

1) Le virus Epstein-Barr (voir réf. 111 et 200 pour une revue complète)

A) Sommaire

Le virus Epstein-Barr (EBV) a été découvert en 1964 par l'équipe d'Epstein, Achong et Barr à partir de cultures cellulaires de lymphomes de Burkitt. Il a été classifié dans la sous-famille des Gammaherpesvirinae en raison d'abord de ses caractéristiques morphologiques puis physiologiques. Trois caractéristiques typiques des virus herpes également associées à l'EBV sont la persistance chez leur hôte, leur ubiquité, et leur tropisme pour un type cellulaire particulier. En effet, EBV infecte strictement le genre humain et plus spécifiquement les lymphocytes B et les cellules épithéliales de l'oropharynx. La transmission du virus s'effectue facilement par la salive due au fait que la réplication virale se situe au niveau de l'oropharynx. Ainsi, 90% de la population mondiale adulte est porteuse de ce virus.

L'infection primaire résulte en une lymphoprolifération généralisée, transitoire, et généralement bien contrôlée. Celle-ci peut être silencieuse ou très peu symptomatique si elle survient en bas âge ou peut se présenter sous forme de mononucléose infectieuse si elle survient à l'adolescence ou plus tard. L'infection à EBV est généralement anodine, mais plusieurs pathologies y sont fortement associées, le plus souvent tumorales comme c'est le cas du lymphome de Burkitt, du carcinome nasopharyngé, de la leucoplasie orale chevelue, du lymphome de Hodgkin, ainsi que de la maladie lymphoproliférative post-transplantation pour ne nommer que celles-ci.

En effet, les lymphocytes B infectés par l'EBV *in vitro* subissent une transformation cellulaire qui les immortalise sous forme de lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCL). Ce processus de transformation et d'immortalisation confère donc à l'EBV des propriétés oncogéniques d'où la grande attention qui lui a été portée.

Suite à sa découverte en 1964, son génome fut caractérisé au cours des années 1970. Son récepteur sur les lymphocytes B fut identifié en 1973, puis caractérisé pendant les années 1980. Finalement, sa séquence complète fut déterminée dès 1984. Le

génomique EBV fut le premier de la famille des *Herpesviridae* à être entièrement cloné et séquencé.

B) Structure du virion

Le virus Epstein-Barr fait partie de la famille des Herpesviridae et appartient à la sous-famille des Gammaherpesvirinae et au genre des *Lymphocryptovirus*. Les virus de la famille des Herpesviridae se ressemblent dans la composition et la structure de leur génome. Les membres de la sous-famille des Gammaherpesvirinae à laquelle appartient EBV, ont comme particularité d'établir leur cycle de latence dans les lymphocytes en plus d'être associés à la transformation et à la prolifération cellulaire.

L'EBV mesure entre 150 et 200 nm de diamètre. Il est formé d'une capsidie icosaédrique comportant 162 capsomères dont 12 capsomères pentamériques et 150 autres hexamériques. La capsidie est recouverte d'un tégument protéique et renferme un nucléoïde qui représente la partie centrale formée de l'ADN viral lié à une matrice protéique. Le tout est recouvert d'une enveloppe lipidique de provenance cellulaire dans laquelle sont insérées des glycoprotéines virales.

C) Génome du virus Epstein-Barr

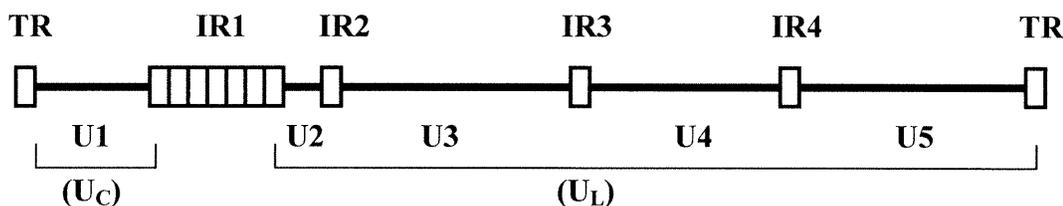
L'EBV est un virus à ADN bicaténaire de 172 kpb, linéaire dans sa capsidie et comportant 60% G+C. La cartographie génique de plus de 100 gènes viraux a été établie grâce à l'étude des polymorphismes de restriction avec les endonucléases *EcoR1* et *BamH1*.

Le génome viral est constitué de 2 domaines uniques, un domaine court de 15 kpb (U_C pour domaine unique court) et un domaine long de 150 kpb (U_L pour domaine unique long) (figure 1). Ces 2 domaines sont séparés par des séquences répétées en tandem d'environ 3 kpb constituant la région répétée interne 1 (IR1). Il existe de plus dans le domaine U_L , 3 autres séquences répétées internes plus courtes nommées IR2, IR3 et IR4 séparant ainsi U_L en 4 domaines uniques plus petits, soient U2, U3, U4 et U5.

Les 2 extrémités du génome sont formées de 2 séquences terminales répétées (TR) constituées d'un nombre variable de répétitions d'une séquence d'environ 530 pb. Elles permettent la circularisation covalente du génome viral dans le noyau des lymphocytes B infectés de façon latente.

Plusieurs isolats de l'EBV présentent un polymorphisme résultant du nombre variable d'éléments IR, de répétitions mineures à l'intérieur des domaines uniques, des séquences répétitives terminales ainsi que des variations au niveau des sites de restriction. Ainsi, 2 différents variants d'EBV (EBV-1 et EBV-2) ont été caractérisés à partir de polymorphismes alléliques impliquant les gènes codant pour les antigènes nucléaires EBNA.

Figure 1 : Représentation schématique de la structure du génome EBV



TR : séquences répétitives terminales en tandem

U : domaines uniques

IR : séquences répétées internes

D) Infection des lymphocytes B par le virus Epstein-Barr

L'infection par l'EBV peut mener à l'établissement d'un cycle lytique ou d'un cycle latent dépendant du degré de différenciation des lymphocytes infectés. Le cycle lytique implique la production de virions tandis que la phase latente permet au virus de persister à l'intérieur du noyau du lymphocyte B infecté. Des facteurs cellulaires et viraux sont impliqués dans le contrôle de la réplication virale durant le cycle de latence. De plus, des antigènes viraux différents seront exprimés selon qu'il s'agit du cycle lytique ou du cycle latent qui a été établi.

i) Adsorption du virus à la surface du lymphocyte B

La première étape de l'infection d'un lymphocyte B par EBV consiste en l'attachement très spécifique du virus à la surface du lymphocyte B humain (figure 2). Cette spécificité restreinte d'EBV aux lymphocytes B au stade pré-plasmacytoïde (au repos) est en grande partie due au niveau élevé de l'expression de la molécule CD21 à la surface de ces lymphocytes qui agit à titre de récepteur pour le virus. La glycoprotéine virale de surface, la gp350/220, représente quant à elle le ligand (246). Il a de plus été démontré tout récemment que la présence d'un co-récepteur, soit le HLA de classe II, était nécessaire pour l'infection d'un lymphocyte B par l'EBV (126).

Le récepteur CD21, anciennement nommé CR2 pour « complement receptor type 2 », est un membre de la famille des immunoglobulines. Il sert principalement de récepteur à la molécule C3d, une composante de la cascade du complément. En plus d'être présent en grand nombre sur les lymphocytes B au stade pré-plasmacytoïde, ce récepteur est également présent à la surface des cellules épithéliales basales (277), des lymphocytes T périphériques (105), des thymocytes (105), des cellules NK (Natural Killer Cells) (105) et des cellules folliculaires dendritiques (105), mais en très faible concentration.

La liaison de la gp350/220 au récepteur CD21 et au co-récepteur HLA de classe II transmet un signal d'activation qui conduit le lymphocyte B à sortir de son état de repos (quiescence) et à exprimer à sa surface certains marqueurs d'activation, comme le CD23 (101, 142). Cette prolifération induite par EBV est en tout point semblable à celle induite par un antigène.

ii) Pénétration et décapsidation

La liaison de la gp350/220 au récepteur CD21 et au co-récepteur HLA de classe II provoque l'agrégation des récepteurs CD21 présents dans la membrane plasmatique de même qu'une co-agrégation des immunoglobulines de surface. Il s'ensuit une internalisation du virus dans des vésicules cytoplasmiques (159). La fusion de la membrane entourant la particule virale avec celle de la vésicule formée libère ainsi

la nucléocapside dans le cytoplasme du lymphocyte B. La gp85, une autre glycoprotéine de l'enveloppe virale, joue un rôle déterminant dans cette fusion des membranes.

Bien que très peu soit connu sur la migration de la nucléocapside vers le noyau (impliquant probablement le cytosquelette de la cellule infectée), la décapsidation et la circularisation de l'ADN viral, il a été observé que 16 heures après l'infection, chaque lymphocyte B infecté contient un épisode EBV.

iii) Réplication du génome viral

Des études *in vitro* ont démontré que les lymphocytes B nouvellement infectés de façon latente contiennent une copie par cellule de l'ADN sous forme épisomale. Les lymphocytes immortalisés en culture, infectés de façon stable et latente, peuvent contenir plus de copies par cellule de l'épisode viral. C'est le cas de la lignée cellulaire Raji (lignée dérivée d'un lymphome de Burkitt) qui contient 50 épisodes par cellule de façon stable.

Ce ou ces épisodes sont répliqués au début de la phase S (synthèse de l'ADN) de chaque cycle cellulaire par l'ADN polymérase cellulaire et à l'aide de la protéine EBNA1 laquelle se lie à l'origine de réplication de l'épisode EBV (Ori-P). La réplication semble se produire à partir de la forme circulaire selon le modèle du cercle roulant. Cette étape initiale d'amplification de l'ADN épisomal assure la persistance du virus dans les cellules filles.

La présence d'ADN viral intégré au génome cellulaire, en présence ou en l'absence de la forme épisomale, a également été démontrée en culture. Deux lignées cellulaires ont été bien étudiées, soient : 1- Namalwa, une lignée cellulaire dérivée d'un lymphome de Burkitt qui contient 2 copies de l'ADN viral par cellule, intégrées sous forme linéaire dans le chromosome 1, et 2- IB4, une lignée cellulaire dérivée de l'infection de lymphocytes de sang de cordon avec le surnageant d'une culture de B95-8 productrice de virus, qui contient 3 ou 4 copies d'ADN viral par cellule, aussi intégrées à l'ADN cellulaire (chromosome 4).

Figure 2 Infection et transformation d'un lymphocyte B par EBV

[adapté de E. Kieff (111)]

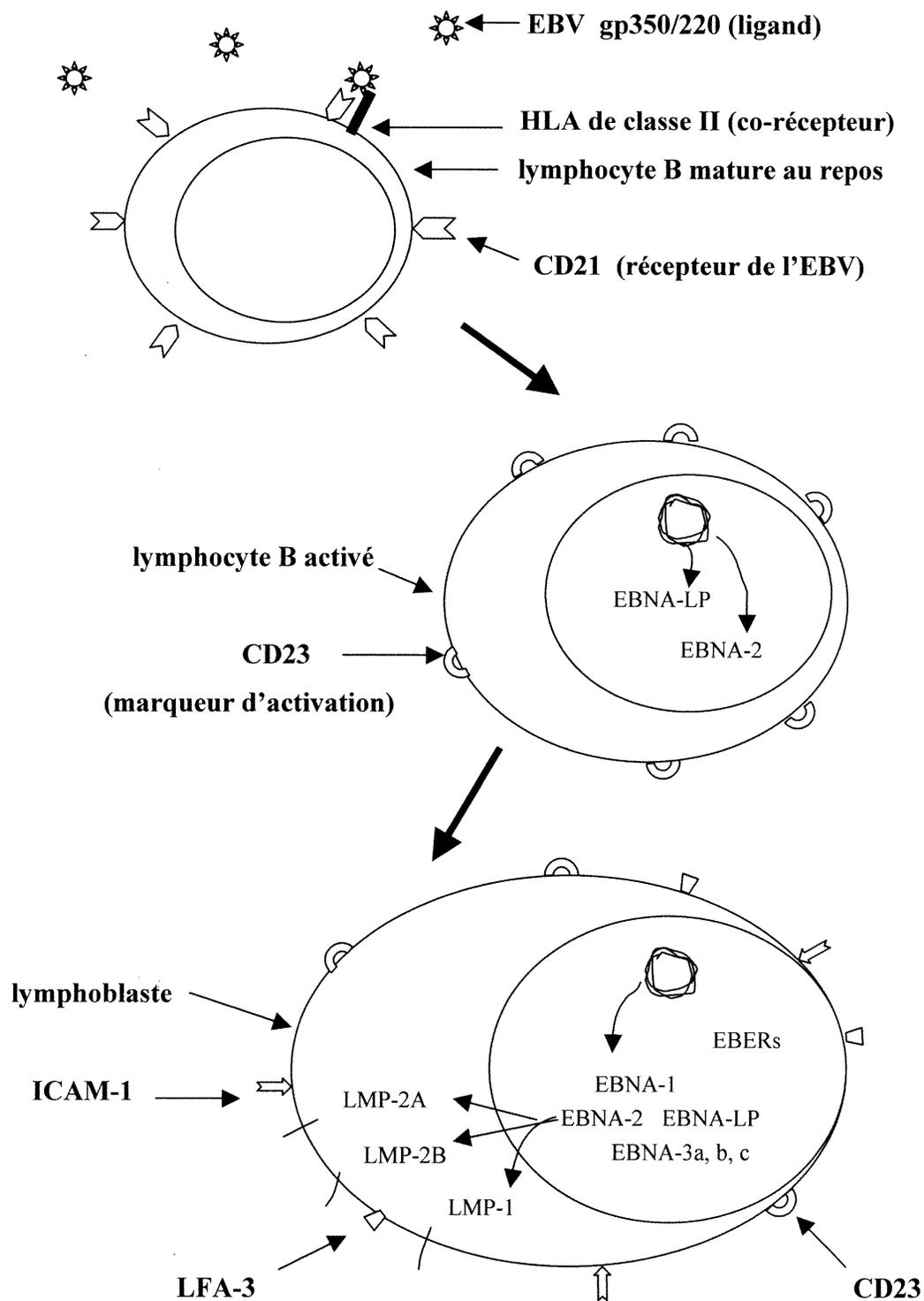
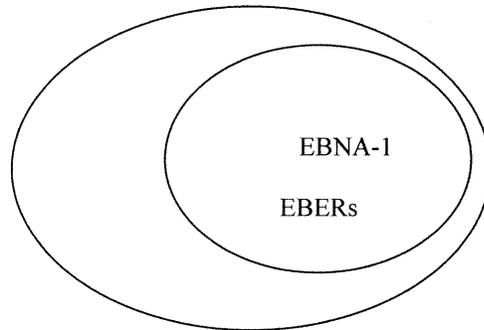


Figure 3 Les différents types de latence du virus Epstein-Barr

[Adapté de Caillard et al (24)]

TYPE 1

Lymphome de Burkitt

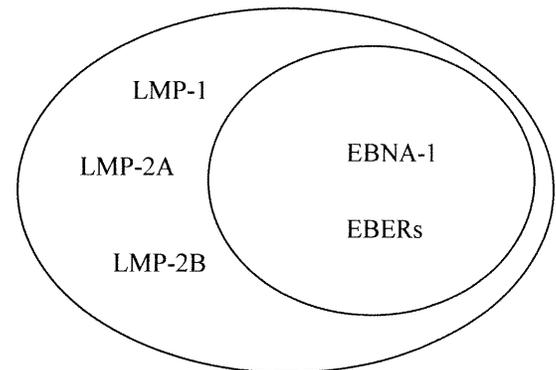


TYPE 2

Carcinome nasopharyngé

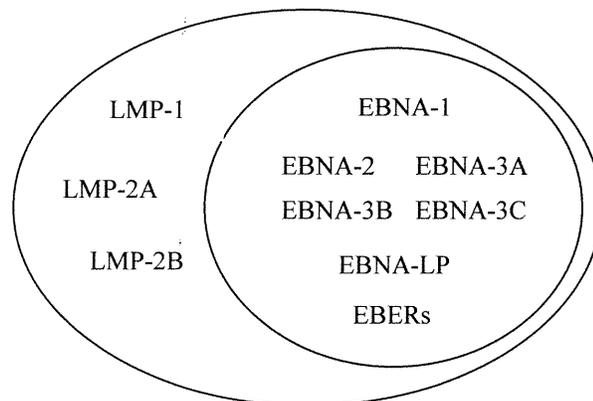
Lymphome de Hodgkin

Lymphome de cellules T/NK



TYPE 3

Lignées lymphoblastoïdes



De ces divers antigènes de latence exprimés, au moins 5 sont essentiels au processus de transformation cellulaire (111, 216):

- 1- **EBNA1** : responsable du maintien et de la réplication de l'épisome viral
- 2- **EBNA2** : transactivateur de l'expression de certains gènes viraux (LMP1 et LMP2) et cellulaires (CD21 et CD23)
- 3- **EBNA3A** : essentielle à la transformation des lymphocytes B; antagoniste d'EBNA2
- 4- **EBNA3C** : augmente l'expression de CD21 et LMP
- 5- **LMP1** : induit les principaux changements cellulaires associés avec l'infection par l'EBV incluant, la croissance des cellules en amas, une augmentation des villosités, une augmentation de l'expression de la vimentine du cytosquelette, une augmentation de l'expression des marqueurs de surface CD23, CD39, CD40, CD44 et CMH de classe II, une augmentation de l'expression d'IL-10, une diminution de l'expression de CD10, et une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion non-spécifiques LFA-1 (CD11a / CD18), ICAM-1 (CD54) et LFA-3 (CD58) qui participent à la reconnaissance des lymphocytes B infectés par les lymphocytes T cytotoxiques. LMP1 induit également l'expression du proto-oncogène bcl-2, ce qui protègerait les cellules infectées de l'apoptose (37).

Le mécanisme par lequel ces différentes protéines de latence interagissent avec la machinerie de la cellule hôte pour induire la transformation du lymphocyte B a été très clairement démontré pour la protéine LMP1 (128, 203). Cette dernière est un analogue viral de la famille des récepteurs TNF («tumor necrosis factor») présents dans les cellules humaines. LMP1 se lie à des protéines traductrices de signaux intracellulaires appelées TRAF («TNF-receptor associated factors»), activant ainsi 2 grandes familles d'activateurs transcriptionnels, soient NF- κ B («nuclear factor- κ B») et AP-1 («activator protein-1») par l'activation de la kinase c-jun. On assiste alors à la prolifération du lymphocyte infecté.

Les 3 précédents types de latence avaient été décrits suite à des observations faites à partir de tumeurs EBV-positives et de lignées de lymphocytes B immortalisés *in vitro*. Mais de récents progrès dans notre compréhension de la latence induite par EBV

in vivo suggère une nouvelle nomenclature basée sur le comportement du virus dans les lymphocytes B normaux (145, 251) (tableau I).

- 1- **Programme de latence** : désigne le mécanisme de persistance du virus dans les lymphocytes B au repos (CD23-). Il n'y a pas d'équivalence dans le précédent système de classification.
- 2- **Programme EBNA1 seulement** : désigne la forme de latence des lymphocytes B qui expriment le programme de latence et qui ont été induits à proliférer par des signaux physiologiques. Ce serait l'équivalent de la précédente latence de type 1.
- 3- **Programme de croissance** : désigne la prolifération limitée des lymphocytes B avant la différenciation et l'établissement de l'infection persistante. Ce serait l'équivalent de la précédente latence de type 3.

v) Persistance de l'ADN viral

On retrouve entre 1 et 50 lymphocytes B infectés par 10^6 lymphocytes dans le sang périphérique d'un individu sain infecté de façon persistante (37, 45). Ces lymphocytes infectés contiennent un nombre bas d'épisomes viraux (2 à 5 copies par cellule) qui peuvent être réactivés pour produire des particules infectieuses. Ces lymphocytes B au repos circulant ont donc toutes les caractéristiques d'un site de persistance à long terme de l'infection virale à EBV.

Au cours d'une mononucléose, le virus est détecté *in vivo* dans un éventail de lymphocytes B à différents stades de différenciation allant du lymphocyte B au repos, en passant par des lymphoblastes jusqu'aux cellules à différenciation plasmocytaire (251). La forme de latence induite par EBV dépendrait du stade de différenciation du lymphocyte B dans lequel il réside. Ainsi, les lymphocytes activés (lymphoblastes) exprimeraient les 11 antigènes de latence et seraient localisés principalement dans les organes lymphoïdes secondaires.

Tableau I Comparaison des formes de latence de l'EBV exprimées *in vivo* et *in vitro*.
 [tiré de D. Thorley-Lawson et al (251)]

Propriétés	Formes de latence <i>in vivo</i>			<i>in vitro</i>
	latence	EBNA-1 seulement	croissance	
Type de latence	-	type 1	type 3	type 3
Localisation	périphérie	tissu lymphoïde	tissu lymphoïde	culture
Phénotype du lymphocyte B	au repos B7 négative	actif en prolifération	actif en prolifération	actif en prolifération
Gènes viraux exprimés	LMP-2A EBNA-1 (?), EBERS	EBNA-1 EBERS	EBNA-1 à 6 LMP-1, 2, EBERS	EBNA-1 à 6 LMP-1, 2, EBERS
Durée de vie	longue vie ?	limitée	limitée	immortelle
Reconnaissance par les cellules T	invisible	invisible	tués	tués

De récentes données suggèrent que ce serait une population de lymphocytes B au repos, non-proliférante, CD23-, du sang périphérique qui serait le site majeur de persistance virale (9, 144, 145). Le phénotypage de ces cellules a révélé qu'elles expriment seulement les gènes viraux LMP2A (qui produit une protéine ciblée par les lymphocytes T cytotoxiques) et EBNA1 (37). Par contre, ces mêmes cellules n'expriment pas la molécule B7 nécessaire à la réactivation de la réponse T mémoire (145). Ces lymphocytes B pourraient donc échapper à la détection par la réponse immunitaire de l'hôte.

vi) Infection lytique

Il a longtemps été cru que les cellules épithéliales de l'oropharynx étaient le site majeur de réplication du virus (127, 230, 232, 277). Cependant, il a été démontré récemment par hybridation *in situ* que c'était les lymphocytes B présentant une différenciation plasmocytaire qui permettaient la réplication du virus au niveau de l'oropharynx et non pas les cellules épithéliales oropharyngées (6, 162, 251). De plus, l'observation que l'irradiation du système lymphoïde précédant une transplantation de moëlle osseuse résultait en l'élimination de la souche EBV résidente, supporte le rôle du lymphocyte B comme site de persistance virale (64). Cependant, l'exemple du carcinome nasopharyngé (127, 274) et de la leucoplasie orale chevelue (69, 223, 249) démontre que la cellule épithéliale pourrait, sous certaines conditions, être la cible de l'infection à l'EBV.

Le passage du cycle de latence au cycle lytique implique la présence de la protéine virale très précoce ZEBRA (pour «*BamZ* Epstein-Barr Replication Activator») qui agirait comme transactivateur viral (72). Le virus utiliserait la machinerie enzymatique de la cellule hôte pour produire les protéines précoces de réplication, telles que les EA («*Early Antigens*»), et tardives, telles que les VCA («*Viral Capsid Antigens*») et les MA («*Membrane Antigens*»). Ces lymphocytes activés sont toutefois rapidement éliminés par les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques à EBV chez l'individu immunocompétent.

Les différents antigènes du cycle lytique (tableau II)

Les antigènes précoces EA sont composés d'un grand nombre de protéines comportant des protéines transactivatrices, une ADN polymérase, une ribonucléase réductase et une protéine kinase. La fonction de bon nombre d'entre elles reste encore à être élucidée. Ces antigènes précoces ont de plus été subdivisés en 2 catégories de composantes (de type diffus ou restreint) selon leur distribution dans la cellule et leur sensibilité à la fixation par le méthanol (88).

Les antigènes de la capsid virale (VCA) sont exprimés plus tardivement dans le cycle lytique. Ils ont d'abord été identifiés par immunofluorescence et sont localisés dans le noyau et le cytoplasme des cellules infectées.

Les antigènes de membrane (MA) sont également exprimés plus tardivement dans le cycle lytique et se retrouvent à la surface des cellules infectées et dans l'enveloppe des virions. Ils comprennent l'antigène de membrane gp350/220, qui permet l'attachement du virion à la surface du lymphocyte B, et la gp85, qui est impliquée dans la fusion de l'enveloppe virale avec celle de la cellule hôte.

E) Réponse immunitaire normale de l'hôte

La réponse immunitaire induite suite à l'infection par EBV comprend une réponse humorale ainsi que cellulaire (tableau III). La production d'interféron α et γ semble jouer un rôle très important au tout début de l'infection en induisant une réponse des cellules dites Th1 (54). L'interféron γ est sécrété par les lymphocytes T et agit sur les lymphocytes B et les macrophages en augmentant l'opsonisation et la phagocytose. L'interféron α est entre autre sécrété par les cellules B et NK et a comme principales fonctions d'augmenter le potentiel lytique des cellules NK, d'inhiber la réplication virale et d'augmenter l'expression des molécules CMH de classe I.

Tableau II Les antigènes et les ARNs transcrits au cours du cycle latent et du cycle lytique de l'EBV

INFECTION LATENTE	INFECTION LYTIQUE
<p>EBNA : Antigènes nucléaires</p> <p>EBNA-1</p> <p>EBNA-2a/2b</p> <p>EBNA-3a (ou EBNA-3)</p> <p>EBNA-3b (ou EBNA-4)</p> <p>EBNA-3c (ou EBNA-6)</p> <p>EBNA-LP (ou EBNA-5)</p>	<p>Antigènes précoces</p> <p>EA(D) : EA de type diffus</p> <p>localisés dans le noyau et le cytoplasme</p> <p>résistants à la dénaturation par le méthanol</p> <p>EA(R) : EA de type restreint</p> <p>localisés dans le cytoplasme et le Golgi</p> <p>sensibles à la dénaturation par le méthanol</p>
<p>LMP : Antigènes membranaires et cytoplasmiques</p> <p>LMP-1</p> <p>LMP-2A</p> <p>LMP-2B</p>	<p>Antigènes tardifs</p> <p>VCA : antigènes de la capside</p> <p>localisés dans le noyau et le cytoplasme</p> <p>MA : antigènes membranaires</p> <p>localisés à la surface des cellules infectées</p> <p>et dans l'enveloppe virale</p> <p>ex : gp85, gp350/220</p>
<p>EBER : ARN non-polyadénylés</p> <p>aucun produit de traduction connu</p> <p>EBER-1</p> <p>EBER-2</p>	

Tableau III Mécanismes de contrôle de l'infection par l'EBV

Immunité non-spécifique
Permissivité cellulaire (présence du récepteur CD21)
Interférons α et γ
Cellules NK
Immunité spécifique
Anticorps neutralisants
Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC)
Lymphocytes T cytotoxiques CD4+ et CD8+

Les anticorps neutralisants et non-neutralisants dirigés contre différents antigènes viraux sont ensuite produits (182). Ils limitent la propagation du virus libre prévenant ainsi l'infection par une autre souche virale EBV et rendent les lymphocytes lytiquement infectés susceptibles d'être éliminés par ADCC ou cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps. La réponse humorale est généralement prévisible (89) (tableau IV) avec le développement initial des anticorps IgM dirigés contre les antigènes de la capsid virale (**VCA IgM**). Ceux-ci disparaîtront au cours des trois premiers mois suivant l'infection primaire. On assiste également au tout début de l'infection au développement des **anticorps hétérophiles** nommés ainsi parce qu'ils réagissent de façon croisée avec d'autres antigènes provenant de d'autres espèces (ex : réaction de Paul Bunnell). La présence de ces anticorps est une caractéristique importante lors du diagnostic d'une mononucléose infectieuse (228, 242). Ceux-ci peuvent persister durant plusieurs semaines à plusieurs mois (89). Le développement des anticorps IgG dirigés contre les antigènes de la capsid virale (**VCA IgG**) apparaissent quelques semaines plus tard et persistent ensuite pour la vie. Au cours de la phase aiguë de la maladie, apparaîtront ensuite les anticorps dirigés contre les antigènes précoces (**EA IgG**) qui

disparaîtront au cours de la phase de convalescence. Cependant, moins de 20% des patients faisant la mononucléose ne développeront pas ces anticorps. Enfin, les anticorps dirigés contre les antigènes nucléaires (**EBNA IgG**) apparaîtront au cours de la période de convalescence et persisteront tout au long de la vie de l'individu infecté. La réponse anti-EBNA est dirigée principalement contre les EBNA1 et les EBNA2. Chez un hôte immunocompétent, les anticorps anti-EBNA2 apparaissent généralement en premier pour ensuite décliner et céder la place aux anticorps anti-EBNA1 qui persisteront (12). Ce profil sérologique peut toutefois être modifié dans le contexte d'une immunosuppression (patients HIV+) où les anticorps anti-EBNA1 apparaissent d'abord suivis des anticorps anti-EBNA2 (179).

Tableau IV Profil sérologique d'un individu immunocompétent suite à une infection par le virus Epstein-Barr

Statut EBV	VCA		EBNA	EA
	IgM	IgG	IgG	IgG
Négatif	-	-	-	-
Infection primaire	+	++	-	+ (-)*
Infection ancienne	-	++	+	-
Réactivation virale	- (+)	+++	++	+ (-)*

VCA : viral capsid antigens

EBNA : Epstein-Barr nuclear antigens

EA : early antigens

+ / - : présence / absence d'anticorps

*** : environ 20% des personnes infectées ne développeront jamais ces anticorps**

La réponse immunitaire cellulaire initiale implique la lyse cellulaire directe par les lymphocytes T non-spécifiques ou les cellules NK (5). On assiste ensuite au développement de la réponse cellulaire T spécifique CD4+ ou CD8+. Il y a maintenant des évidences *in vivo* et *in vitro* que la réponse cytotoxique CD8+ (restreinte aux HLA de classe I) joue un rôle crucial dans le contrôle de la prolifération des lymphocytes B infectés au cours d'une infection primaire ou d'une infection latente (25, 37, 158, 201, 245). Ces études ont démontré qu'au cours de la phase aiguë de l'infection à EBV, jusqu'à 40% des lymphocytes CD8+ totaux du sang périphérique sont dirigés contre un épitope du cycle lytique d'EBV tandis que seulement 2% de ces mêmes lymphocytes sont dirigés contre un épitope du cycle latent d'EBV. Au cours de la phase de convalescence de l'infection, la fréquence des lymphocytes CD8+ dirigés contre un épitope du cycle de latence demeure la même (2%), alors que la fréquence des lymphocytes CD8+ dirigés contre un épitope du cycle lytique, diminue progressivement pour se situer entre 1 et 18 % des cellules cytotoxiques totales (25).

Les cellules cytotoxiques dirigées contre un épitope du cycle latent reconnaissent principalement des épitopes provenant des protéines EBNA3a, 3b, et 3c (141, 201, 216). LMP1 n'est pas une cible principale de la réponse cytotoxique (216), mais elle a une fonction importante dans l'augmentation de l'expression de certaines composantes cellulaires telles que certaines molécules d'adhésion non-spécifiques LFA-1, ICAM-1 et LFA-3, impliquées dans la présentation de l'antigène augmentant ainsi l'immunogénicité des autres antigènes viraux (11). La protéine EBNA1 présente une structure caractéristique qui empêche la reconnaissance de ses épitopes par les cellules cytotoxiques (12, 13), l'empêchant ainsi d'être « processé ». Les cellules exprimant le programme EBNA1 seulement seront donc immunologiquement invisibles pour les cellules T CD8+ cytotoxiques. Cependant, aucune évidence de cellules normales exprimant ce type de programme (EBNA1 seulement) n'a été démontrée *in vivo*, à l'exception des cellules dérivées de lymphomes de Burkitt (70, 115, 210, 222).

2) Pathologies associées au virus Epstein-Barr

Diverses pathologies ont été associées de près ou de loin à l'EBV (tableau V). Elles sont principalement divisées en 2 catégories dépendant du type de cellules impliquées. Ainsi, les cellules lymphoïdes et les cellules épithéliales peuvent toutes les deux contenir le virus sous sa forme latente et/ou lytique. Les principales pathologies lymphoïdes seront ici discutées ainsi que l'importance de l'implication de l'infection latente et/ou lytique d'EBV dans ces pathologies.

A) Pathologies associées au cycle lytique

La mononucléose infectieuse (MI)

La MI a été la première implication d'EBV en pathologie puisque l'infection primaire par EBV en est la principale cause (87). Celle-ci est familièrement appelée la maladie du baiser due à la transmission d'EBV par la salive (8, 161). C'est une maladie lymphoproliférative bénigne, généralement bien contrôlée par la réponse immunitaire à médiation cellulaire. C'est d'ailleurs une réponse exagérée des lymphocytes T qui serait à l'origine de la symptomatologie clinique observée (fièvre, mal de gorge, lymphadénopathie généralisée, splénomégalie et fatigue sévère (asthénie) souvent accompagnée de nausée, de vomissement et d'une myalgie). L'apparition de lymphocytes atypiques (lymphocytes T activés) et d'anticorps hétérophiles circulant dans le sang périphérique sont caractéristiques de la MI (61, 98, 228, 241, 242).

Deux études récentes (6, 162) ont démontré la présence de lymphocytes B infectés de façon latente mais aussi de façon lytique par l'EBV dans les ganglions et les amygdales de patients faisant une MI. Les cellules infectées de façon latente se trouvaient à différents stades de différenciation s'étendant du large lymphoblaste (incluant les cellules de Hodgkin et Reed-Sternberg-like) jusqu'aux plus petits lymphocytes en passant par les lymphocytes à différenciation plasmocytaire (199). De plus, les 3 types de latence étaient observés dans ces lymphocytes qui se trouvaient principalement dans les régions interfolliculaires des tissus lymphoréticulaires, ainsi que

Tableau V Pathologies associées au cycle lytique et/ou latent de l'EBV.

PATHOLOGIES	ANTIGÈNES EXPRIMÉS	TYPE DE LATENCE	RÉFÉRENCES
<u>TUMEURS LYMPHOÏDES</u>			
➤ CYCLE LYTIQUE			
- mononucléose infectieuse	EA, VCA, MA, ZEBRA	I, II, III	6, 162, 163, 199
➤ CYCLE LATENT			
- lymphome de Burkitt	EBNA1, EBERS	I	70, 210, 222, 272
- lymphome de Hodgkin	LMP1, LMP2, EBNA1, EBERS	II	4, 17, 47, 90, 175, 265, 268, 273
- PTLD	LMP1, LMP2, EBNA1, 2,3,LP,EBERS	III	36, 182, 216
- Lymphome T/NK	LMP1, LMP2, EBNA1, EBERS	II	5, 30, 77, 239, 266
<u>TUMEURS ÉPITHÉLIALES</u>			
➤ CYCLE LYTIQUE			
- leucoplasie orale chevelue	EA, VCA, MA, ZEBRA	-	69, 223, 249
➤ CYCLE LATENT			
- carcinome nasopharyngé	LMP1, LMP2, EBNA1, EBERS	II	127, 274

dans les villosités de l'épithélium squameux (6, 162, 163). Anagnostopoulos et al. (6) ont même démontré qu'un nombre bas de lymphocytes T exprimant les EBERS étaient infectés de façon latente.

L'infection lytique a également été observée dans les lymphocytes à différenciation entre autre plasmocytaire (6, 162). Ces derniers étaient également présents dans les régions interfolliculaires. Les transcrits BHLF1 étaient alors détectés par hybridation *in situ* indiquant non seulement la présence de cellules infectées de façon lytique, mais également la présence de cellules passant du cycle latent au cycle lytique. La production de nouvelles particules infectieuses est alors permise, augmentant ainsi le nombre de lymphocytes B nouvellement infectés qui vont proliférer dans les organes lymphoïdes secondaires en attendant que la réponse cellulaire spécifique à l'EBV se développe et vienne restreindre la production de nouveaux virions. Au cours de la phase aiguë de la mononucléose, le nombre de lymphocytes B infectés circulant dans le sang périphérique peut facilement atteindre 1 lymphocyte B infecté / 10^3 lymphocytes circulants (8). Le nombre de lymphocytes infectés se stabilisera à 1 sur 10^6 ou 10^7 lymphocytes B circulants une fois que la réponse cellulaire aura appris à contrôler la prolifération des cellules B infectées. L'infection lytique a donc un rôle majeur à jouer dans cette pathologie bénigne qu'est la mononucléose infectieuse.

La leucoplasie orale chevelue qui est une atteinte des cellules épithéliales de la cavité buccale fortement liée à l'EBV et principalement retrouvée chez les patients HIV+, est également un exemple de pathologie impliquant le cycle lytique de l'EBV (69, 223, 249). Ces lésions répondent très bien à un traitement antiviral comme l'acyclovir, qui permet le rétablissement de l'architecture normale de l'épithélium à l'intérieur de 2 à 4 semaines, et qui suggère que la réplication virale à l'intérieur des cellules épithéliales de la langue est nécessaire au développement de la leucoplasie orale chevelue (197).

B) Pathologies associées au cycle latent

Le lymphome de Burkitt (LB)

Le LB représente la forme la plus courante de cancer chez les enfants d'Afrique équatoriale et de la Nouvelle-Guinée. Il se présente le plus souvent sous la forme d'une tumeur lymphoïde de la mâchoire affectant les maxillaires inférieurs ou supérieurs. Des lésions au niveau de l'orbite, du système nerveux central et de l'abdomen sont également observées (200, 272).

Des études sérologiques allaient renforcer l'association d'EBV au LB (50, 61). En effet, il a été démontré que les titres des anticorps anti-VCA et anti-EA présents dans le sérum des patients atteints du LB endémique, étaient considérablement plus élevés que ceux du groupe contrôle. De plus, les individus qui développaient le LB avaient des titres d'anticorps anti-VCA significativement plus élevés dans les mois et même les années précédant le développement du lymphome.

Trois formes de LB ont été décrites : endémique, sporadique et reliée au SIDA (272). La forme endémique du LB présente la plus forte et la plus constante association avec l'EBV. Celui-ci est retrouvé dans près de 100% des cas étudiés, et dans presque toutes les cellules tumorales. Celles-ci n'expriment que les antigènes viraux de latence de type I (EBNA1 + EBERs) (115, 222). La faible immunogénicité d'EBNA1 ainsi qu'une faible expression des antigènes viraux à la surface des cellules tumorales rendraient celles-ci moins accessibles à la réponse immunitaire cytotoxique spécifique. Ces facteurs combinés à une faible expression de la molécule co-stimulatrice B7 chargée de transmettre le signal d'activation au lymphocyte T, et à une faible expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et LFA-3 qui augmentent l'efficacité de la stimulation en stabilisant le contact établi entre la cellule tumorale et le lymphocyte T cytotoxique, favoriseraient la prolifération tumorale (70, 210).

L'étude cytogénétique des cellules tumorales a révélé que toutes possédaient une translocation réciproque impliquant les gènes codant pour les chaînes lourdes (chromosome 14) ou légères (chromosome 2 ou 22) des immunoglobulines et le proto-oncogène c-myc (chromosome 8) (42, 247). La translocation la plus fréquente est la

t(8/14), suivie de ses variantes t(8/22) et t(2/8). Le point de cassure du chromosome 8 serait différent selon l'origine géographique des lymphomes endémiques ou sporadiques.

Le lymphome de Hodgkin (LH)

Le LH est le lymphome malin le plus fréquemment rencontré dans tous les pays du monde et plus particulièrement dans les pays occidentaux. Environ 40 à 50% des LH des pays occidentaux sont positifs pour EBV rendant le rôle du virus Epstein-Barr dans la pathogénèse du LH plutôt controversé (200).

Des études épidémiologiques ont démontré que les personnes ayant fait une mononucléose infectieuse ont un risque accru de 2 à 4 fois de développer un LH (213). De plus, les titres d'anticorps anti-VCA sont significativement plus élevés chez les patients ayant développé cette maladie allant même jusqu'à 3 ans avant le développement de la tumeur, suggérant qu'un dérèglement pourrait survenir dans l'équilibre établi entre le virus et son hôte avant l'émergence d'un clone malin (150).

La caractéristique histologique d'un diagnostic de LH est la destruction de l'architecture du ganglion atteint combinée à la présence de cellules mononucléaires typiques de Hodgkin (H) et de cellules multinucléaires de Reed-Sternberg (RS) (91, 265, 273). Ces cellules H-RS constituent la portion maligne de la tumeur qui est infiltrée par un grand nombre de cellules variées non-malignes qui composent >98% de la masse tumorale. La classification des LH est donc basée sur le ratio des cellules malignes H-RS / cellules normales, de même que sur la composition de l'infiltrat (200). Ainsi, il existe 4 types de LH : 1- à prédominance lymphocytaire; 2- de type sclérosant nodulaire; 3- à cellularité mixte et 4- à déplétion lymphocytaire.

Des études récentes d'hybridation *in situ* ont localisé l'ADN viral dans les cellules malignes de H-RS dans une proportion atteignant jusqu'à 90% des cas de lymphomes à cellularité mixte, et dans 30% des LH de type sclérosant nodulaire (4, 90, 175, 268). Les cellules tumorales H-RS contiennent le virus sous sa forme épisomale et expriment les antigènes de latence de type 2 (EBNA1, LMP1, LMP2, EBERs) (17, 47, 90, 175). Des études effectuées par hybridation Southern ont démontré que le virus était

en configuration monoclonale dans les cellules infectées, ce qui suggère que les cellules H-RS sont infectées par EBV avant d'être transformées de façon maligne et que le LH pourrait résulter de la transformation d'une cellule infectée par EBV (4, 268). L'origine précise des cellules malignes dans le LH demeure cependant inconnue.

Les lymphomes des cellules T

Bien qu'il ait été longtemps considéré comme infectant strictement le compartiment B lymphocytaire, il a été démontré dès 1988 qu'en certaines circonstances, l'EBV pouvait également pénétrer les lymphocytes T (104, 112, 170). L'EBV est mis en évidence dans 20 à 40% des cas de lymphomes T (252). Le récepteur utilisé demeure cependant très controversé (200).

Au moins 3 catégories distinctes de lymphomes T sont maintenant associés à l'EBV. La première catégorie survient lors d'une infection primaire à EBV et est le résultat d'une prolifération des lymphocytes T infectés par EBV. Cette lymphocytose peut être monoclonale ou polyclonale (30, 57). Dans la plupart des cas, on observe également un syndrome hémophagocytaire qui pourrait survenir suite à l'activation de l'expression de certaines cytokines par les lymphocytes T infectés (39, 238).

La deuxième catégorie renferme les lymphomes T/NK à localisation nasale et à développement extra-ganglionnaire. Ce type de lymphome est très fréquent en Asie mais plus rare dans les pays occidentaux. La présence d'EBV a été démontrée par hybridation *in situ* dans presque la totalité des cellules tumorales. L'expression des divers antigènes de latence révèle une latence de type II (EBNA1, LMP1, LMP2, EBERs) (85, 106, 239).

La dernière catégorie de lymphomes T associés à l'EBV présente une localisation ganglionnaire et renferme la plupart des lymphomes T de type lymphadénopathie angioimmunoblastique (5, 77, 266). Cependant, une fraction seulement des cellules tumorales est positive pour EBV par hybridation *in situ*.

Syndromes lymphoprolifératifs chez les patients immunosupprimés

Les lymphoproliférations malignes de phénotype B affectent 3 grandes populations de patients immunocompromis soient les transplantés, les sidéens et les immunodéprimés congénitaux (36, 131). Le syndrome lymphoprolifératif lié au chromosome X est une déficience congénitale du système immunitaire qui rendrait les patients atteints extrêmement vulnérables à une infection primaire par l'EBV. Cette dernière déclencherait une réponse immunitaire aberrante qui conduirait à diverses pathologies allant de l'anémie aplasique et de l'hypogammaglobulinémie à la mononucléose infectieuse fatale et au lymphome malin (71, 184, 240). Les patients porteurs du syndrome de Wiskott-Aldrich (103, 151) et d'ataxie-télangiectasie (221) développent également plus fréquemment des lymphoproliférations de phénotype B associées à l'EBV.

Deux types de lymphomes B affectent les patients atteints du VIH. Le premier type survient tôt au cours de l'évolution vers le SIDA et regroupe environ 30% des LB (36). Le second groupe survient lorsque l'immunosuppression est profonde et regroupe les lymphomes immunoblastiques dont 50% des lymphomes diffus à grandes cellules (76, 193) et 100% des lymphomes primitifs cérébraux (26, 136, 153) sont associés à EBV. Une coopération entre HIV et EBV démontrée *in vitro*, pourrait expliquer la fréquente association retrouvée entre le développement de lymphomes B et l'EBV chez les patients sidéens (102).

La plus convaincante évidence de l'implication directe de l'EBV dans la pathogénèse des syndromes lymphoprolifératifs survenant chez des patients immunocompromis, nous vient des études effectuées chez les receveurs d'organes. En effet, les syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation (ou PTLD pour « post-transplant lymphoproliferative disease ») sont une des complications majeures de la transplantation avec une incidence au environ de 1 à 10% chez les adultes et de 1 à 32% chez les enfants (94, 125, 234). Ils sont de plus associés à près de 90% à l'EBV. Les lymphocytes B qui expriment une latence de type 3 (programme de croissance) (182, 216) sont parfaitement accessibles au système immunitaire, mais l'immunosuppression iatrogène qui affecte la réponse cellulaire T cytotoxique, explique leur échappement et

favorise indirectement le développement de ces lymphoproliférations. La surveillance de l'hôte ainsi affaibli permettra au virus de se répliquer de façon plus active et d'infecter de plus en plus de lymphocytes B, lesquels deviendront transformés et profiteront des circonstances immunosuppressives pour proliférer. On assistera donc à une augmentation de l'excrétion virale salivaire et à une augmentation de la charge virale du sang périphérique.

Plusieurs facteurs de risque sont connus pour le développement d'un PTLD dont l'utilisation de certains agents immunosuppresseurs tels que l'OKT3 et le Tacrolimus (FK506), une infection concomitante avec le cytomégalovirus, et un statut EBV séronégatif en pré-greffe (260, 261). En fait, l'infection primaire à EBV dans le contexte d'une immunosuppression affectant la réponse immunitaire cytotoxique est le véritable facteur de risque. C'est pourquoi les enfants ont une incidence plus élevée de PTLD, puisqu'en moyenne 50% de ces derniers sont EBV séronégatifs avant la transplantation comparée à moins de 10% des adultes.

3) PTLD chez les transplantés

A) Pathogénèse du PTLD

De nombreux facteurs sont impliqués dans la pathogénèse du PTLD. Un modèle a été développé dans lequel des souris SCID recevaient des cellules hématopoétiques humaines infectées par EBV (149, 218). Deux à 4 mois après l'infusion de telles cellules, des lymphomes B humains contenant l'ADN viral se développaient sous forme de petites tumeurs discrètes et localisées. Chaque tumeur provenait d'un seul clone de lymphocytes B.

Ce modèle peut être résumé en 3 principales étapes :

- 1- l'activation et l'immortalisation des lymphocytes B par EBV : LMP1 et EBNA2, toutes deux impliquées dans le processus d'immortalisation, sont fortement exprimées dans le PTLD et peuvent contribuer à la lymphoprolifération en augmentant l'expression du facteur de croissance CD23 (264).
- 2- la progression de la lymphoprolifération causée par l'immunosuppression congénitale ou acquise : un agent immunosuppresseur comme la cyclosporine A (CsA) qui bloque spécifiquement l'activation des lymphocytes T cytotoxiques (119, 174), combiné à l'expression d'une protéine semblable à *Bcl-2* dans les lymphocytes infectés qui préviendrait l'apoptose chez ces derniers (270), pourraient mener à l'accumulation de ces lymphocytes.
- 3- la lymphoprolifération ainsi accélérée augmente grandement la chance qu'un événement génétique vienne de façon irréversible transformer les lymphocytes en cellules malignes. Bien que la translocation et l'activation subséquente de l'oncogène *c-myc* ne se produisent pas aussi fréquemment dans le PTLD (3.5 à 7.5% des PTLD étudiés chez les adultes (116, 132)) comparé au lymphome de Burkitt (19), celles-ci seraient néanmoins associées avec le développement de lymphomes malins ne répondant pas à une baisse de l'immunosuppression (132). L'activation d'autres oncogènes ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs pourraient également être impliquées.

B) Rôle des cytokines dans la pathogénèse du PTLD

La réponse cellulaire T cytotoxique est essentielle au contrôle de la prolifération des lymphocytes B infectés par EBV (82, 110, 201). La réponse immunitaire normale de l'hôte face à une infection par l'EBV est également associée à la production de cytokines dites Th1 (IL-2, IL-12, et IFN- γ) qui activent la cytotoxicité CD8. La production d'interféron- α (IFN- α) qui possède des propriétés antivirale et antiproliférative, stimule cette réponse et tend à inhiber la production de cytokines dites Th2 (IL-1, IL-4, IL-6, IL-10) qui stimulent la prolifération et la différenciation des lymphocytes B. Lorsque la réponse T cytotoxique est altérée comme c'est le cas chez les greffés, l'équilibre entre les cytokines Th1 et les cytokines Th2 est brisée au profit des cytokines Th2 (20, 140, 156, 157, 186, 226, 255).

Ainsi, l'IL-6 semble jouer un rôle très important dans la pathogénèse du PTLD (253). Celle-ci active les lymphocytes B et stimule la croissance des lymphocytes infectés par EBV (254). Les patients ayant développé un PTLD démontrent habituellement un niveau élevé d'IL-6 en circulation qui pourrait affecter davantage la réponse immunitaire en inhibant la cytotoxicité médiée par les cellules NK (255). Il a de plus été démontré que la CsA, utilisée à des doses croissantes, augmente la transcription du gène de l'IL-6.

L'IL-10 contribue également significativement à la progression d'un PTLD par sa capacité à promouvoir directement la prolifération des lymphocytes B infectés par EBV et à supprimer la réponse T cytotoxique (14, 49, 215). L'IL-10 semble être détectée dans la presque totalité des PTLD, dans les lignées lymphoblastoïdes et dans les lymphomes associés au SIDA en plus de se retrouver en haute concentration en circulation (186). De façon intéressante, le génome EBV possède un gène (BCRF1) dont la séquence est homologue à 70% à celle du gène de IL-10 humaine (37, 100, 257). EBV pourrait donc se servir de ce gène (v-IL-10) pour atténuer la réponse cellulaire T de son hôte et assurer ainsi sa survie.

L'IL-4 possède également la propriété de promouvoir la prolifération des lymphocytes B activés *in vitro* (20, 140, 143). Mais bien que des niveaux élevés d'IL-4

en circulation aient été observés chez des patients ayant développé un PTLD, son mécanisme d'action n'est pas encore connu.

Plusieurs équipes ont démontré que les cellules immortalisées par EBV sécrètent de l'IL-1 et l'utilisent comme facteur de croissance (255, 259). Mais bien que des niveaux sériques anormalement élevés d'IL-1 aient été démontrés chez des patients avec une mononucléose infectieuse aiguë (130), son rôle potentiel dans la pathogénèse du PTLD n'est pas encore reconnu (255).

C) Facteurs de risque dans le développement d'un PTLD

i- Le type et l'intensité de l'immunosuppression

L'emploi de n'importe quel immunosuppresseur affectant la réponse immunitaire cellulaire représente un risque pour le développement d'un PTLD. La CsA et le tacrolimus (FK506) ont été impliqués dans le développement de PTLD à cause de la capacité de ces agents immunosuppresseurs à inhiber la maturation de la réponse immunitaire T-dépendante incluant la génération des lymphocytes T cytotoxiques essentiels au contrôle de la prolifération des lymphocytes B infectés par EBV (13, 21, 38, 51, 119, 160, 174, 181, 233, 263).

Il a aussi été démontré *in vitro* que la CsA induit la transcription du gène de l'IL-6 (253, 263) et le relâchement du facteur de croissance CD23 soluble (qui influence la prolifération et la différenciation de ces même lymphocytes) (97) en plus d'inhiber la production d'IL-2 (qui bloque l'activation des lymphocytes T cytotoxiques) (119). Plusieurs mécanismes sont donc impliqués dans l'augmentation de la capacité lymphoproliférative des cellules B lors de l'utilisation d'agents immunosuppresseurs.

L'intensité de l'immunosuppression est également très importante. C'est pourquoi l'incidence du PTLD est beaucoup plus élevée durant la première année suivant la greffe puisque l'immunosuppression y est plus intense. L'utilisation de certains agents immunosuppresseurs tel que le tacrolimus, est associée à un risque de PTLD plus élevé que la cyclosporine (13, 21, 38, 51, 233). De plus, l'utilisation d'une triple thérapie (dans le but de réduire le niveau de toxicité de la CsA) qui combine la

CsA + stéroïdes + azathioprine, a également été associée avec un risque accru de PTLD chez les transplantés d'organes solides (24, 133, 269).

L'utilisation d'anticorps anti-lymphocytaire (OKT3, ALG/ATG) pour l'induction ou le traitement d'un rejet aigu après une transplantation d'organe solide, est également associée avec un risque élevé de PTLD (27, 180, 181, 196, 229, 233, 243, 256, 261). L'administration d'OKT3 (un anticorps monoclonal ciblant les cellules exprimant le déterminant CD3, soit les lymphocytes T) et/ou d'ALG/ATG (globulines anti-lymphocytaires ou anti-thymocytaires) intensifie de façon transitoire l'immunosuppression en provoquant la diminution du nombre et de la fonction des lymphocytes T circulants. Les patients qui reçoivent de l'ALG comme inducteur suivi d'OKT3 pour traiter un épisode de rejet résistant aux stéroïdes, ont donc une incidence de PTLD significativement plus élevée (34, 35).

ii- Le statut EBV en pré-greffe

Ho et al (95) ont été les premiers à constater que les receveurs d'organes solides séronégatifs pour EBV avant la transplantation étaient substantiellement plus à risque de développer un PTLD que ceux qui étaient séropositifs en pré-greffe. Plusieurs études ont par la suite confirmé une incidence augmentée de 24 à 33 fois de PTLD chez les patients à risque de faire une infection primaire suite à une transplantation d'organe solide (15, 35, 196, 225, 260, 261). La fréquence des PTLD s'élèverait à 11.5% après une infection primaire alors qu'elle n'est que de 3.6% après une réactivation virale (95). C'est ce qui explique l'incidence accrue de PTLD que l'on observe chez les transplantés pédiatriques puisque seulement 50% de ces derniers sont EBV séropositifs au moment de la greffe comparé à > 90% chez les adultes (16, 94).

iii- Le type d'organe transplanté

L'incidence du PTLD est reliée au type d'organe transplanté et à la nature et la sévérité du régime immunosuppresseur qui l'accompagne. Ainsi, les PTLD affectent environ 1% des receveurs de rein (124, 125, 154, 172), 2.1 à 2.8% des receveurs de foie

(51, 82, 154), entre 1.8 et 6.3% des receveurs de cœur (35, 51, 82, 278), entre 7 et 10% des receveurs de poumon (7, 51, 125), entre 5 et 10% des receveurs de cœur-poumon combinés (35, 82, 154) et jusqu'à 9% des receveurs de greffe intestinale (198).

Chez les transplantés pédiatriques, l'incidence augmente à 3.8% pour les greffes hépatiques (234), 1 à 8% pour les greffes rénales (86), 7.7 à 26% pour les greffes cardiaques (15-b, 278), et 27 à 32 % pour les greffes intestinales (55, 198).

iv- La stimulation antigénique chronique

La présence de différences antigéniques entre l'organe du donneur et du receveur peut induire une prolifération polyclonale des lymphocytes B prédisposant ainsi le receveur au développement d'un PTLD. La plus convaincante évidence supportant cette hypothèse nous vient des greffés de moëlle osseuse où l'incidence augmente avec le degré d'incompatibilité des HLA (59, 181, 227, 271). Mais il n'y a pas encore d'évidence directe que le degré d'incompatibilité des HLA chez les transplantés d'organes solides soit associé avec un risque accru de PTLD, même si ce dernier implique souvent l'organe greffé. Il a cependant été remarqué que l'apparition de hautes concentrations de certaines cytokines (telles que IL-1, IL-6, IL-10 ainsi que les lymphotoxines qui agissent comme facteurs de croissance pour les lymphocytes B transformés par EBV) dans l'organe greffé, et tout particulièrement durant un épisode de rejet, pouvait promouvoir de façon locale une lymphoprolifération (130, 186, 255, 259).

v- L'infection concomitante au cytomegalovirus (CMV)

Le fait que le CMV soit un facteur de risque additionnel dans le développement d'un PTLD n'est pas vraiment surprenant puisque CMV augmente l'incidence d'autres infections opportunistes (118, 138, 177, 219, 220, 262). De plus, il est lui-même immunosuppresseur tout comme les autres membres de la famille des virus herpès (62, 73, 205).

Il a été démontré qu'une incompatibilité pour CMV au niveau du statut du donneur et du receveur (receveur négatif / donneur positif) amplifie le risque de

développer un PTLD de plusieurs fois (16). De plus, si on combine un statut séronégatif pour EBV en pré-greffe / donneur +, un statut du receveur - / donneur + pour CMV et l'administration d'OKT3 pour traiter un épisode de rejet, ceux-ci agissent en synergie et font grimper l'incidence de PTLD de plus de 500 fois (260).

Une infection par les autres membres de la famille des Herpesviridae (HSV-1, HSV-2, HHV-6, HHV-7, HHV-8, et Varicella Zoster Virus) a également un effet immunosuppresseur marqué qui ne peut qu'augmenter le risque de développer un PTLD si l'infection primaire à EBV se produit au même moment (62, 205).

En conclusion, on peut aisément constater que plusieurs facteurs peuvent interagir et ainsi contribuer à briser l'équilibre entre l'EBV et son hôte, conduisant ainsi l'infection latente d'EBV établie dans les lymphocytes B à une lymphoprolifération incontrôlée avec des conséquences parfois fatales.

D) Diagnostic d'un PTLD

L'exactitude et la précocité du diagnostic d'un PTLD sont compliquées par la présentation clinique variée et par la difficulté de le différencier de d'autres complications pouvant survenir suite à une transplantation comme un épisode de rejet ou l'apparition d'infections opportunistes (CMV, *Aspergillus*, *Pneumocystis*). Le tableau VI énumère les diverses présentations cliniques que peuvent revêtir les PTLD.

La présentation clinique des PTLD varie selon le type d'organe transplanté, le régime immunosuppresseur utilisé et l'âge du patient (19, 40). Ainsi, chez les transplantés pédiatriques, les PTLD se présentent le plus souvent sous la forme d'un syndrome mononucléosique survenant tôt après la transplantation, soit dans le contexte d'une infection primaire à EBV ou suite à un traitement anti-rejet (OKT3) (196). De la fièvre, un mal de gorge, un mal de tête et une lymphadénopathie diffuse sont caractéristiques de cet état. Ces patients réagissent plutôt bien à une baisse de l'immunosuppression. Chez les patients plus âgés, les PTLD surviennent généralement plus tardivement et ont une prédilection pour l'organe transplanté menant à un mauvais fonctionnement de celui-ci (19).

Certains types d'organes semblent avoir une prédisposition pour le développement de PTLD (180), les poumons et les intestins venant au premier rang suivis des reins et du foie (154, 180, 192). Le cœur semble être quant à lui épargné (182).

Tableau VI Les diverses présentations cliniques des PTLD

- **Syndrome mononucléosique (fièvre, pharyngite, lymphadénopathie, myalgie, splénomégalie, pancytopenie, encéphalopathie)**
 - **État fébrile avec leucopénie**
 - **Altération de la fonction de plusieurs organes ou systèmes**
 - ◆ **tube digestif (gastro-intestinal) (douleur abdominale, saignement, symptômes d'obstructions et de perforations intestinales)**
 - ◆ **système nerveux central**
 - ◆ **organe transplanté**
 - ◆ **autres (ganglions, moëlle osseuse, reins, foie, poumons)**
 - **Maladie disséminée**
-

Malheureusement, plusieurs des signes et symptômes observés dans le cas d'un PTLD localisé peuvent également signifier un rejet du greffon (12, 40). Une biopsie doit alors être effectuée pour pouvoir discriminer un rejet d'un PTLD. Différents critères morphologiques et immunohistochimiques ont été établis pour permettre au pathologiste de les différencier (190, 214). La précision du diagnostic est très importante puisqu'un diagnostic de rejet mènera à une augmentation de l'immunosuppression, tandis qu'un diagnostic de PTLD suggèrera une baisse de l'immunosuppression. Ces proliférations,

diagnostiquées précocement, peuvent alors régresser et même disparaître (35, 82, 83, 154, 235).

Les greffés de moëlle osseuse sont plus à risque de développer un PTLD disséminé, surtout suite à un traitement anti-lymphocytaire dans le but de contrôler une GVHD («graft versus host disease») (59, 166, 168, 227). Le système nerveux central est alors fréquemment impliqué de même que plusieurs organes ou systèmes.

Les PTLD présentent également une hétérogénéité histologique très étendue. Il s'agit dans la plupart des cas de lymphomes de type B bien que quelques cas de lymphomes T aient été décrits (24). Ils peuvent varier de la prolifération polyclonale bénigne au lymphome monoclonal malin disséminé (154). Comme il a été précédemment décrit, la plupart des lymphomes seraient d'origine polyclonale puis, un clone ayant une croissance plus rapide émergerait, donnant naissance à un lymphome monoclonal plus agressif. Le terme «PTLD» représente donc le spectre des différents lymphomes qui progressent entre ces deux extrémités.

Plusieurs équipes ont proposé une classification des PTLD basée sur des paramètres histologiques, virologiques, immunologiques et cytogénétiques (29, 50, 84, 116, 117, 132, 154, 187). Cette classification divise les PTLD en 3 sous-groupes et ce, dans le but de mieux prévoir l'évolution clinique des différents types de lymphomes observés (tableau VII).

E) Traitements

L'approche thérapeutique utilisée dans le cas d'un PTLD demeure encore mal définie en 1999. Bien que de nombreuses études comportant des nombres limités de patients soient publiées chaque année, il n'existe toujours pas de protocole thérapeutique standardisé (67). Le tableau VIII énumère les différentes possibilités de traitements d'un PTLD.

Dès 1984, il a été observé qu'une **réduction de l'immunosuppression** pouvait mener à une régression complète du PTLD chez certains transplantés d'organes solides (35, 82, 83, 154, 235). Un épisode de rejet pouvant alors rapidement survenir, il est important de trouver le point d'équilibre pour traiter le PTLD et éviter un rejet.

Tableau VII Classification des PTLD

- I) Hyperplasie plasmocytaire (syndrome mononucléosique)
- prolifération polyclonale des lymphocytes B
 - pas de réarrangement d'un gène des immunoglobulines
 - n'affecte pas l'architecture de l'organe lymphoïde
- II) Lésions polymorphiques
- mélange de cellules lymphoïdes (de petites ou grandes tailles)
 - différenciation plasmocytaire
 - prolifération monoclonale de cellules contenant l'EBV
 - réarrangement monoclonal fréquent d'un gène des immunoglobulines
- III) Lésions monomorphiques
- réarrangement d'un gène des immunoglobulines
 - translocations associées aux lymphomes
 - prolifération monoclonale des cellules B/T
- ex : lymphome malin, myélome multiple
-

Chez les receveurs de moëlle osseuse avec déplétion du compartiment lymphocytaire T, une réduction de l'immunosuppression est impossible. Le développement d'un PTLD chez ces patients a été clairement associé au nombre constamment bas de cellules T (59). Pour faciliter le rétablissement de la réponse cellulaire spécifique à EBV, des préparations cellulaires de **lymphocytes T cytotoxiques spécifiques à EBV** provenant des leucocytes du donneur, ont été infusées chez des greffés de moëlle osseuse (92, 93, 114, 166, 167, 168, 208, 211, 212). Cette approche s'est avérée très efficace et très sécuritaire avec l'établissement d'une réponse

T cytotoxique spécifique fonctionnelle persistant pour aussi longtemps que 18 mois chez le receveur de moëlle (92). Ce traitement n'est cependant pas utilisé chez les receveurs d'organes solides où les cellules tumorales originent habituellement du receveur (52). Un traitement alternatif consiste à stimuler *in vitro* des **lymphocytes tueurs autologues (LAK)** et à les ré-injecter au patient (155, 168, 191). Mais les résultats préliminaires dans ce dernier cas se sont avérés décevants.

Tableau VIII Diverses options thérapeutiques pour traiter un PTLD

- **Baisse de l'immunosuppression**
 - **Traitement chirurgical**
 - **Traitement antiviral**
 - ◆ **acyclovir**
 - ◆ **ganciclovir**
 - ◆ **foscarnet**
 - **Traitement immunomodulateur**
 - ◆ **interféron α**
 - ◆ **gammaglobulines**
 - **Thérapie cellulaire**
 - ◆ **infusion de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques à EBV**
 - ◆ **infusion de lymphocytes tueurs autologues**
 - **Anticorps monoclonaux anti-lymphocytes B**
 - ◆ **anti-CD21, anti-CD24, anti-CD20, anti-CD37, anti-CD38**
 - **Traitement par chimiothérapie et radiothérapie locale**
-

La valeur des **agents antiviraux** dans le traitement de PTLD demeure controversée (12, 40, 66, 121, 169). L'acyclovir et le ganciclovir agissent après phosphorylation en inhibant *in vitro* l'ADN polymérase virale (44). La réplication des formes linéaires d'EBV (phase lytique) est inhibée mais la réplication des formes plasmidiques virales (phase latente habituellement observée dans les PTLD) ne l'est pas (43, 81, 276). L'utilisation de tels agents préviendrait donc l'infection de d'autres lymphocytes B au repos, limitant ainsi le nombre de lymphocytes infectés jusqu'à ce que la réponse immunitaire de l'hôte soit en mesure de reprendre le contrôle. Pendant le traitement antiviral, on observe fréquemment une disparition de l'excrétion salivaire d'EBV. Cependant, elle réapparaît à l'arrêt du traitement (2 à 7 jours plus tard pour l'acyclovir et 21 jours plus tard pour le ganciclovir) (24, 44). Le foscarnet, un autre inhibiteur de l'ADN polymérase virale est également utilisé dans certains cas (169).

L'interféron α (IFN- α) et les gammaglobulines intraveineuses (IVIG) sont utilisés comme traitement immunomodulateur (31, 226). En plus d'avoir une activité antivirale et antiproliférative, l'IFN- α semble promouvoir un environnement favorable pour l'expression des cytokines Th1 (53) ce qui viendrait corriger la réponse immunitaire anormale démontrée chez les transplantés qui développent un PTLD et qui suggère un environnement Th2 chez ces patients (20, 143, 157, 186, 255). Le mécanisme exact par lequel les IVIG agissent n'est pas connu, mais celles-ci pourraient augmenter la lyse des cellules infectées par ADCC (226).

Des **anticorps monoclonaux** (anti-CD20, anti-CD21, anti-CD24, anti-CD37 et anti-CD38) ont également été utilisés dans le traitement de PTLD (54, 56, 120, 123). Leur bienfait est toutefois difficile à évaluer compte tenu qu'ils sont généralement utilisés en combinaison avec d'autres traitements (i.e. réduction de l'immunosuppression). L'anticorps anti-CD38 permettrait entre autre d'obtenir de bons résultats en raison de la présence constante de ce marqueur à tous les stades de différenciation cellulaire des lymphocytes B.

Dans certains cas, une réduction de l'immunosuppression a été combinée à la **chirurgie** soit pour extraire une tumeur localisée, ou pour contrôler des complications locales comme un saignement ou une perforation gastro-intestinale due à un PTLD, ou tout simplement pour retirer lorsque possible (i.e les reins), l'organe envahi (12, 24, 154, 182).

La radiothérapie et la chimiothérapie sont utilisées dans les cas les plus sévères dont les PTLD monoclonaux ne répondant pas aux traitements conventionnels, et atteignant souvent le système nerveux central (12, 24, 32, 244).

F) Prévention

La meilleure stratégie pour contrôler le développement d'un PTLD est la prévention (tableau IX) (67, 225). En plus de maintenir le degré d'immunosuppression le plus bas possible, il est primordial de pouvoir diagnostiquer le plus précocement possible la survenue d'un PTLD. Les patients à risque étant les patients EBV séronégatifs en pré-greffe, les patients sévèrement immunosupprimés et les patients susceptibles de faire une infection concomitante à CMV, une quantification régulière de la charge virale sanguine devrait être effectuée chez ces derniers de même qu'un examen attentif des biopsies du greffon.

De plus, si une séroconversion ou une apparition de génomes EBV dans le sang périphérique ou dans la salive est observée, l'utilisation d'anticorps anti-lymphocytaires (OKT3, ALG/ATG) est fortement déconseillée pour traiter un rejet qui surviendrait au même moment puisque ceux-ci sont associés avec une incidence accrue de PTLD (260).

Dans le cas des greffés de moëlle, une autre stratégie possible est de reconstituer le plus vite possible la réponse cytotoxique spécifique à EBV en infusant des cellules T cytotoxiques ou des LAK. L'utilisation de cellules dendritiques autologues génétiquement modifiées pour présenter les antigènes viraux aux cellules T est également à l'étude et pourrait bientôt constituer une autre alternative intéressante (182).

Tableau IX Stratégies pour prévenir la survenue d'un PTLD

- **Degré d'immunosuppression au plus bas niveau possible**
 - **Diagnostiquer le plus tôt possible la survenue d'un PTLD**
 - **Identifier les patients à risque**
 - **Surveiller la charge virale sanguine ou la présence d'EBV dans les biopsies du greffon**
 - **Reconstituer la réponse T cytotoxique spécifique à EBV le plus tôt possible**
-

4) Méthodes de détection virale

Les méthodes de détection virale peuvent être séparées en 2 groupes, soient les méthodes de détection directe [morphologiques (hybridation *in situ*) versus non-morphologique (PCR)] et les méthodes de détection indirecte (sérologie).

A) Méthodes de détection directe

a) Les méthodes morphologiques

L'hybridation *in situ* (HIS) et l'immunohistochimie (IHC) présentent toutes deux l'avantage de préserver la morphologie des cellules étudiées. On peut donc par ces méthodes, déterminer la nature exacte des cellules infectées. Ces méthodes recherchent la présence du génome EBV (par HIS) ou l'expression de protéines virales (par IHC).

i) L'hybridation *in situ*

C'est incontestablement la méthode de référence la plus utilisée (6, 78, 79, 80, 99, 146, 147, 152, 153, 164, 188, 189, 194, 199, 267, 274). Les sondes d'ADN ou d'ARN utilisées sont marquées de façon isotopique (^3H ou ^{35}S) ou non-isotopique (biotine ou digoxigénine), cette dernière étant plus rapide bien que moins sensible (8, 74). L'hybridation avec une sonde non-isotopique est révélée par différentes méthodes histochimiques ou immunohistochimiques utilisant la phosphatase alcaline comme intermédiaire couplée à différents substrats.

Les sondes d'ARN utilisées pour rechercher les transcrits EBERs semblent être les plus sensibles compte tenu du grand nombre d'exemplaires (10^6 copies) de ces ARNs dans la cellule infectée de façon latente (3, 6, 18, 74, 99, 237, 265, 274). On obtient donc un signal nucléaire important après hybridation. Ces sondes sont utilisées sur des frottis de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) ou sur des coupes de tissus fixées par les procédés de routine. Ces méthodes de fixation n'affectent pas l'hybridation, et du matériel archivé, même ancien, peut être utilisé (105). Il est

cependant nécessaire d'utiliser des sondes contrôles pour s'assurer de la bonne conservation des ARNs messagers.

Ainsi, il a été démontré par hybridation *in situ* sur des biopsies de foie (188) ou des frottis de PBMC (152) provenant de transplantés hépatiques, que l'apparition de cellules EBER-positives précédait le développement de PTLN, et qu'un nombre croissant de ces cellules pourrait être un marqueur de personnes à risque.

Des sondes d'ADN sont également utilisées, soient les sondes *Bam*H1W (47, 79, 153, 189, 267) et BHLF1 (3, 6, 18). Elles ont cependant le désavantage d'être moins sensibles (26, 40) que les sondes EBERs. La sonde *Bam*H1W (3 kpb) reconnaît le segment répétitif interne IR-1 du génome EBV. Ce fragment étant répété de 8 à 12 fois dans le génome EBV, la sensibilité de la sonde s'en trouve donc augmentée (8, 47, 74). Des ARNs du cycle lytique d'EBV peuvent également être ciblés par un mélange d'oligosondes (3 sondes d'environ 30 pb) dessinées à partir du gène lytique précoce BHLF1 (3, 6, 17). Une réaction de polymérase en chaîne *in situ* (PCR *in situ*) précédant l'hybridation avec ces sondes ADN pourrait par contre les rendre aussi sensibles que les sondes EBERs (74).

ii) L'immunohistochimie

La détection des antigènes viraux *in situ* par l'intermédiaire d'anticorps monoclonaux peut également être utilisée pour détecter la présence d'EBV dans des cellules infectées (4, 47, 79, 90, 96, 147, 175, 194, 195, 199). La détection se fait alors par la méthode APAAP (alcaline-phosphatase combinée à un anticorps anti-alcaline-phosphatase) ou par la technique d'immunopéroxydase standard.

Dans la majorité des pathologies associées à l'EBV, le virus est présent sous sa forme de latence. C'est pourquoi les anticorps monoclonaux les plus utilisés sont dirigés contre les protéines virales de latence. Parmi eux, l'anticorps monoclonal Cs1-4 α LMP1 est le plus utilisé. Il regroupe 4 anticorps ciblant 3 épitopes différents de LMP1 (8, 105). Il donne un marquage cytoplasmique et/ou membranaire et il a une bonne spécificité. Sa sensibilité est toutefois moindre que celle de l'HIS utilisant la sonde EBER, puisque LMP1 n'est pas exprimé dans toutes les formes de latence (la forme de

latence de type 1 n'exprime qu'EBNA1). Ainsi, une réaction négative n'élimine pas nécessairement la présence d'EBV.

Les protéines de latence EBNA1 et EBNA2 peuvent également être détectées (47, 90, 162, 175, 195), mais leur sensibilité envers certaines méthodes de fixation fait en sorte que de meilleurs résultats sont obtenus sur du matériel congelé, frais. Actuellement, seule la protéine LMP1 peut être étudiée sur tissus fixés et montés en paraffine (8, 105).

Des anticorps monoclonaux existent également contre les protéines de réplication précoces (ZEBRA et EA) et tardives (VCA et MA), mais ceux-ci sont préférentiellement utilisés sur du matériel congelé, et sont d'usage plus restreint (8, 17, 162, 176).

Il est également possible d'effectuer un double marquage en combinant l'HIS et l'IHC. En utilisant des marqueurs de lignées cellulaires, on parvient ainsi à déterminer la nature exacte des cellules infectées (6, 17, 91, 162, 164, 188, 265, 273).

b) Les méthodes non-morphologiques

La réaction de polymérase en chaîne (PCR) et le Southern blot nous permettent de détecter la présence du génome EBV à partir de l'ADN extrait de PBMC ou de tissus (biopsies) sans nous permettre cependant de déterminer si l'ADN viral est présent dans des cellules B normales infectées ou dans des cellules tumorales.

i) La réaction de polymérase en chaîne (PCR)

Le PCR est une réaction d'amplification génique rapide, sensible et très spécifique. Elle a d'abord été utilisée à des fins épidémiologiques pour étudier la transmission virale puisque les deux souches d'EBV (EBV-1 ou EBV-2) peuvent être différenciées en amplifiant une région codante du gène EBNA2 responsable de ce polymorphisme (3, 74, 231).

Le principal inconvénient de cette technique est justement sa grande sensibilité qui en pratique, impose beaucoup de rigueur et de précautions afin d'éviter

les contaminations possibles, et qui de plus nous permettrait en théorie, de détecter une infection sans conséquence, comme une infection latente des lymphocytes B par EBV chez un individu séropositif, immunocompétent. C'est pourquoi, beaucoup d'efforts ont été fournis par plusieurs équipes dans le but d'étudier l'activité d'EBV dans les PBMC (10, 23, 65, 68, 109, 113, 134, 135, 137, 140, 204, 209, 217, 224, 237, 248, 258), et dans le plasma (58, 113, 129, 237, 275) pour ainsi pouvoir déterminer une charge virale qui serait un marqueur prédictif positif pour le développement d'un PTLD.

À partir des études publiées, on note 3 différentes façons d'utiliser le PCR pour détecter la présence de l'ADN d'EBV :

- 1- **PCR qualitatif** : permet de vérifier la présence ou l'absence du virus à partir d'une biopsie (178), de sérum (129) ou d'ADN extrait de PBMC (248) sans qu'aucune quantification ne soit effectuée.
- 2- **PCR semi-quantitatif** : effectué à partir de dilutions sériées du nombre de PBMC ou de l'ADN extrait de PBMC. On obtient alors un nombre approximatif de génomes viraux présents dans l'échantillon (109, 134, 135, 207, 209, 224, 258). Il a ainsi été démontré qu'on pouvait compter entre < 1 et 50 PBMC infectés par EBV / 10^6 PBMC totales chez un individu séropositif immunocompétent (258). Lors d'une infection primaire ou d'une mononucléose infectieuse, une élévation de 10 à 1000 fois cette charge virale est observée (137, 204). En étudiant de cette façon la charge virale des receveurs d'organes solides, Riddler et al. (204) suggèrent de considérer à risque les greffés qui démontrent une charge virale > 500 copies de génomes EBV / 10^5 PBMC combinée à une absence ou une diminution des titres d'anticorps anti-EBNA. Dans une population de transplantés de moëlle osseuse (GMO), Rooney et al. (209) ont trouvé une corrélation significative entre une charge virale $> 20\ 000$ copies de génomes EBV / μg d'ADN (extrait de PBMC) et le développement d'un PTLD. Des individus séropositifs sains utilisés comme population contrôle démontraient une charge virale entre 20 et 2000 copies de génomes EBV / μg ADN. Bien qu'ayant obtenu des résultats semblables chez leur population de GMO, Lucas et al. (135) ont observé qu'il y avait également des patients transplantés (5 patients sur 8) qui démontraient des charges virales très élevées ($> 40\ 000$ copies de génomes

EBV / μg d'ADN de PBMC), parfois même de façon persistante, sans pour autant développer de PTLD.

- 3- **PCR quantitatif** : mesure de façon précise la quantité de génomes viraux présents par μg d'ADN extrait de PBMC. Deux types de PCR quantitatifs sont utilisés pour mesurer l'infection par EBV: le PCR compétitif (10, 11, 51, 217, 237) et le PCR en temps réel (113, 165). Au cours d'un PCR compétitif, une molécule cible compétitrice de concentration connue est introduite dans la réaction et compétitionne avec la séquence virale (si présente) pour les amorces, la polymérase et les nucléotides. Ce fragment d'ADN compétiteur est souvent un cDNA fabriqué qui s'hybridera aux mêmes amorces que le génome viral, mais qui permettra l'amplification d'un fragment de longueur différente ou contenant un site de restriction différent. Suite à l'amplification, la quantification de l'ADN viral présent sera faite en comparant la quantité d'ADN viral amplifié à la quantité d'ADN compétiteur connue. Ainsi, Rowe et al. (217) ont démontré qu'avec une charge virale > 200 copies de génomes EBV / 10^5 PBMC utilisée comme valeur prédictive positive pour le développement d'un PTLD chez les transplantés d'organes solides, ils obtenaient une sensibilité et une spécificité de 92.8% et 100% respectivement. Le PCR en temps réel mesure l'accumulation des produits de PCR (amplicons) à l'aide d'une sonde fluorescente et d'un laser incorporé au cycleur thermique. La réaction de PCR s'effectue dans une plaque de 96 puits ou de petits capillaires scellés et aucun amplicon n'est par la suite manipulé, réduisant ainsi les risques de contamination. Des résultats sont alors possibles en une seule journée. En utilisant cette technique, le groupe de Kimura et al. (113) ont obtenu des charges virales moyennes de $10^{3.7}$ copies de génomes EBV / μg d'ADN de PBMC pour des patients ayant développé un PTLD contre $10^{1.3}$ copies de génomes / μg d'ADN de PBMC chez des patients transplantés ne présentant aucun symptôme relié à une infection à EBV. En utilisant une valeur de $10^{2.5}$ copies de génomes / μg d'ADN de PBMC comme critère d'une infection symptomatique à EBV, ils obtenaient une valeur prédictive positive et négative de 93% et 83% respectivement comparée à 69% et 100% pour un PCR qualitatif à partir d'ADN extrait de PBMC (250 ng), et à 92% et 83% pour un PCR qualitatif à partir du plasma (50 μl).

ii) Le Southern blot

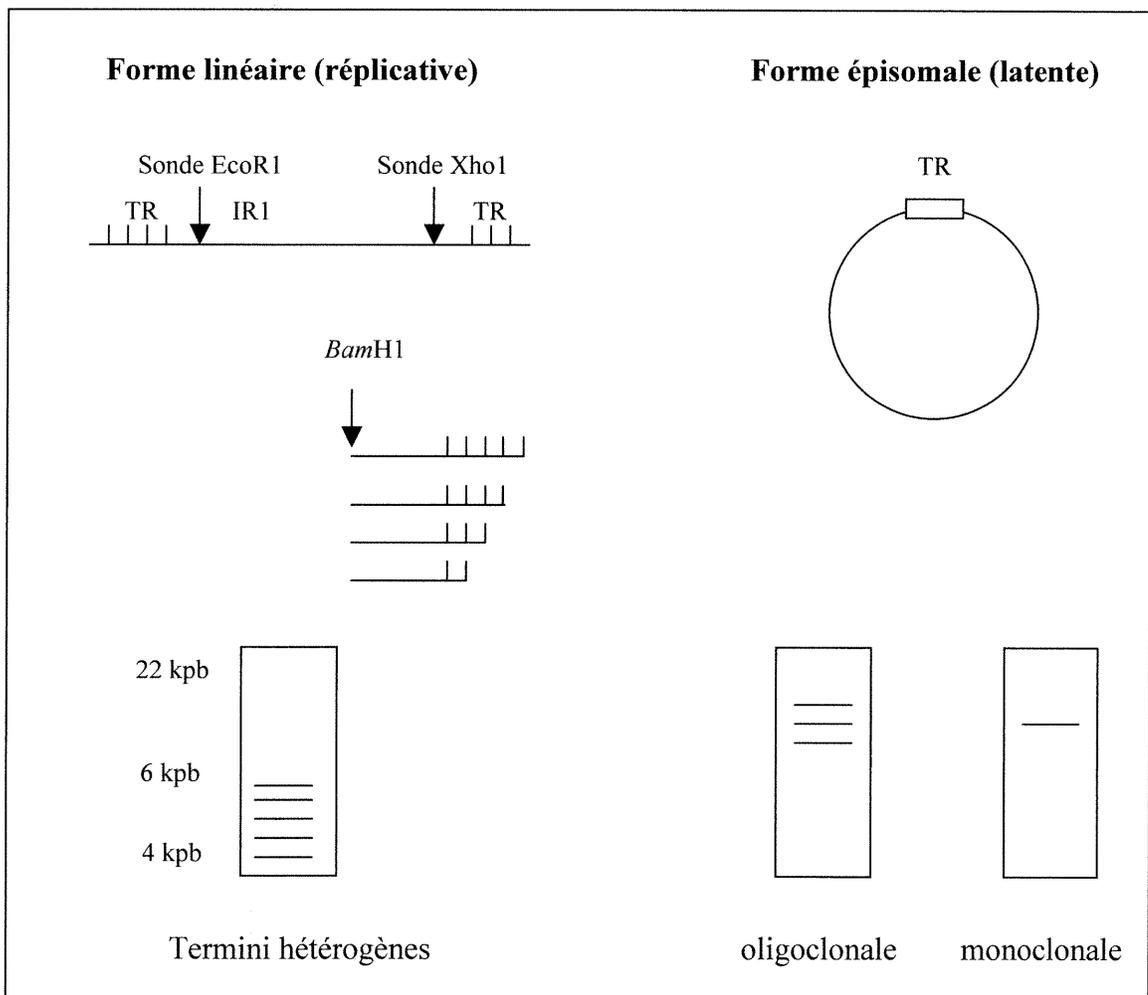
Le Southern blot peut être utilisé pour détecter l'ADN d'EBV dans les PBMC ou les tissus humains. Celui-ci n'est cependant pas très sensible puisque l'ADN viral se trouve dilué dans l'ADN cellulaire total et requiert une bonne quantité et une bonne préservation de l'ADN extrait (105). La sensibilité de l'essai peut être quelque peu augmentée en utilisant la sonde *BamH1W* qui cible une région répétée de 8 à 12 fois dans le génome EBV (8). Bien que le niveau de sensibilité d'un Southern blot (environ 1 génome EBV / 100 PBMC) ne nous permet pas de détecter une infection latente (environ 1 génome EBV / 10^6 PBMC) chez un individu sain immunocompétent, il est tout de même en mesure de détecter la présence d'EBV dans toutes les tumeurs qui lui sont associées (74).

C'est pourquoi le Southern blot a surtout été utilisé dans 2 buts. Il permet dans un premier temps de déterminer la clonalité des cellules infectées présentes dans différentes biopsies de tumeurs ou lymphomes associés à EBV (3, 18, 33, 74, 173, 185). En effet, lorsque le virus infecte une cellule et y établit un cycle de latence, il se circularise en fusionnant ses extrémités composées de séquences répétées (500 pb) dont le nombre est unique pour chaque cellule infectée. Lorsque toutes les cellules d'une tumeur comportent la même configuration épisomale, la tumeur est dite monoclonale et elle originerait d'une seule cellule transformée qui aurait donné naissance à un clone tumoral. Donc, après digestion de l'ADN extrait de tissus tumoraux avec l'enzyme de restriction *BamH1*, migration sur gel d'agarose, transfert sur membrane de nylon et hybridation avec une sonde située près d'une des extrémités du génome viral, une seule bande serait alors visible (figure 4). Le LB et le CN (185) sont majoritairement monoclonaux alors que le LH (4, 17, 268) peut être monoclonal ou oligoclonal. Dans les PTLD, une ou plusieurs configurations épisomales peuvent être retrouvées conformément à la nature monoclonale ou oligoclonale des lésions retrouvées chez les transplantés (33).

Le Southern blot permet également de distinguer la forme latente (épisomale) du virus de sa forme répliquative (linéaire) (69, 74, 108, 185, 195). En effet,

après digestion de l'ADN viral avec l'enzyme de restriction *Bam*H1, le profil électrophorétique démontre un fragment unique de haut poids moléculaire dans le cas d'une infection latente et une échelle de petits fragments dans le cas d'une infection lytique (figure 4).

Figure 4 Étude de la structure des termini du génome EBV par Southern blot pour déterminer la clonalité des cellules infectées



B) Les méthodes de détection indirecte

- La sérologie EBV

L'utilisation de la sérologie pour mesurer la réponse humorale d'un patient transplanté suite à une infection par l'EBV est compliquée par une réponse humorale souvent retardée et par la présence d'anticorps transmis passivement lors de transfusions de produits sanguins ou lors d'injections d'immunoglobulines.

Ainsi, suite à une transplantation de moëlle osseuse où les greffés peuvent recevoir jusqu'à deux fois leur volume sanguin en plasma exogène par semaine, la présence d'anticorps VCA et EBNA transmis passivement peut aisément être détectés. Chez la plupart des receveurs de moëlle, lorsque les transfusions de produits sanguins sont arrêtées, ces anticorps seront graduellement remplacés par des anticorps nouvellement synthétisés (46, 63, 122). Ainsi, on peut observer une baisse graduelle sur 2 à 4 mois des anticorps VCA IgG et EBNA à des niveaux bas ou indétectables, puis les titres d'anticorps VCA IgG augmentent rapidement pour atteindre des titres anormalement élevés qui persisteront plusieurs mois. Chez certains patients, les anticorps EA IgG augmentent ensuite pour atteindre des titres bas à modérés, tandis que les anticorps EBNA n'apparaissent que beaucoup plus tardivement et à de très faibles titres. Il est intéressant de noter que lors d'une infection primaire suite à une transplantation de moëlle osseuse d'un donneur séropositif à un receveur séronégatif, les anticorps hétérophiles ainsi que les anticorps VCA IgM n'apparaissent pas chez ces patients (122). La présence d'anticorps transmis passivement semble donc prévenir le patient contre les effets d'une infection primaire, mais ne préviendrait pas l'établissement d'une infection latente.

De façon générale, chez les transplantés d'organes solides, les anticorps VCA IgM ainsi que les anticorps hétérophiles n'apparaissent pas de façon constante (95). Les titres d'anticorps VCA IgG et EA IgG augmentent suite à la transplantation (28, 139, 171, 207, 234) alors que les anticorps EBNA tendent à décroître voire même disparaître (28, 183, 204).

II

ARTICLE

Epstein-Barr virus early antigen serology and viral load as prognostic markers for lymphoproliferative disorders in pediatric solid organ transplant patients.

Linda Carpentier¹

Bruce Tapiero²

Fernando Alvarez³

Carole Viau³

Carolina Alfieri¹

¹Department of Microbiology and Immunology (Pediatric Research Center) and University of Montreal, and the Department of Pediatrics divisions of ²Infectious Diseases and ³Gastroenterology, Sainte-Justine Hospital, Montreal, Quebec, Canada

Word count (abstract): 176

Word count (text): 5292

Running head: Prognostic markers for EBV PTLD

Ce manuscrit a été préparé pour être soumis au «Journal of Infectious Diseases».

This work was presented in part at the 14th (May 1998) and 16th (May 2000) Annual Clinical Virology Symposia (abstracts S6 and T37, respectively) and at the Molecular Virology Workshop (May 1999), Clearwater Beach, FL, as well as at the «XXV^e Congrès Annuel de l'Association des Médecins Microbiologistes-Infectiologues du Québec» (June 2000) (abstract #24), Quebec (Qc), Canada.

This work was supported by a studentship award from the FCAR (Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche) to LC, and by a grant (no XG99-130) from the Hospital for Sick Children Foundation to CA.

Address reprint requests to: Dr C. Alfieri
Sainte-Justine Hospital, Research Center
3175 Côte Ste-Catherine Road
Montreal (Qc) Canada
H3T 1C5
Phone: (514) 345-4931 (6135)
Fax: (514) 345-4801
e-mail address: calfieri@justine.umontreal.ca

ABSTRACT

Effective preemptive therapy for post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD) depends on the availability of reliable markers for assessing PTLD risk. Epstein-Barr virus (EBV) load determination in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), while valuable as a negative predictor of PTLD, is less useful as a positive predictor. Early antigen (EA) serology, another indicator of active EBV infection, was therefore examined in parallel with viral load in order to evaluate its prognostic value in evaluating PTLD risk. Our study group consisted of 26 pediatric solid organ transplant patients six of whom had high viral load and developed PTLD. Of the remaining 20 patients, 14 showed high levels of circulating EBV DNA without developing PTLD, while six patients had low viral load and no PTLD. None of the patients who developed PTLD demonstrated significant EA IgG titers. However, among the 14 patients without PTLD who showed evidence of high viral load, 13 demonstrated persistently high titers of EA IgG. Viral load analysis combined with EA serology therefore constitutes a potentially useful prognostic indicator for the development of PTLD.

INTRODUCTION

The Epstein-Barr virus (EBV) is an opportunistic pathogen in the immunocompromised patient population [1-6]. These patients become prone to B-cell lymphoproliferative disease, a malignant tumor arising from uncontrolled expansion of EBV-infected B cells. Transplant patients are particularly at risk due to aggressive immunosuppressive medication given to control graft rejection [7-9]. The incidence of post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD) is variable ranging from 1% to over 32% depending upon the organ transplanted, the nature and/or severity of the accompanying immunosuppressive regimen, and EBV serostatus prior to transplant [10-22]. Because approximately 50% of children are EBV-seronegative, compared to 90% of adults, pediatric transplant patients would be twice as likely to develop PTLD [23, 24].

Diagnosis of PTLD is often challenging because of the difficulty in distinguishing this syndrome from rejection [25-27]. Clinical symptomatology (including microscopic evaluation of biopsied tissue) is similar in both cases. However, because diagnosis of PTLD would necessitate a decrease in immunosuppressive medication, while diagnosis of rejection would demand the opposite, i.e. a more intensive immunosuppressive regimen, proper patient management relies on accurate laboratory markers to distinguish PTLD from rejection. Also, if preemptive therapy is to be adopted as an efficacious method of preventing PTLD, then reliable markers for assessing PTLD risk must be sought.

In 1994, our laboratory developed a culture and PCR-based test for evaluation of EBV load in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of transplant patients [28]. Our experience and that of other investigators [29-31] indicates that viral load determination in PBMC, while valuable as a negative predictive marker of PTLD, is less useful as a positive predictive marker. It was therefore necessary to seek other parameters which could be used in conjunction with viral burden in order to better predict the risk for development of EBV-induced PTLD.

We sought to analyse EA serology for two reasons: 1) as with increased EB viral load, the presence of antibody to EA is seen as a marker of active EBV infection [32-33], and 2) EA serology is regularly requested as part of the evaluation and follow-up of our pediatric transplant patients. Our objective was therefore to retrospectively evaluate EA serology in all patients with high viral load assessments and to determine whether EA titers differed quantitatively in the group that developed PTLD compared with the group that did not.

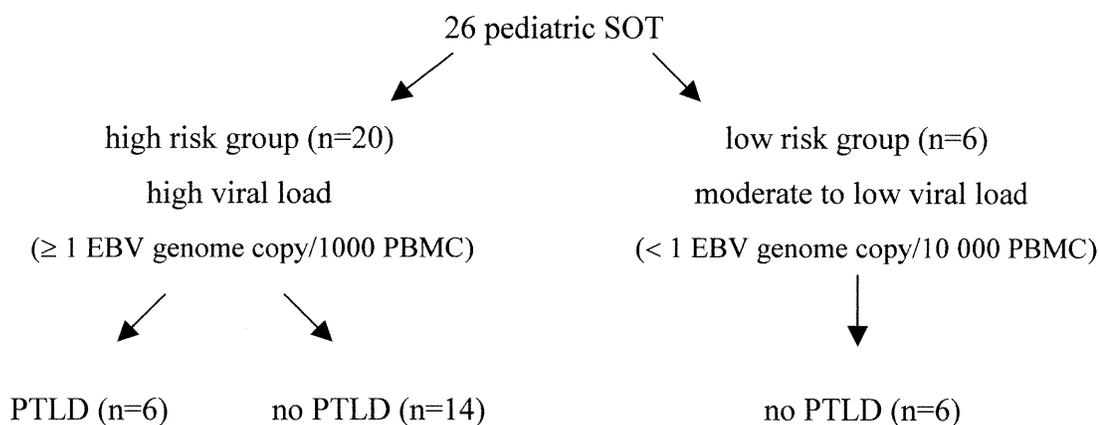
MATERIALS AND METHODS

Patient selection

This study involved a retrospective analysis of pediatric solid organ transplant (SOT) patients followed at Sainte-Justine Hospital since 1991 to the end of 1999. During this period, 84 livers, 60 kidneys and 23 hearts were transplanted in pediatric recipients ranging in age from 10 months to 19 years. Our analysis also included samples collected for a prior study [28]. Thus all samples collected prior to 1994 were taken at 0, 3, 6 and 12 months post-transplant. Thereafter, the protocol at Sainte-Justine Hospital was changed such that high risk patients (D+/R-) were sampled at 1-2 week intervals from 1 month to 6 months post-transplant and according to clinical evolution thereafter. All samples were tested for EB viral load and EA serology as described below. A total of 331 blood specimens were processed for the 26 patients studied.

At the start of our study, it was convenient to simply define risk in relation to viral load. Thus, with reference to our former study [28], we set the high risk standard at ≥ 1 EBV genome copy / 1000 PBMC. Twenty-six were selected based on their demonstration of a high relative risk for PTLD development, as determined by EB viral load analysis (see below). These patients were followed for an average of 15.1 months [1.5 - 44.0 months] after SOT. The group of 26 patients consisted of 23 liver, two kidney and one heart transplant recipients. The clinical profiles for all patients are summarized in Table 1. The patients were divided into three groups: 1) patients with high levels of circulating EBV who developed PTLD (six patients), 2) patients with high levels of circulating EBV who did not develop PTLD during the period of study (14

patients), and 3) control patients with moderate to low levels of circulating EBV who did not develop PTLD during the period of study (six patients).



Immunosuppression protocol

Until 1998 all patients received initial immunosuppression with intravenous cyclosporine, azathioprine (imuran) or mofetil mycophenolate (MMF) in renal transplant patients and prednisone (solumedrol). Oral cyclosporine was introduced at the end of the first week divided into three daily doses. Initial trough cyclosporine levels were adjusted to 350-400 ng/ml in the first two weeks, 250-300 ng/ml from week two to week four, with tapering to 100 to 150 ng/ml after the third month. In 1998 the use of intravenous cyclosporine was abandoned in favor of oral or nasogastric administration of Neoral on the first post-operative day. Azathioprine was administered at a dose of 1-2 mg/kg/day according to the leukocyte count and was continued long-term. Prednisone was tapered to 0.3 mg/kg/day by the end of the first month. In patients with normal transaminases an alternate day prednisone regimen was achieved by six months and corticosteroids were discontinued at one year.

Acute cellular rejection episodes were all documented by biopsy before therapy (bolus intravenous methylprednisolone 600 mg/m² for three consecutive days followed by weaning to 2 mg/kg/day prednisone over 7-10 days). Six patients were switched from cyclosporine to FK506 for refractory acute rejection in two cases (patients 18 and 20), chronic rejection in three cases (patients 3, 5, 11), or as preemptive therapy for rejection in one case (patient 10) (see Table 2).

Monoclonal or polyclonal antilymphocytic preparations (OKT3, ALG or ATG) were used for induction therapy in three patients (patients 1, 24 and 25) or for rejection therapy (patients no 1, 2, 3 and 11) (see Table 2).

DNA preparation from peripheral blood mononuclear cells

Approximately 2 ml of peripheral blood was collected and processed as previously described [28]. Briefly, PBMC were isolated by standard density centrifugation using Ficoll-hypaque solution (Pharmacia Biotech Inc, Baie d'Urfé, Qc). The cells were pelleted, washed twice in phosphate-buffered saline and stored at -20°C in aliquots containing 1×10^6 cells. The cell pellet was resuspended in deionized water to an initial concentration of 50 000 PBMC per 20 μl , boiled for 10 minutes and cooled on ice. All PBMC samples were initially screened for EBV DNA by amplifying three times 50 000 cells (qualitative PCR test). Once the amplification reaction attained a positivity rate of ≥ 1 EBV genome copy / 50 000 PBMC, then the cell suspension was further diluted to permit amplification of 10 000 and 1000 cells per tube. A positive sample by the qualitative test (≥ 1 EBV genome copy / 50 000 PBMC) would henceforth be assayed by the semiquantitative test whereby $1 \times 50\,000$, $2 \times 10\,000$ and 2×1000 cells would be amplified.

PCR assay

The primer pair and the oligonucleotide probe were generated from the BMLF1 region of the EBV genome as described by Pedneault et al [34]. This region encodes a viral early antigen and is highly conserved among EBV strains. The predicted sequence length of the amplified product is 304 base pairs. The PCR reaction was performed in duplex with a second set of primers previously described by Scharf et al [35], namely GH26 and GH27, which define a DNA fragment within the HLADQ α gene yielding a 242 base-pair segment to indicate the presence of cellular DNA.

PCR amplification of EBV DNA was performed on each sample based on the method described by Savoie et al [28]. Briefly, the reaction mixture (100 μl) contained 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl $_2$, 200 μM each deoxynucleotide triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dUTP) (Applied Biosystems, Mississauga, ON) and

100 pmol each of the four oligonucleotide primers (Armand-Frappier Institute, Laval, Qc). The mixture was overlaid with 75 µl mineral oil and 20 µl of template DNA (cell suspension) was added through the oil along with 1 U uracyl DNA-glycosylase enzyme (UDG) (Life Technologies, Burlington, ON) to prevent PCR carry-over. The reaction mixture was then incubated at 37°C for 10 minutes and thereafter heated at 94°C for another 10 minutes. The tubes were cooled on ice and 2.5 U *Taq* polymerase (Life Technologies) was added to each tube. DNA amplification was carried out in a Perkin-Elmer 480 thermal cycler for 35 cycles consisting of 1 minute denaturation at 94°C, 1.5 minutes annealing at 55°C and 1.5 minutes elongation at 74°C. After the last cycle, primer extension was continued for 10 minutes to allow all templates to be completed.

Detection of amplified products by Southern blot hybridization

A volume consisting of 10 µl of each amplified product was loaded onto a 1.8% agarose gel containing ethidium bromide. After electrophoresis, the gel was treated with alkaline denaturing solution, neutralized, and then passively transferred in SSC overnight onto a positively charged nylon membrane (Roche Diagnostics, Laval, Qc). The membrane was prehybridized for 3 hours at 65°C in hybridization buffer (5 X SSC, 1% (wt/vol) blocking reagent (Roche Diagnostics), 0.02% (wt/vol) SDS and 0.1% (wt/vol) N-laurylsarcosine (Sigma-Aldrich Canada Ltd, Oakville, ON)). Hybridization was carried out overnight at 65°C using 10 pmol of the oligonucleotide probe labeled with digoxigenin-11-2'-deoxyuridine-5'-triphosphate (DIG-11-dUTP) (using Roche's DIG Oligonucleotide 3'-End-Labeling Kit) per ml hybridization buffer. The membrane was then washed 4 times for 15 minutes each wash, as follows: 6 X SSC + 0.1% SDS at 65°C, 3 X SSC + 0.5% SDS at 65°C, 6 X SSC + 0.1% SDS at 65°C, and 0.2 X SSC at room temperature. The immunological detection of bound probes was performed with a DIG detection kit using a chemiluminescent substrate (CSPD)(Roche Diagnostics). The bands were visualized following a 2-hours exposure to Kodak XAR film at room temperature.

Early antigen (EA) Serology

The indirect immunofluorescence technique was used for detection of antibodies to EA [36]. Briefly, Raji cells were induced chemically at 37⁰C for 48 hours in fresh RPMI 1640 medium (Life Technologies) containing 10% fetal bovine serum, antibiotics and 20 ng/ml of phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA) (Sigma-Aldrich Canada Lte). TPA-induced Raji cells were collected by centrifugation, washed twice in phosphate-buffered saline (PBS), put on glass slides, and air dried. Smears were then fixed in acetone (5 minutes at 4⁰C), air dried, and stored dessicated at -20⁰C. Commercially available slides obtained from GRANBIO (Temecula, CA) were also used. To perform the antibody titrations, 10-fold dilutions of patient sera were made in PBS and incubated on the acetone-fixed cells for 1 hour at room temperature. The slides were then washed for 15 minutes in PBS and incubated for another hour at room temperature with fluorescein isothiocyanate-conjugated goat antibodies to human IgG (Jackson ImmunoResearch, distr. by Bio/Can Scientific, Mississauga, ON). After a final wash in PBS, the slides were mounted in 90% glycerol containing 10% PBS and were read using a Zeiss UV microscope (model 16A) equipped with epifluorescence.

Diagnosis of PTLD

The diagnosis of PTLD was based on histologic examination of biopsy or autopsy material in all cases according to criteria outlined by LJ Medeiros [37].

RESULTS

Primary EBV infection and development of PTLD

Of the 26 patients studied, 20 were EBV seronegative before transplantation (see Table 1). The six patients who developed PTLD were all EBV seronegative at the time of transplant and all underwent primary infection within a range of 4-28 weeks post-transplantation as documented by PCR analysis. Table 2 lists the immunosuppressive regimens of all high-risk patients included in our study. Clinical information with regard to anti-rejection therapy and outcome in patients with PTLD is provided in Table 3.

Viral load determination and EA serology

Based on viral load results we determined that 20 of the 26 patients studied were at high risk of developing PTLD with a viral load ≥ 1 EBV genome copy / 10^3 PBMC. It was noted that none of the six patients who developed PTLD had a significant EA antibody titer (≤ 40), as shown in Table 4. Of the 14 patients who did not develop PTLD, 13 had a significant EA antibody titer (n=12 had titers of ≥ 1000 and n=1 had a titer of ≥ 100) (see Table 3). With reference to patients who developed PTLD, statistical analysis of the data indicates that the difference between patients who developed EA antibodies (0/13) and those who did not (6/7) highly significant ($p < 0.001$) using z analysis. One high risk patient without PTLD remains negative for EA antibody at 25 weeks after detection of elevated EBV DNA load in PBMC. In the low risk group (n=6) with a viral load ≤ 1 EBV genome copy / 10^4 PBMC, none developed PTLD nor did they indicate significant EA antibody titers. Figure 1 shows plots of viral load versus EA antibody titers for four patients who developed PTLD and for four other high-risk patients who did not develop PTLD. In the context of a high viral load, the positive and negative prognostic values (PPV vs NPV, respectively) of EA antibodies were estimated: PPV= 85.7% and NPV= 100% (Table 4). Given the small number of patients in this study, it would be too optimistic to declare that all patients with EA antibodies will not develop PTLD. This problem can be solved by calculating the probability of not developing PTLD based on a 95% confidence interval, thereby yielding a value of 88-

100% protection for patients with high viral loads who show high titers of EA antibodies.

Timing of the development of EA antibodies

Of the 13 patients with EA antibody titers ≥ 100 , seven had EA antibodies at the time of the initial high viral load (54%) and six developed EA antibodies during the following weeks: 5, 9 and 11 weeks later for three patients who did not receive intravenous immunoglobulines (IVIG) and 23, 29 and 39 weeks later for three patients who were on IVIG for CMV prophylaxis.

DISCUSSION

Post-transplant lymphoproliferative disease is a severe complication of allograft recipients treated with the immunosuppressive drugs cyclosporine A, tacrolimus or OKT3 monoclonal antibody [38-45]. An EBV-seronegative status prior to transplant constitutes a significant risk for recipients, especially children, at least half of whom are non-immune to EBV at the time of transplant. Our study was retrospective, selecting 26 patients, 20 of whom were judged to be at high risk for PTLD based on viral DNA load in PBMC. Furthermore, 15 patients in our cohort were EBV-negative at the time of transplant. Six of the 20 high-risk patients developed PTLD following primary EBV infection in the months following transplant. However, nine other EBV-seronegative patients with high viral loads did not develop PTLD. All seronegative patients seroconverted on an average of 8.9 weeks post-transplant which correlates well with published reports of 2.5 to 12 weeks [46].

As shown in Table 2, six of our patients received anti-lymphocyte globulines (ALG) or anti-thymocyte globulines (ATG or OKT3) as anti-rejection agents. These agents have all been associated with a highly increased risk of PTLD (8, 16, 21, 45, 47-49). Of the six patients in our study who developed PTLD, four received either ALG (10 days), ATG (6 days), OKT3 (35 days) or ALG (8 days) followed by OKT3 (23 days). Of the 14 high risk patients who did not develop PTLD, only two received ALG (7 and 10 days). One of the latter was EBV-seropositive at transplant thereby diminishing his effective risk to develop PTLD. Several other studies showed a positive correlation between tacrolimus (FK506) administration and PTLD risk (8, 21, 42, 43). All patients in our study underwent induction therapy with prednisone, azathioprine (or mofetil mycophenolate (MMF) in renal transplant patients) and cyclosporine (neoral) (see Table 2). In one of the six patients who developed PTLD, cyclosporine was replaced by FK506 two weeks following transplant. This patient, however, also received ATG three weeks post-transplant, thereby confounding the variables. Of the 14 other high risk patients, five received FK506 without developing PTLD.

Our study used a semi-quantitative PCR technique for EBV genome detection. With this system, we were able to establish that patients at high risk for PTLD had a cut-

off value of ≥ 1 EBV genome copy per 1000 PBMC [28]. This level of sensitivity corresponds to approximately 4-20 Namalwa genomes per input following hybridization with a DIG-labeled probe. Nonetheless, 14 of 20 high risk patients presented high viral load (≥ 1 EBV genome copy / 1000 PBMC) without developing PTLD. Six of these 14 patients had very high viral loads as determined by detectability of a specific band in the 1000 cell amplification tube by ethidium bromide staining. This semi-quantitative technique therefore overestimates risk for PTLD, an observation that has been reported by other investigators as well [29-31].

The EBV serological profile following primary infection in transplant recipients has been examined by several groups [50-56]. The onset of primary infection in patients from these studies was defined either by serology or by molecular diagnosis, specifically PCR detection in blood or saliva. It was thus concluded that: 1) the humoral response to EBV was often delayed in these patients, 2) the viral capsid antigen (VCA) IgM peak was also delayed or failed to appear altogether following primary infection, 3) VCA IgG antibody titers were delayed as well following primary infection, but once they appeared these antibodies persisted indefinitely, as was observed in infectious mononucleosis, 4) most obvious, however, was the even greater lapse in the appearance of antibodies to the Epstein-Barr nuclear antigens (EBNA) relevant to primary infection in an immunocompetent individual, and 5) EA IgG antibodies were generally, but not universally, present in transplant patients and these persisted for at least several months following transplant. This lagging immune response is thought to be reflective of an immune system that is gravely depressed by anti-rejection drugs.

While it is known that 70% of patients with infectious mononucleosis develop EA antibodies, to our knowledge no correlative study has been published to compare appearance of EA antibodies with EB viral load and risk for PTLD. However, three reports examined EA antibodies in the transplant population. Specifically, Rogers et al [56] reported that in their transplant patient group (n = 65), high viral load was generally accompanied by a statistically-significant rise in EA IgG antibody. Only one of their patients developed PTLD; this patient lacked antibodies to EA, suggesting that the presence of a robust EA antibody titer might actually be an indication of protection against PTLD. According to another published study [15], low EA antibody titers

between 10 and 40 were observed in 13 patients who developed PTLD; however, in this study EA titers were not examined in 115 other transplant patients who did not develop PTLD. In a third study [55], EA antibody titers were examined in 10 pediatric liver transplant patients with PTLD and in 116 others without PTLD. The investigators observed an average progressive rise in EA antibody titers from 14 to 55 between time of transplant till 24 months post-transplant in patients without PTLD. Patients who developed PTLD, however, were shown to have average EA titers of 32 at the time of PTLD diagnosis. These reports did not seek to correlate EA serology with EB viral load. Our own investigation specifically set out to evaluate the usefulness of EA serology in combination with high EB viral load to predict risk for PTLD development. Our results indicated that of the six patients with low viral load titers (<1 EBV genome copy / 10 000 PBMC) none developed PTLD and none showed significant EA antibody titers following primary or reactivated EBV infection. In addition, of the six patients with very high viral load who developed PTLD, none demonstrated significant EA antibody titers (≤ 10). Of the 14 other patients with high EB viral load who did not develop PTLD, 13 demonstrated a significant increase of their EA titers (≥ 1000 for 12 patients and ≥ 100 for one patient) while one other patient remained EA seronegative at 25 weeks post-transplant.

Within the context of high viral load, the positive predictive value based on the absence of EA antibody using our small patient group, was 85.7%, meaning that patients with high viral load but without significant EA antibody titers have an 85.7% risk of developing PTLD. The negative predictive value of our test was shown to be between 88 and 100% (with a 95% confidence interval), meaning that patients with high viral load and a robust EA titer were seemingly protected from PTLD. Based on these results, we formulated a working algorithm which is presently used at Sainte-Justine Hospital for EBV testing in our pediatric transplant patients (Figure 2). Continued registry of patients in our transplant program will allow us to determine whether adjustments to this algorithm will be necessary.

We also noted that seven of 13 patients (54%) who developed high EA antibody titers already showed strong anti-EA activity at the time of their initial high EB viral load test. Six others developed significant EA titers either at 5, 9 and 11 weeks or at 23,

29 and 39 weeks following their initial high viral load test for the three not receiving anti-CMV prophylaxis versus the three on anti-CMV prophylaxis, respectively. Since preparations of hypergammaimmunoglobulines for CMV prophylaxis also contain high titers of EA antibody (data not shown), we speculate that these products may also contain neutralizing antibodies to EBV, thus temporarily affecting antibody production by diminishing the intensity of the infection.

In conclusion, this study indicates that EA serology can be used in combination with circulating EBV DNA load to evaluate a patient's risk for PTLD. Both of these markers may in fact indirectly reflect the competence of the patient's immune system to control EBV infection.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the collaboration of the transplantation teams of Sainte-Justine Hospital as well as the infectious disease unit during the course of this study. We are also grateful to Dr. François Coutlée for assistance with the statistical analysis of the data. This work was supported by a grant (no XG99-130) from the Hospital for Sick Children Foundation to CA. LC is a scholar of the FCAR (Fonds pour la formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche).

REFERENCES

1. Basgoz N, Preiksaitis JK. Post-transplant lymphoproliferative disorder. *Infect Dis Clin North Am* 1995; 9: 901-923.
2. Cohen JL. Epstein-Barr virus lymphoproliferative disease associated with acquired immunodeficiency. *Medicine* 1991; 70: 137-160.
3. Craig FE, Gulley ML, Banks PM. Posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol* 1993; 99: 265-276.
4. Hanto DW, Frizzera G, Gajl-Peczalska KJ, Simmons RL. Epstein-Barr virus, immunodeficiency, and B cell lymphoproliferation. *Transplantation* 1985; 39: 461-472.
5. List AF, Greco FA, Vogler LB. Lymphoproliferative diseases in immunocompromised hosts: the role of Epstein-Barr virus. *J Clin Oncol* 1987; 5: 1673-1689.
6. Preiksaitis JK, Cockfield SM. Epstein-Barr virus and lymphoproliferative disorders after transplantation. In: *Transplant Infections*, Bowden RA, Ljungman P, Paya CV, eds, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1998: 245-263.
7. Nalesnik MA, Jaffe R, Starzl TE, Demetris AJ, et al. The pathology of posttransplant lymphoproliferative disorders occurring in the setting of cyclosporine A-prednisone immunosuppression. *Am J Pathol* 1988; 133: 173-192.
8. Newell KA, Alonso EM, Whittington PF, Bruce DS, Millis JM, et al. Posttransplant lymphoproliferative disease in pediatric liver transplantation: interplay between primary Epstein-Barr virus infection and immunosuppression. *Transplantation* 1996; 62 : 370-375.
9. Penn I. The role of immunosuppression in lymphoma formation. *Springer Semin Immunopathol* 1998; 20: 343-355.
10. Morrison VA, Dunn DL, Manivel JC, Gajl-Peczalska KJ, Peterson BA. Clinical characteristics of post-transplant lymphoproliferative disorders. *Am J Med* 1994; 97: 14-24.

11. Nalesnik MA. Clinicopathologic features of posttransplant lymphoproliferative disorders. *Ann Transplantation* 1997; 2: 33-40.
12. Lucas KG, Pollok KE, Emanuel DJ. Post-transplant EBV induced lymphoproliferative disorders. *Leuk Lymphoma* 1997; 25: 1-8.
13. Swinnen LJ. Overview of posttransplant B-cell lymphoproliferative disorders. *Semin Oncol* 1999; 26: 21-25.
14. Chadburn A, Cesarman E, Knowles DM. Molecular pathology of post-transplantation lymphoproliferative disorders. *Semin Diagn Pathol* 1997; 14: 15-26.
15. Ho M, Miller G, Atchison RW, Breinig MK, Dummer JS, et al. Epstein-Barr virus infections and DNA hybridization studies in posttransplantation lymphoma and lymphoproliferative lesions: the role of primary infection. *J Infect Dis* 1985; 152: 876-886.
16. Walker RC, Marshall WF, Strickler JG, Wiesner RH, Velosa JA, Habermann TM, McGregor CGA, Paya CV. Pretransplantation assessment of the risk of lymphoproliferative disorder. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 1346-1353.
17. Walker RC, Paya CV, Marshall WF, Strickler JG, Wiesner RH, Velosa JA, et al. Pretransplantation seronegative Epstein-Barr virus status is the primary risk factor for posttransplantation lymphoproliferative disorder in adult heart, lung, and other solid organ transplantations. *J Heart Lung Transplant* 1995; 14: 214-221.
18. Zangwill SD, Hsu DT, Kichuk MR, Garvin JH, Stolar CJH, Haddad J, Stylianos S, Michler RE, Chadburn A, Knowles DM, Addonizio LJ. Incidence and outcome of primary Epstein-Barr virus infection and lymphoproliferative disease in pediatric heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 1998; 17: 1161-1166.
19. Finn L, Reyes J, Bueno J, Yunis E. Epstein-Barr virus infections in children after transplantation of the small intestine. *Am J Surg Pathol* 1998; 22: 299-309.
20. Mañez R, Breinig MK, Linden P, Wilson J, Torre-Cisneros J, Kusne S, Dummer S, Ho M. Posttransplant lymphoproliferative disease in primary Epstein-Barr virus infection after liver transplantation: the role of cytomegalovirus disease. *J Infect Dis* 1997; 176: 1462-1467.

21. Sokal EM, Antunes H, Beguin C, Bodeus M, Wallemacq P, de Ville de Goyet J, Reding R, Janssen M, Buts JP, Otte JB. Early signs and risk factors for the increased incidence of Epstein-Barr virus-related posttransplant lymphoproliferative diseases in pediatric liver transplant recipients treated with tacrolimus. *Transplantation* 1997; 64: 1438-1442.
22. Boyle GJ, Michaels MG, Webber SA, Knisely AS, Kurland G, Cipriani LA, Griffith BP, Fricker FJ. Posttransplantation lymphoproliferative disorders in pediatric thoracic organ recipients. *J Pediatr* 1997; 131: 309-313.
23. Ho M, Jaffe R, Miller G, Breinig MK, Dummer JS, Makowka L, Atchison RW, Karrer F, Nalesnik MA, Starzl TE. The frequency of Epstein-Barr virus infection and associated lymphoproliferative syndrome after transplantation and its manifestations in children. *Transplantation* 1988; 45: 719-727.
24. Dror Y, Greenberg M, Taylor G, Superina R, Hebert D, West L, Connolly B, Sena L, Allen U, Weitzman S. Lymphoproliferative disorders after organ transplantation in children. *Transplantation* 1999; 67: 990-998.
25. Randhawa PS, Demetris AJ, Pietrzak B, Nalesnik M. Histopathology of renal posttransplant lymphoproliferation: comparison with rejection using the Banff schema. *Am J Kidney Dis* 1996; 28: 578-584.
26. Randhawa PS, Magnone M, Jordan M, Shapiro R, Demetris AJ, Nalesnik M. Renal allograft involvement by Epstein-Barr virus associated post-transplant lymphoproliferative disease. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 563-571.
27. Rosendale B, Yousem SA. Discrimination of Epstein-Barr virus-related posttransplant lymphoproliferations from acute rejection in lung allograft recipients. *Arch Pathol Lab Med* 1995; 119: 418-423.
28. Savoie A, Perpète C, Carpentier L, Joncas J, Alfieri C. Direct correlation between the load of Epstein-Barr virus-infected lymphocytes in the peripheral blood of pediatric transplant patients and risk of lymphoproliferative disease. *Blood* 1994; 83: 2715-2722.

29. Riddler SA, Breinig MC, McKnight JLC. Increased levels of circulating Epstein-Barr virus (EBV)-infected lymphocytes and decreased EBV nuclear antigen antibody responses are associated with the development of posttransplant lymphoproliferative disease in solid-organ transplant recipients. *Blood* 1994; 84: 972-984.
30. Kenagy DN, Schlesinger Y, Weck K, Ritter JH, Gaudreault-Keener MM, Storch GA. Epstein-Barr virus DNA in peripheral blood leukocytes of patients with posttransplant lymphoproliferative disease. *Transplantation* 1995; 60: 547-554.
31. Lucas KG, Burton RL, Zimmerman SE, Wang J, Cornetta KG, Robertson KA, Lee CH, Emanuel DJ. Semiquantitative Epstein-Barr virus (EBV) polymerase chain reaction for the determination of patients at risk for EBV-induced lymphoproliferative disease after stem cell transplantation. *Blood* 1998; 91: 3654-3661.
32. Jones JF, Ray CG, Minnich LL, Hicks MJ, Kibler R, Lucas DO. Evidence for active Epstein-Barr virus infection in patients with persistent, unexplained illnesses: elevated anti-early antigen antibodies. *Ann Intern Med* 1985; 102: 1-7.
33. Strauss SE, Tosato G, Armstrong G, et al. Persisting illness and fatigue in adults with evidence of Epstein-Barr virus infection. *Ann Intern Med* 1985; 102: 7-16.
34. Pedneault L, Katz BZ, Miller G. Detection of Epstein-Barr virus in the brain by the polymerase chain reaction. *Ann Neurol* 1992; 32: 184-192.
35. Scharf SJ, Horn GT, Erlich HA. Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science* 1986; 233: 1076-1079.
36. Henle W, Henle G, Niederman JC, Klemola E, Haltia K. Antibodies to early antigens induced by Epstein-Barr virus in infectious mononucleosis. *J Infect Dis* 1971; 124: 58-67.
37. Medeiros LJ. Intermediate and high-grade diffuse non-Hodgkin's lymphomas in the working formulation. E Sarkin Jaffe, ed, Chapter 10 in *Surgical pathology of the lymph nodes and related organs*. 2nd ed. Vol 16 of series *Major problems in pathology*. Philadelphia: WB Saunders Company, 1995: 302-343.

38. Deschler DG, Osorio R, Ascher NL, Lee KC. Posttransplantation lymphoproliferative disorder in patients under primary tacrolimus (FK 506) immunosuppression. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995; 121: 1037-1041.
39. Tanner JE, and Alfieri C. Interactions involving cyclosporine A, interleukin-6, and Epstein-Barr virus lead to the promotion of B-cell lymphoproliferative disease. *Leuk Lymphoma* 1996; 21: 379-390.
40. Walz G, Zanker B, Melton LB, Suthanthiran M, Strom TB. Possible association of the immunosuppressive and B cell lymphoma-promoting properties of cyclosporine. *Transplantation* 1990; 49: 191-194.
41. Wilkinson AH, Smith JL, Hunsicker LG, Tobacman J, Kapelanski DP, Johnson M, Wright FH, Behrendt DM, Corry RJ. Increased frequency of posttransplant lymphomas in patients treated with cyclosporine, azathioprine, and prednisone. *Transplantation* 1989; 47: 293-296.
42. Ellis D, Jaffe R, Green M, Janosky JJ, Lombardozzi-Lane S, Shapiro R, Scantlebury V, Vivas C, Jordan ML. Epstein-Barr virus-related disorders in children undergoing renal transplantation with tacrolimus-based immunosuppression. *Transplantation* 1999; 68: 997-1003.
43. Cox KL, Lawrence-Miyasaki LS, Garcia-Kennedy R, Lennette ET, Martinez OM, Krams SM, Berquist WE, So SKS, Esquivel CO. An increased incidence of Epstein-Barr virus infection and lymphoproliferative disorder in young children on FK506 after liver transplantation. *Transplantation* 1995; 59: 524-529.
44. Cacciarelli TV, Green M, Jaffe R, Mazariegos GV, Jain A, Fung JJ, Reyes J. Management of posttransplant lymphoproliferative disease in pediatric liver transplant recipients receiving primary tacrolimus (FK506) therapy. *Transplantation* 1998; 66: 1047-1052.
45. Renard TH, Andrews WS, Foster ME. Relationship between OKT3 administration, EBV seroconversion, and the lymphoproliferative syndrome in pediatric liver transplant recipients. *Transplant Proc* 1991; 23: 1473-1476.

46. Alfieri C, Tanner J, Carpentier L, Perpète C, Savoie A, Paradis K, Delage G, Joncas JH. Epstein-Barr virus transmission from a blood donor to an organ transplant recipient with recovery of the same virus strain from the recipient's blood and oropharynx. *Blood* 1996; 87: 812-817.
47. Swinnen LJ, Costanzo-Nordin MR, Fisher SG, O'Sullivan EJ, Johnson MR, Heroux AL, Dizikes GJ, Pifarre R, Fisher RI. Increased incidence of lymphoproliferative disorder after immunosuppression with the monoclonal antibody OKT3 in cardiac-transplant recipients. *N Engl J Med* 1990; 323: 1723-1728.
48. Canfield CW, Hudnall SD, Colonna JO, Busuttil RW, Wilkinson AH, Danovitch G, Shaked A, Goldstein L, Rosenthal JT. Fulminant Epstein-Barr virus-associated post-transplant lymphoproliferative disorders following OKT3 therapy. *Clin Transplant* 1992; 6: 1-9.
49. Cockfield SM, Preiksaitis JK, Jewell LD, Parfrey NA. Post-transplant lymphoproliferative disorder in renal allograft recipients. *Transplantation* 1993; 56(1): 88-96.
50. Cen H, Williams PA, McWilliams HP, Breinig MC, Ho M, McKnight JLC. Evidence for restricted Epstein-Barr virus latent gene expression and anti-EBNA antibody response in solid organ transplant recipients with posttransplant lymphoproliferative disorders. *Blood* 1993; 81: 1393-1403.
51. Henle W, Henle G. Epstein-Barr virus-specific serology in immunologically compromised individuals. *Cancer Res* 1981; 41: 4222-4225.
52. Ho M, Miller G, Atchison RW, Breinig MK, Dummer JS, Andiman W, Starzl TE, Eastman R, Griffith BP, Hardesty RL, Bahnson HT, Hakala TR, Rosenthal JT. Epstein-Barr virus infections and DNA hybridization studies in posttransplantation lymphoma and lymphoproliferative lesions: the role of primary infection. *J Infect Dis* 1985; 152: 876-886.
53. Marker SC, Ascher NL, Kalis JM, Simmons RL, Najarian JS, Balfour HH. Epstein-Barr virus antibody responses and clinical illness in renal transplant recipients. *Surgery* 1979; 85: 433-440.

54. Preiksaitis JK, Diaz-Mitoma F, Mirzayans F, Roberts S, Tyrrell DLJ. Quantitative oropharyngeal Epstein-Barr virus shedding in renal and cardiac transplant recipients: relationship to immunosuppressive therapy, serologic responses, and the risk of posttransplant lymphoproliferative disorder. *J Infect Dis* 1992; 166: 986-994.
55. Sokal EM, Caragiozoglou T, Lamy M, Reding R, Otte JB. Epstein-Barr virus serology and Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders in pediatric liver transplant recipients. *Transplantation* 1993; 56: 1394-1398.
56. Rogers BB, Conlin C, Timmons CF, Dawson B, Krisher K, Andrews WS. Epstein-Barr virus PCR correlated with viral histology and serology in pediatric liver transplant patients. *Pediatr Pathol Lab Med* 1997; 17: 391-400.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Correlation between Epstein-Barr virus load in peripheral blood mononuclear cells and early antigen titer during the period following transplantation in: A) four patients with PTLD, and B) four patients without PTLD. Pertinent clinical information is also indicated, such as cytomegalovirus PCR results in peripheral blood, cytogam and ganciclovir / acyclovir administration and time of PTLD diagnosis where relevant.

Abbrev: PBMC, peripheral blood mononuclear cells; EA, early antigen; CMV, cytomegalovirus; GCV, ganciclovir; ACV, acyclovir.

Figure 2: Sainte-Justine Hospital algorithm for EBV testing in pediatric transplant recipients.

Abbrev: D / R, donor /recipient; PBMC, peripheral blood mononuclear cells.

Table 1: Summary profile of pediatric transplant recipients

Patient	Age at Transplant (yrs)	Primary diagnosis (pretransplant)	EBV status D / R	EBV infection (weeks post-transplantation)
Liver				
1*	16	Glycogenosis (type I)	- / -	4
2*	10 mos	Congenital biliary atresia	+ / -	4
3*	2	Histiocytosis	+ / -	5
4	2	Hepatoblastoma	? / +	12
5	2	Congenital biliary atresia	+ / -	9
6	11	Alagille syndrome	+ / -	12
7	5	Alagille syndrome	+ / -	6
8	5	Amerindian cirrhosis	+ / +	Active
9	9	Congenital biliary atresia	+ / -	6
10	8	Congenital hepatic fibrosis	+ / -	7
11	19	Amerindian cirrhosis	+ / +	Active
12	13	Cystic fibrosis + cirrhosis	+ / -	12
13	1	Congenital biliary atresia	+ / -	5
14	18	Cystic fibrosis	- / +	5
15	15	Fulminant hepatitis	+ / +	4
16	9 mos	Congenital biliary atresia	- / -	7
17	3	Tyrosinemia	- / -	12
18	8 mos	Congenital biliary atresia	+ / +	7
19	3	Tyrosinemia	+ / -	6
20	1	Congenital biliary atresia	+ / -	6
21	5 mos	Congenital biliary atresia	? / -	8
22*	1	Congenital biliary atresia	+ / -	5
23	5 mos	Congenital biliary atresia	+ / -	-
Kidney				
24*	5	Chronic renal failure	+ / -	4
25	11	Chronic renal failure	+ / -	20
Heart				
26*	13	Cardiomyopathy	? / -	28

Abbrev: D / R, donor / recipient.

* Patients with PTLD (shown in bold).

Table 2 Immunosuppressive regimen of high-risk patients

Patients	EBV Status pre-transplant	Neoral + prednisone + azathioprine	Neoral replaced by tacrolimus (FK506)	ALG, ATG or OKT3 given (number of days)
<u>PTLD</u>				
1	-	+	after 15 days	ALG (8) + OKT3 (23) OKT3 (35) ATG (6) ALG (10)
2	-	+		
3	-	+		
22	-	+		
24	-	+		
26	-	+		
<u>No PTLD</u>				
4	+	+	after 10 months after 4 days after 8 months after 3 months after 3 weeks	ALG (7) ALG (10)
5	-	+		
6	-	+		
7	-	+		
8	+	+		
9	-	+		
10	-	+		
11	+	+		
12	-	+		
13	-	+		
14	+	+		
18	+	+		
20	-	+		
25	-	+		

Abbrev: ATG, anti-thymocyte globulines; ALG, anti-lymphocyte globulines; OKT3, anti-CD3 antibody preparation.

Table 3: Clinical findings in patients with PTLD

Patient (no)	Induction therapy (days)	Rejection therapy	Symptoms or signs (days after tx)	Treatment	Outcome (post-tx)
1	Neoral + azathioprine + prednisone + ALG (1-8)	OKT3 (days 9-22) OKT3 (days 30-38)	Protracted infectious mononucleosis (52)	Reduction in IS Acyclovir I.V.	Well (8 years)
2	Neoral + prednisone	OKT3 (days 34-44), prednisone (bolus), OKT3 (days 54-70), OKT3 (days 79-86)	PTLD in the transplanted liver with multiple bleeding in the intestinal tract. Multiple lymph nodes affected (86)	IS stopped acyclovir	Died (96 days)
3	Neoral + azathioprine + prednisone (1-16) then FK506 replaced neoral	Prednisone (bolus) (days 15) then ATG (days 24-29)	PTLD localized in the transplanted liver (49)	Reduction in IS acyclovir	Died (49 days)
22	Neoral + azathioprine + prednisone (azathioprine replaced by MMF (21))	No	PTLD localized to the skin (72)	Cyclophosphamide (2 courses) + ganciclovir + γ -Ig	Well (9 mos)
24	Neoral prednisone MMF ALG (10 days)	No	Localized to kidney (56)	Kidney removed and IS stopped	Well (3 years)
26	Neoral + azathioprine + prednisone	No	PTLD localized: sternum, liver, pancreas (7 mo)	Cyclophosphamide (1 course) + ganciclovir + γ -Ig	Well (1 year)

Abbrev: ALG, anti-lymphocyte globulines; ATG, anti-thymocyte globulines; γ -Ig, immunoglobulines; IS, immunosuppression; MMF, mofetil mycophenolate (Cellcept); Tx, transplantation.

Table 4: Prognostic values of EA antibodies in the 20 solid organ transplant recipients with high viral load.

	PTLD development			
		+	-	TOTAL
EA Antibodies	+	0	13	13
	-	6	1	7
	TOTAL	6	14	20

Based on the absence of EA antibodies: the negative predictive value (NPV): 100%
the positive predictive value (PPV): 85.7%

Figure 1A Epstein-Barr viral load versus EA antibody titers in four patients with PTLD

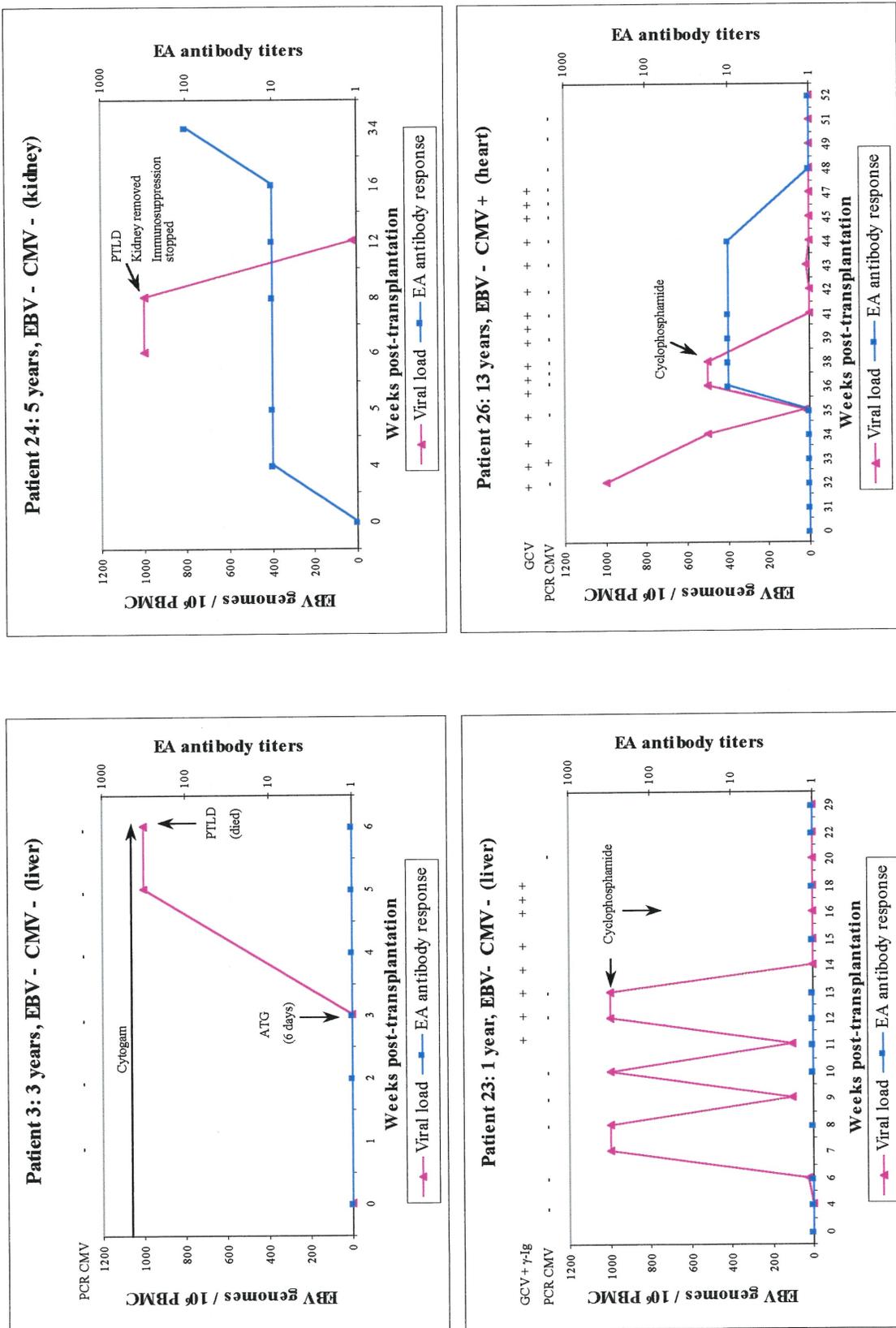


Figure 1B Epstein-Barr viral load versus EA antibody titers in four patients without PTLD

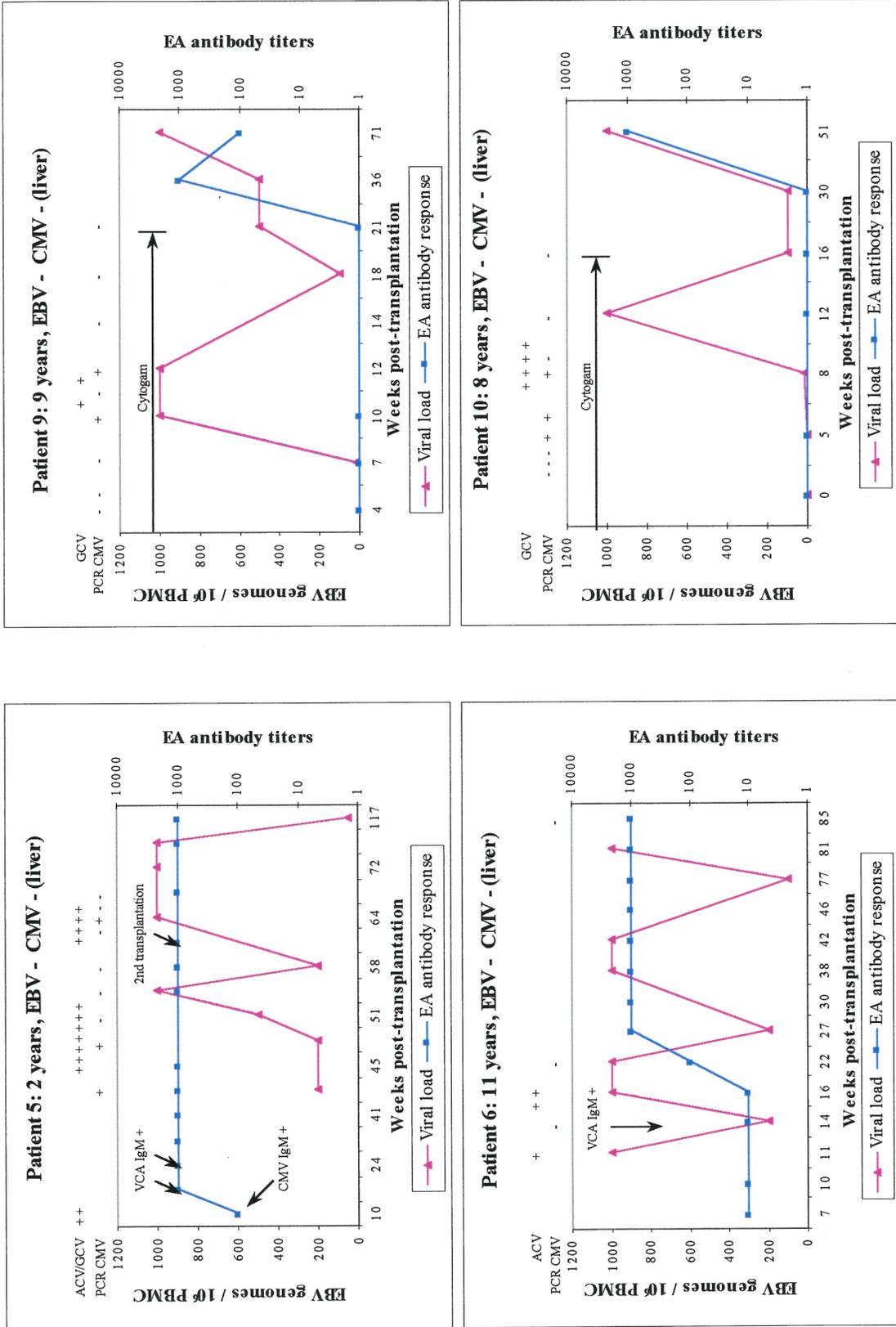
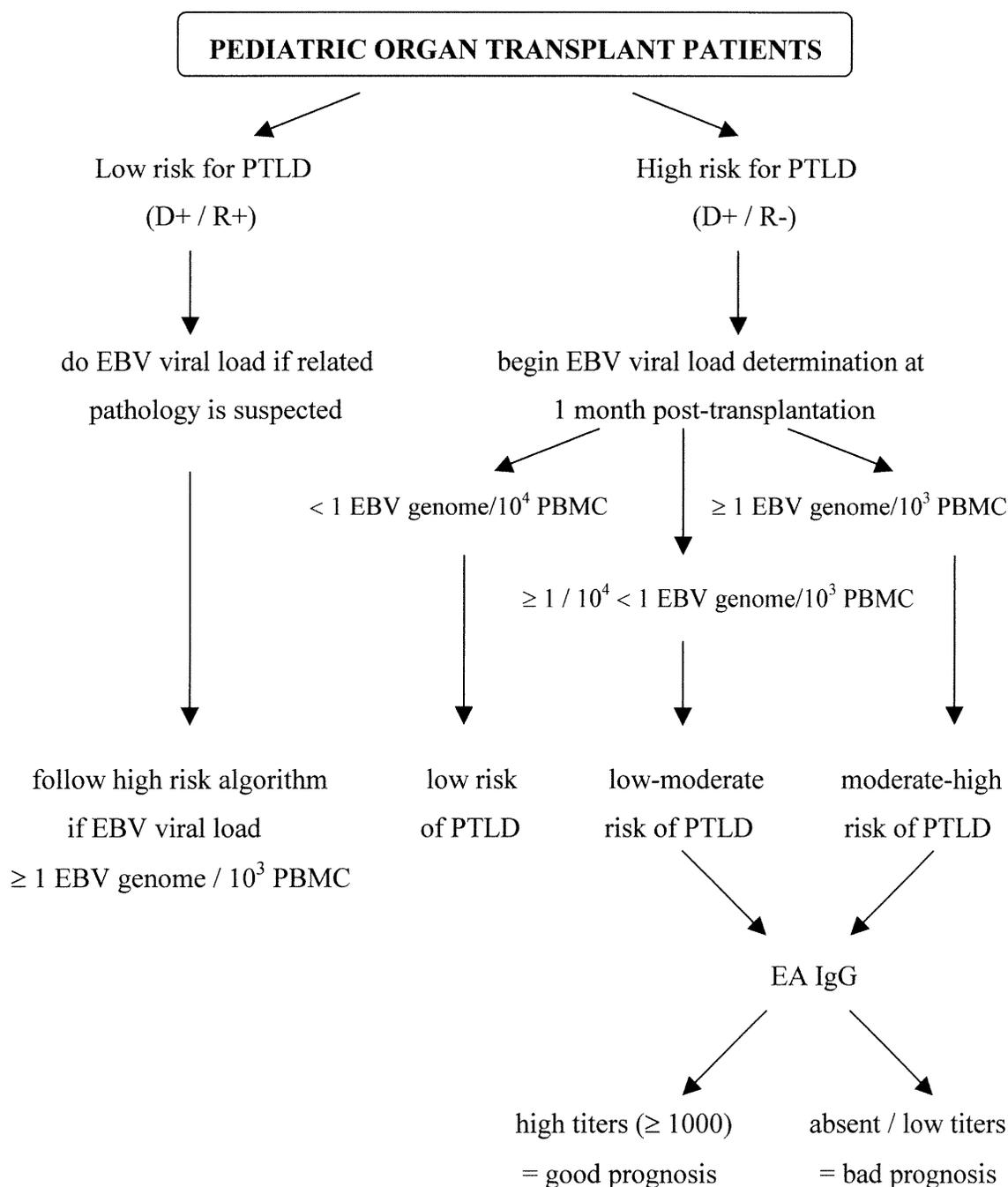


Figure 2 Sainte-Justine Hospital algorithm for EBV testing in pediatric transplant recipients



Abbrev: D / R, donor / recipient; PBMC, peripheral blood mononuclear cells.

III

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Comme plusieurs études le démontrent si bien (13, 16, 38, 95, 196, 219, 220, 260, 261, 269, 278), plusieurs facteurs de risque ont été impliqués dans le développement d'un PTLD, dont le plus important est sans doute une infection primaire à EBV survenant très tôt suite à une transplantation. C'est ce qui explique le faible nombre de greffés cardiaques et rénaux inclus dans notre étude, puisque ces derniers sont en général plus âgés lors de leur transplantation et que par conséquent, un plus grand nombre d'entre eux seront séropositifs pour EBV. Cependant, 20 des 26 greffés de notre étude présentaient ce facteur de risque puisqu'ils étaient séronégatifs pour EBV avant la transplantation et qu'ils ont reçu un organe d'un donneur séropositif pour EBV et / ou des transfusions sanguines de donneurs possiblement séropositifs pour EBV. De ces 20 patients, six patients ont développé un PTLD après avoir fait une infection primaire très tôt après la transplantation, soit 8.3 semaines en moyenne [4-28 semaines]. De ces six patients, quatre ont bien répondu au traitement donné (voir Table 2 de l'article) ce qui a entraîné une régression complète de leur PTLD. Treize autres transplantés séronégatifs en pré-greffe qui n'ont cependant pas développé de PTLD, ont eux aussi séroconvertis très tôt après la transplantation, soit 8.9 semaines en moyenne [5-20 semaines]. Ce délai correspond à ce que l'on retrouve dans la littérature où il a été décrit que lorsqu'un patient est infecté par EBV lors de la chirurgie (par des produits sanguins ou par l'organe transplanté), on observe généralement une séroconversion durant les 12 premières semaines suivant la chirurgie (2.5 à 12 semaines) (1). Un seul transplanté séronégatif en pré-greffe n'a pas séroconverti pour EBV et ce, malgré que son donneur d'organe ait été positif.

Suite à une étude antérieure (224), nous avons pu déterminer que tous les patients qui avaient développé un PTLD présentaient une charge virale supérieure ou égale à une copie de génome EBV par 1000 cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC pour « peripheral blood mononuclear cells »). La charge virale EBV sanguine a alors été déterminée pour tous les patients à risque depuis ce temps afin de savoir si la charge virale en elle-même pouvait être un assez bon marqueur prédictif du

développement d'un PTLD. À l'analyse des premiers résultats, on s'est aperçu que celle-ci est bien supérieure à 1 copie de génome EBV / 1000 PBMC chez les patients ayant développé un PTLD, puisque la bande d'ADN viral amplifié est visible à cette dilution (1000 PBMC/tube) sur gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium. Toutefois, des 14 patients ayant présenté une charge virale ≥ 1 copie de génome EBV / 1000 PBMC par hybridation et qui n'ont pas développé de PTLD, six patients présentaient une charge virale aussi élevée que ceux ayant développé un PTLD (avec une bande d'ADN viral visible sur le gel d'agarose à une dilution de 1000 PBMC). La présence d'une charge virale EBV sanguine très élevée et comparable entre des patients qui développent un PTLD et ceux qui n'en développent pas fut également remarquée par plusieurs autres équipes (109, 134, 204). Il devenait donc de plus en plus évident que la charge virale EBV sanguine à elle seule ne constituait donc pas un assez bon marqueur prédictif positif, puisqu'on ne pouvait prédire avec une assez bonne certitude ceux qui seraient à risque de développer un PTLD et ceux qui en seraient protégés.

Le profil sérologique EBV des patients transplantés a également été étudié par plusieurs équipes (28, 89, 95, 139, 183, 204, 207, 234). Ils ont constaté entre autre que: 1) la réponse sérologique est souvent retardée chez ces patients; 2) les anticorps hétérophiles de même que les anticorps VCA IgM n'apparaissent pas de façon constante au moment d'une infection primaire; 3) des titres élevés d'anticorps VCA IgG (≥ 1000) persistent longtemps après la greffe alors que les titres d'anticorps EBNA IgG sont bas ou indétectables (± 10) dans les premiers mois et jusqu'à plusieurs mois après la greffe; et 4) les anticorps EA IgG semblent augmenter et persister à des titres intermédiaires (40-80) durant les premiers mois post-transplantation. Toutes ces observations reflètent bien l'effet du régime immunosuppresseur administré aux transplantés sur le système immunitaire.

Bien qu'il soit reconnu qu'environ 30% de la population ne développe pas d'anticorps EA lors d'une infection primaire ou d'une réactivation, aucune corrélation n'a été faite à ce jour entre le développement d'une charge virale EBV sanguine élevée, le développement de PTLD et l'absence ou la présence des anticorps EA, ce qui est devenu l'objectif principal de notre étude. Plusieurs observations nous ont guidé dans notre cheminement pour émettre notre hypothèse de travail. Tout d'abord, en 1985, Ho

et al. (95) ont observé une élévation des titres d'anticorps EA (titres entre 10 et 40) chez 13 patients ayant développé un PTLD. Ils n'ont cependant pas regardé le titre de ces mêmes anticorps chez d'autres patients qui n'ont pas développé de PTLD. Puis, en 1993, Sokal et al. (234) ont eux aussi regardé les titres d'anticorps EA chez 10 transplantés pédiatriques de foie qui ont développé un PTLD en plus de regarder le titre de ces mêmes anticorps chez 116 autres transplantés n'ayant pas développé de PTLD. Ils ont observé chez ces derniers une élévation moyenne progressive des titres d'anticorps EA (de 14 à 55) du moment de la transplantation à 24 mois suivant la transplantation (0, 6, 12, 24 mois). Chez les patients ayant développé un PTLD, le titre des anticorps EA au moment du diagnostic était bas (en moyenne 32). Mais aucune charge virale n'était mesurée chez ces patients. Finalement, en 1997, Rogers et al. (207) ont démontré qu'une forte augmentation de la charge virale sanguine (mesurée de façon qualitative) s'accompagne généralement (de façon statistiquement significative) d'une élévation des anticorps EA IgG. Un seul patient, avec un signal par PCR très fort pour EBV dans son sang, avait alors développé un PTLD. Ce dernier n'avait démontré aucune réponse de ces anticorps anti-EA. L'analyse des données chez deux de nos greffés avec une charge virale élevée ayant développé un PTLD a démontré que ces derniers n'avaient pas de titres EA significatifs ni avant ni au moment de l'apparition du PTLD (224). On s'est alors demandé s'il existait une différence dans la réponse sérologique des patients qui présentaient une charge virale élevée et qui développaient un PTLD comparés à ceux qui n'en développaient pas. Le profil des anticorps VCA IgG et EBNA IgG retrouvé chez nos patients, correspond bien à ce qui est décrit dans la littérature (résultats non montrés). Mais à cause du biais de sélection des patients inclus dans cette étude (incluant pour la plupart des patients ayant présenté une charge virale élevée mesurée par PCR), les titres d'anticorps anti-EA se sont révélés beaucoup plus élevés que ceux observés chez la population de transplantés en général de même que lors d'une infection primaire chez des individus immunocompétents où les titres de ces anticorps atteignent des valeurs moyennes de 160 (171).

L'étude du développement des anticorps EA en relation avec la charge virale chez notre population de transplantés pédiatriques nous a révélé que: 1) des six patients à avoir présenté une charge virale basse (< 1 copie de génome EBV / 10 000 PBMC),

aucun n'a développé de PTLD ni d'anticorps EA suite à une infection primaire ou une réactivation de l'EBV; 2) des six patients ayant présenté une charge virale élevée et développé un PTLD, aucun n'a démontré une hausse significative de son titre d'anticorps EA (≤ 10) avant et au moment du PTLD; par contre, trois des quatre patients ayant survécu à leur PTLD ont développé des anticorps EA (à des titres ≥ 100) durant les six à huit mois qui ont suivi leur rémission; et 3) des 14 patients ayant présenté une charge virale élevée sans avoir développé de PTLD, 13 ont démontré une hausse significative de leur titre d'anticorps EA (≥ 1000 pour 12 patients et ≥ 100 pour un seul patient) alors qu'un seul patient n'a toujours pas développé d'anticorps EA et ce, 25 semaines maintenant suivant le moment d'apparition de sa charge virale élevée.

Le fait qu'aucun taux d'anticorps EA ne soit détecté lorsque la charge virale est basse, indique peut-être qu'il faut atteindre une certaine concentration antigénique pour qu'une stimulation du système immunitaire ne s'effectue. D'un autre côté, la présence d'un PTLD signifie généralement que l'immunosuppression est trop intense et que le système immunitaire n'arrive plus à contrôler l'infection virale. C'est ce qui pourrait expliquer qu'aucun taux d'anticorps EA ne soit détecté durant cette période. Une fois l'immunosuppression retirée ou abaissée, le PTLD peut régresser et la production d'anticorps EA peut lentement être rétablie en même temps que la réponse cytotoxique spécifique à l'EBV (patient 24, Figure 1A de l'article). Ainsi, les patients capables de monter une bonne réponse immunitaire (détectable par les niveaux d'anticorps EA élevés) en présence d'une charge virale EBV sanguine élevée, seraient également ceux dont le niveau d'immunosuppression net est le moins élevé. La présence des anticorps EA semblerait donc, de façon indirecte, refléter le niveau de compétence du système immunitaire du patient envers EBV ou tout simplement son degré d'immunosuppression net.

Le régime immunosuppresseur du patient a donc un rôle très important à jouer dans la capacité du patient à développer une réponse cellulaire cytotoxique spécifique à EBV adéquate puisque ceux-ci agissent directement sur les lymphocytes T pour les empêcher de provoquer un rejet du greffon. Ainsi, plus le régime immunosuppresseur sera sévère, plus la défense du patient contre l'infection EBV sera compromise et plus le risque de PTLD sera accru. De ce fait, les préparations commerciales d'anticorps

dirigées contre les lymphocytes T (ALG, ATG et OKT3) pour traiter un rejet ont toutes déjà été associées avec un risque grandement augmenté de PTLD (27, 180, 181, 196, 229, 233, 243, 256, 261). C'est aussi ce que l'on peut observer chez nos patients (voir Table 2 de l'article), puisque des six patients ayant développé un PTLD, quatre d'entre eux ont reçu soit de l'ATG ou ALG (6 et 10 jours), soit de l'OKT3 (35 jours) ou de l'ALG (8 jours) suivi d'OKT3 (23 jours). Des 14 autres patients n'ayant pas développé de PTLD en présence d'une charge virale très élevée, deux patients ont reçu de l'ALG (7 et 10 jours). Cependant, un de ces patients était séropositif pour EBV au moment de la transplantation, ce qui constituait sans doute un avantage pour lui. Plusieurs études ont également associé le tacrolimus (FK506) avec un risque plus élevé de PTLD (13, 21, 38, 51, 233). Dans notre étude, tous les patients étaient d'abord mis sous prednisone (solumédrol), azathioprine (imuran) ou mofetil mycophenolate (MMF) chez les transplantés rénaux, et cyclosporine (néoral) (voir Table 2 de l'article). Mais chez six patients, la cyclosporine a été remplacée par le tacrolimus à cause d'un rejet aigu (patients 18, 20), d'un rejet chronique (patients 3, 5, 11) ou en prévention d'un rejet (patient 10). Ils ont tous été maintenus sous des dosages sanguins comparables (entre 10 et 12 ng/ml, ce qui représente des taux intermédiaires). Le tacrolimus a remplacé la cyclosporine deux semaines après la transplantation chez un seul patient sur les 6 ayant développé un PTLD. Mais ce patient a également reçu de l'ATG durant la troisième semaine post-greffe augmentant sans doute ses chances de développer un PTLD. Parmi les 14 autres patients à avoir présenté une charge virale élevée, cinq patients ont été mis sous tacrolimus sans développer de PTLD. Celui-ci ne semble donc pas chez nos patients être associé avec un risque augmenté de PTLD.

Étant donné que le degré d'immunosuppression des patients en regard de l'infection EBV peut varier suite à la médication reçue et aux infections en cours, il serait intéressant d'effectuer des analyses de prolifération du compartiment lymphocytaire T pour pouvoir évaluer de façon plus directe le degré d'immunosuppression net du patient. On pourrait peut-être ainsi voir une différence (significative sans doute) entre l'activation des lymphocytes T chez les patients qui semblent maîtriser l'infection à l'EBV et ceux qui développeront un PTLD. De même, des analyses de cytotoxicité médiée par les lymphocytes T pourraient être effectuées

afin de déterminer l'ampleur du développement de la réponse cellulaire cytotoxique spécifique à l'EBV dans les deux cas (présence ou non de PTLD). D'après les observations faites à partir de notre étude, on s'attendrait à ce que les patients ayant développé un PTLD soient les plus immunosupprimés et que leur activité proliférative ainsi que l'ampleur de leur réponse cellulaire cytotoxique soit de beaucoup inférieures à ceux qui n'ont pas développé de PTLD en présence d'une charge virale importante. Ces deux types d'observations seraient une mesure plus objective de l'immunosuppression totale du patient. Cependant, ces analyses ne sont pas spécifiques à l'EBV et, de ce fait, ne fournissent pas d'information sur le statut du patient face à l'infection EBV ni sur le risque réel de développer un PTLD.

Le mécanisme par lequel EBV pourrait induire le développement d'un PTLD demeure cependant encore une énigme. Une hypothèse pourrait être émise basée sur quelques uns de nos résultats *in vitro* démontrant que la protéine tardive d'EBV, la gp 350/220, induit l'expression de l'antigène apoptotique Fas dans les lymphocytes T (246-b). On pourrait alors supposer que l'apoptose et l'anergie immunologique, menant ainsi à une immunosuppression encore plus prononcée, surviennent si Fas se lie à son ligand Fas L, lequel pourrait être exprimé par la cellule B infectée par EBV (246-b). Pour vérifier cette hypothèse de façon corrélative, on pourrait examiner l'expression de Fas et Fas L en recherchant ces antigènes par immunohistochimie dans les coupes de tissus prélevés des lésions tumorales (venant de nos patients avec PTLD) conservés dans notre banque de tissus congelés. Nous pourrions également rechercher l'expression des gènes EBV dans ces mêmes tissus par hybridation *in situ*. La co-localisation d'un ARN messager spécifique à EBV par exemple et de la protéine Fas L nous permettrait de déterminer si un ou des gènes de l'EBV pourrait induire Fas L et ainsi nous fournir un modèle *in vivo* pour expliquer la pathogénèse du PTLD. On pourrait également peut-être observer une différence au niveau de l'expression de ces protéines, Fas et Fas L, dans les lymphocytes circulants ou dans le plasma (protéines sous forme soluble) des patients qui développent un PTLD et de ceux qui n'en développent pas. Ceci nous permettrait sans doute de fournir une explication sur le fait que certains patients semblent beaucoup plus immunosupprimés que d'autres et cela, même si la médication donnée est la même.

D'après les résultats obtenus chez nos patients, dans le contexte d'une haute charge virale, la valeur prédictive positive d'une absence d'anticorps EA est de 85.7% signifiant qu'en présence d'une haute charge virale et d'une absence d'anticorps EA, le patient aurait 85.7% de risque de développer un PTLD (voir Table 4 de l'article). Par contre, en présence d'une haute charge virale et d'un titre significatif d'anticorps EA, le patient aurait entre 88 et 100% de chance de ne pas développer de PTLD (avec un intervalle de confiance de 95%). On a également observé que sept des 13 patients ayant développé des anticorps EA (54%), présentaient déjà de hauts titres de ces anticorps au moment de la charge virale élevée (≥ 1 copie de génome EBV / 1000 PBMC). Six autres patients les ont développés dans les semaines suivantes, soient 5, 9 et 11 semaines plus tard pour trois patients ne recevant aucune prophylaxie anti-cytomégalo virus (CMV), et 23, 29 et 39 semaines plus tard pour trois patients qui recevaient des immunoglobulines au moment de la charge virale élevée. Les immunoglobulines administrées dans le cadre d'une prophylaxie anti-CMV pourraient également affecter la production des anticorps EA en paralysant de façon temporaire le système immunitaire ou en masquant l'infection EBV (neutralisation des particules virales). D'après les résultats obtenus, un algorithme a été développé pour faciliter le suivi des patients transplantés de notre institution (voir Figure 2 de l'article). Une étude à plus grande échelle (présentement en cours) regroupant plusieurs centres pédiatriques effectuant des transplantations, nous permettra de vérifier la validité de cet algorithme ou les changements à lui apporter.

La présence d'une infection concomitante par le CMV a également été regardée puisqu'il s'agit là aussi d'un autre facteur de risque important pour le développement d'un PTLD (16, 138, 219, 220). Non seulement sa présence peut contribuer à augmenter le degré d'immunosuppression du patient, mais de récentes observations semblent aussi vouloir l'associer au rejet du greffon (15a). Dans les deux cas, le degré d'immunosuppression du patient sera augmenté de même que son risque de développer un lymphome. Pour déterminer si le patient s'était infecté par le CMV au moment de la transplantation, une recherche de l'ARN viral ciblant des ARNm tardifs encodant la phosphoprotéine de 67 kDa (pp67) spécifiquement exprimée durant la réplication virale, étaient régulièrement effectuée par la technique de NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification). Ce test était également souvent accompagné de la sérologie

CMV. Des 26 patients étudiés, 11 ont reçu un organe d'un donneur EBV et CMV séropositif alors qu'ils étaient séronégatifs pour ces deux virus au moment de la transplantation (voir tableau X en annexe 1). Bien que tous ces patients aient reçu une prophylaxie anti-CMV, sept patients ont démontré une infection primaire à CMV presque au même moment qu'une infection primaire à EBV (patients 2, 5, 7, 9, 10, 12, 19) et ce, dans les trois premiers mois suivant la transplantation. Un seul de ces patients a développé un PTLD qui lui a été fatal à 12 semaines post-greffe. De plus, quatre de ces sept patients ont fait une infection à CMV symptomatique (trois hépatites et une duodénite). Ils ont tous été traités avec du ganciclovir avec succès. La prophylaxie anti-CMV ne semble pas empêcher le patient d'être infecté par CMV (Figure 1B de l'article, le patient 5 a reçu environ 100 jours de ganciclovir de façon préventive suite à la transplantation, ce qui ne l'a pas empêché de faire une infection primaire à CMV 10 semaines post-greffe), mais prévient certainement les complications plus sévères comme une pneumonie à CMV qui pourraient survenir. L'utilisation du ganciclovir semble de plus être très efficace pour contrer la réplication virale du CMV puisqu'aucun patient ne semble avoir réactiver son CMV après l'arrêt du ganciclovir ou pire encore, développer une résistance à ce dernier.

On peut également observer que dans les 11 cas où D - / R - pour CMV, aucune transmission du virus par des produits sanguins n'a été observée. Ceci est dû au fait que les produits sanguins sont traités avant d'être transfusés aux patients à risque pour CMV. Par contre, dans les trois cas où D - / R - pour EBV, tous ont fait leur infection primaire dans les trois premiers mois suivant la transplantation. Bien que deux d'entre eux n'aient pas démontré une charge virale élevée, le troisième (voir Table 1 de l'article, patient 1) a développé un PTLD après avoir reçu des produits sanguins cellulaires provenant d'un individu ayant fait une mononucléose infectieuse 15 mois avant le don de sang (1). Il serait donc souhaitable de pouvoir utiliser des produits sanguins exempts d'EBV dans les cas où les receveurs d'organe sont négatifs pour EBV. Mais puisque l'irradiation du sang (traitement effectué pour éliminer le CMV) ne semble pas éliminer l'EBV (le patient 1 a reçu du sang traité pour CMV avant de développer un PTLD), il faudrait dans ce cas retirer les lymphocytes B du sang avant de le transfuser au patient. Une solution alternative serait de vacciner les patients séronégatifs pour EBV avant la transplantation

ce qui en théorie réduirait les risques de PTLD. Mais aucun vaccin n'est encore utilisé de façon routinière pour l'instant bien que plusieurs essais cliniques soient en cours notamment en Chine où la proportion de carcinome du nasopharynx est très élevée (200).

D'autres infections virales ont le potentiel de réactiver l'EBV ou d'agir en synergie avec ce dernier, comme c'est le cas de la plupart des membres de la famille des virus herpès (CMV, HSV, VZV, HHV-6 /7 /8) (62, 205). Cinq transplantés ont fait une ou plusieurs infections herpétiques suite à leur transplantation. Chacune de ces épisodes correspondaient à une montée de la charge virale EBV sanguine comme le démontre si bien la Figure 5 (annexe 2). L'acyclovir a été administré au patient à chacun de ces épisodes ce qui a eu pour effet de faire diminuer la charge virale EBV par la suite pour la majorité des patients.

En conclusion, la charge virale EBV sanguine combinée à la sérologie EA semblent pouvoir nous permettre d'évaluer le degré d'immunosuppression du patient et ainsi nous indiquer avec une plus grande précision les patients à risque de développer un PTLD.

IV

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. Alfieri C, Tanner J, Carpentier L, Perpète C, Savoie A, Paradis K, Delage G, Joncas JH. Epstein-Barr virus transmission from a blood donor to an organ transplant recipient with recovery of the same virus strain from the recipient's blood and oropharynx. *Blood* 1996; 87(2): 812-817.
2. Aguilar LK, Rooney CM, Heslop HE. Lymphoproliferative disorders involving Epstein-Barr virus after hemopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Oncol* 1999; 11(2): 96-101.
3. Ambinder RF, Mann RB. Detection and characterization of Epstein-Barr virus in clinical specimens. *Am J Pathol* 1994; 145(2): 239-252.
4. Anagnostopoulos I, Herbst H, Niedobitek G, Stein H. Demonstration of monoclonal EBV genomes in Hodgkin's disease and KI-1-positive anaplastic large cell lymphoma by combined Southern blot and *in situ* hybridization. *Blood* 1989; 74(2): 810-816.
5. Anagnostopoulos I, Hummel M, Finn T, Tiemann M, Korbjuhn P, Dimmler C, Gatter K, Dallenbach F, Parwaresch MR, Stein H. Heterogeneous Epstein-Barr virus infection patterns in peripheral T-cell lymphoma of angioimmunoblastic lymphadenopathy type. *Blood* 1992; 80(7): 1804-1812.
6. Anagnostopoulos I, Hummel M, Kreschel C, Stein H. Morphology, immunophenotype, and distribution of latently and/or productively Epstein-Barr virus-infected cells in acute infectious mononucleosis: implications for the interindividual infection route of Epstein-Barr virus. *Blood* 1995; 85(3): 744-750.
7. Aris RM, Maia DM, Neuringer IP, Gott K, Kiley S, Gertis K, Handy J. Post-transplantation lymphoproliferative disorder in the Epstein-Barr virus-naïve lung transplant recipient. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 1712-1717.
8. Audouin J, Prevot S, Brouland JP, Molina T, Le Tourneau A, Diebold J. Apport des techniques d'immunohistochimie et d'hybridation *in situ* dans les affections dues ou associées au virus d'Epstein-Barr. *Arch Anat Cytol Path* 1992; 40(2-3): 95-104.
9. Babcock GJ, Decker LL, Freeman RB, Thorley-Lawson DA. Epstein-Barr virus-infected resting memory B cells, not proliferating lymphoblasts, accumulate in the peripheral blood of immunosuppressed patients. *J Exp Med* 1999; 190(4): 567-576.

10. Bai X, Hosler G, Rogers BB, Dawson DB, Scheuermann RH. Quantitative polymerase chain reaction for human herpesvirus diagnosis and measurement of Epstein-Barr virus burden in posttransplant lymphoproliferative disorder. *Clin Chem* 1997; 43(10): 1843-1849.
11. Baldanti F, Grossi P, Furione M, Simoncini L, Sarasini A, Comoli P, Maccario R, Fiocchi R, Gerna G. High levels of Epstein-Barr virus DNA in blood of solid-organ transplant recipients and their value in predicting posttransplant lymphoproliferative disorders. *J Clin Microbiol* 2000; 38(2): 613-619.
12. Basgoz N, Preiksaitis JK. Post-transplant lymphoproliferative disorder. *Infect Dis Clin North Am* 1995; 9(4): 901-923.
13. Beatty PR, Krams SM, Esquivel CO, Martinez OM. Effect of cyclosporine and tacrolimus on the growth of Epstein-Barr virus-transformed B-cell lines. *Transplantation* 1998; 65(9): 1248-1255.
14. Birkeland SA, Hamilton-Dutoit S, Sandvej K, Andersen HMK, Bendtzen K, Moller B, Jorgensen KA. EBV-induced post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD). *Transplant Proc* 1995; 27(6): 3467-3472.
15. a) Borchers AT, Perez R, Kaysen G, Ansari AA, Gershwin ME. Role of cytomegalovirus infection in allograft rejection: a review of possible mechanisms. *Transplant Immunol* 1999; 7: 75-82.
b) Boyle GJ, Michaels MG, Webber SA, Knisely AS, Kurland G, Cipriani LA, Griffith BP, Fricker FJ. Posttransplantation lymphoproliferative disorders in pediatric thoracic organ recipients. *J Pediatr* 1997; 131: 309-313.
16. Breinig MC, Zitelli B, Starzl TE, Ho M. Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and other viral infections in children after liver transplantation. *J Infect Dis* 1987; 156(2): 273-279.
17. Brousset P, Knecht H, Rubin B, Drouet E, Chittal S, Meggetto F, Al Saati T, Bachmann E, Denoyel G, Sergeant A, Delsol G. Demonstration of Epstein-Barr virus replication in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Blood* 1993; 82(3): 872-876.
18. Brousset P, Meggetto F, Chittal S, Bibeau F, Arnaud J, Rubin B, Delsol G. Methods in laboratory investigation: assessment of the methods for the detection of Epstein-Barr virus nucleic acids and related gene products in Hodgkin's disease. *Lab Invest* 1993; 69(4): 483-489.

19. Brusamolino E, Pagnucco G, Bernasconi C. Secondary lymphomas: a review on lymphoproliferative diseases arising in immunocompromised hosts. Prevalence, clinical features and pathogenetic mechanisms. *Haematologica* 1989; 74: 605-622.
20. Burke GW, Cirocco R, Hensley G, Reddy R, Jeffers L, Schiff E, Miller J. The rapid development of a fatal disseminated B cell lymphoma following liver transplantation: serial changes in levels of soluble serum interleukin 2 and interleukin 4 (B cell growth factor). *Transplantation* 1992; 53(5): 1148-1150.
21. Burman K, Crawford DH. Effect of FK506 on Epstein-Barr virus specific cytotoxic T cells. *Lancet* 1991; 337: 297-298.
22. Cacciarelli TV, Green M, Jaffe R, Mazariegos GV, Jain A, Fung JJ, Reyes J. Management of posttransplant lymphoproliferative disease in pediatric liver transplant recipients receiving primary tacrolimus (FK506) therapy. *Transplantation* 1998; 66(8): 1047-1052.
23. Cacciarelli TV, Reyes J, Mazariegos GV, Sigurdsson L, Rowe DT, Fung JJ, Green M. Natural history of Epstein-Barr viral load in peripheral blood of pediatric liver transplant recipients during treatment for posttransplant lymphoproliferative disorder. *Transplant Proc* 1999; 31(1-2): 488-489.
24. Caillard S, Heibel F, Benaïcha M, Moulin B. Lymphomes post-transplantation et virus Epstein-Barr. *Néphrologie* 1998; 19(8): 481-488.
25. Callan MF, Tan L, Annels N, Ogg GS, Wilson JD, O'Callaghan CA, Steven N, McMichael AJ, Rickinson AB. Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus *in vivo*. *J Exp Med* 1998; 187(9): 1395-1402.
26. Camilleri-Broët S, Davi F, Feuillard J, Bourgeois C, Seilhean D, Hauw JJ, Raphaël M. High expression of latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus and BCL-2 oncoprotein in acquired immunodeficiency syndrome-related primary brain lymphomas. *Blood* 1995; 86(2): 432-435.
27. Canfield CW, Hudnall SD, Colonna JO, Busuttil RW, Wilkinson AH, Danovitch G, Shaked A, Goldstein L, Rosenthal JT. Fulminant Epstein-Barr virus-associated post-transplant lymphoproliferative disorders following OKT3 therapy. *Clin Transplant* 1992; 6: 1-9.
28. Cen H, Williams PA, McWilliams HP, Breinig MC, Ho M, McKnight JLC. Evidence for restricted Epstein-Barr virus latent gene expression and anti-EBNA antibody response in solid organ transplant recipients with posttransplant lymphoproliferative disorders. *Blood* 1993; 81(5): 1393-1403.

29. Chadburn A, Chen JM, Hsu DT, Frizzera G, Cesarman E, Garrett TJ, Mears JG, Zangwill SD, Addonizio LJ, Michler RE, Knowles DM. The morphologic and molecular genetic categories of posttransplantation lymphoproliferative disorders are clinically relevant. *Cancer* 1998; 82(10): 1978-1987.
30. Chan LC, Srivastava G, Pittaluga S, Kwong YL, Liu HW, Yuen HL. Detection of clonal Epstein-Barr virus in malignant proliferation of peripheral blood CD3+ CD8+ T cells. *Leukemia* 1992; 6(9): 952-956.
31. Cheeseman SH, Henle W, Rubin RH, Tolloff-Rubin NE, Cosimi B, Cantell K, Winkle S, Herrin JT, Black PH, Russell PS, Hirsch MS. Epstein-Barr virus infection in renal transplant recipients: effects of antithymocyte globulin and interferon. *Ann Intern Med* 1980; 93(1): 39-42.
32. Chen MC, Gau JP, Hwang WL, Young JH. Combination chemotherapy for posttransplant cyclosporine-related non-Hodgkin's lymphoma. *Transplantation* 1993; 55(5): 1203.
33. Cleary ML, Nalesnik MA, Shearer WT, Sklar J. Clonal analysis of transplant-associated lymphoproliferations based on the structure of the genomic termini of the Epstein-Barr virus. *Blood* 1988; 72(1): 349-352.
34. Cockfield SM, Preiksaitis JK, Harvey E, Jones C, Hebert D, Keown P, Halloran PF. Is sequential use of ALG and OKT3 in renal transplants associated with an increased incidence of fulminant posttransplant lymphoproliferative disorder? *Transplant Proc* 1991; 23(1): 1106-1107.
35. Cockfield SM, Preiksaitis JK, Jewell LD, Parfrey NA. Post-transplant lymphoproliferative disorder in renal allograft recipients. *Transplantation* 1993; 56(1): 88-96.
36. Cohen JI. Epstein-Barr virus lymphoproliferative disease associated with acquired immunodeficiency. *Medecine* 1991; 70(2): 137-160.
37. Cohen JI. The biology of Epstein-Barr virus: lessons learned from the virus and the host. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 365-370.
38. Cox KL, Lawrence-Miyasaki LS, Garcia-Kennedy R, Lennette ET, Martinez OM, Krams SM, Berquist WE, So SKS, Esquivel CO. An increased incidence of Epstein-Barr virus infection and lymphoproliferative disorder in young children on FK506 after liver transplantation. *Transplantation* 1995; 59(4): 524-529.
39. Craig FE, Clare N, Sklar JL, Banks PM. T-cell lymphoma and the virus-associated hemophagocytic syndrome. *Am J Clin Pathol* 1992; 97(2): 189-194.

40. Craig FE, Gulley ML, Banks PM. Posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol* 1993; 99(3): 265-276.
41. Crompton CH, Cheung RK, Donjon C, Miyazaki I, Feinmesser R, Hébert D, Dosch HM. Epstein-Barr virus surveillance after renal transplantation. *Transplantation* 1994; 57(8): 1182-1189.
42. Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM. Human *c-myc onc* gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 7824-7827.
43. Davis CL, Harrison KL, McVicar JP, Forg PJ, Bronner MP, Marsh CL. Antiviral prophylaxis and the Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disorder. *Clin Transplant* 1995; 9: 53-59.
44. Davis CL. The antiviral prophylaxis of post-transplant lymphoproliferative disorder. *Springer Semin Immunopathol* 1998; 20: 437-453.
45. Decker LL, Klamon LD, Thorley-Lawson DA. Detection of the latent form of Epstein-Barr virus DNA in the peripheral blood of healthy individuals. *J Virol* 1996; 70(5): 3286-3289.
46. Deeg HJ, Socié G. Malignancies after hematopoietic stem cell transplantation: many questions, some answers. *Blood* 1998; 91(6): 1833-1844.
47. Delsol G, Brousset P, Chittal S, Rigal-Huguet F. Correlation of the expression of Epstein-Barr virus latent membrane protein and *in situ* hybridization with biotinylated *BamH1-W* probes in Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 1992; 140(2): 247-253.
48. De-Thé G, Geser A, Day NE, Tukei PM, Williams EH, Beri DP, Smith PG, Dean AG, Bornkamm GW, Feorino P, Henle W. Epidemiological evidence for causal relationship between Epstein-Barr virus and Burkitt's lymphoma from Ugandan prospective study. *Nature* 1978; 274: 756-761.
49. DeWaal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 1991; 174: 915-924.
50. Dror Y, Greenberg M, Taylor G, Superina R, Hebert D, West L, Connolly B, Sena L, Allen U, Weitzman S. Lymphoproliferative disorders after organ transplantation in children. *Transplantation* 1999; 67(7): 990-998.

51. Ellis D, Jaffe R, Green M, Janosky JJ, Lombardo-Lane S, Shapiro R, Scantlebury V, Vivas C, Jordan ML. Epstein-Barr virus-related disorders in children undergoing renal transplantation with tacrolimus-based immunosuppression. *Transplantation* 1999; 68(7): 997-1003.
52. Emanuel DJ, Lucas KG, Mallory GB, Edwards-Brown MK, Pollok KE, Conrad PD, Robertson KA, Smith FO. Treatment of posttransplant lymphoproliferative disease in the central nervous system of a lung transplant recipient using allogeneic leukocytes. *Transplantation* 1997; 63(11): 1691-1694.
53. Faro A. Interferon- α and its effects on post-transplant lymphoproliferative disorders. *Springer Semin Immunopathol* 1998; 20: 425-436.
54. Faye A, van den Abeele T, Peuchmaur M, Mathieu-Boue A, Vilmer E. Anti-CD20 monoclonal antibody for post-transplant lymphoproliferative disorders. *Lancet* 1998; 352: 1285.
55. Finn L, Reyes J, Bueno J, Yunis E. Epstein-Barr virus infections in children after transplantation of the small intestine. *Am J Surg Pathol* 1998; 22(3): 299-309.
56. Fischer A, Blanche S, Le Bidois J, Bordigoni P, Garnier JL, Niaudet P, Morinet F, Le Deist F, Fischer AM, Griscelli C, Hirn M. Anti-B-cell monoclonal antibodies in the treatment of severe B-cell lymphoproliferative syndrome following bone marrow and organ transplantation. *N Engl J Med* 1991; 324: 1451-1456.
57. Gaillard F, Mechinaud-Lacroix F, Papin S, Moreau A, Mollat C, Fiche M, Peltier S, Juin de Faucal P, Rousselet MC, Praloran V, Harousseau JL. Primary Epstein-Barr virus infection with clonal T-cell lymphoproliferation. *Am J Clin Pathol* 1992; 98(3): 324-333.
58. Gan YJ, Sullivan JL, Sixbey JW. Detection of cell-free Epstein-Barr virus DNA in serum during acute infectious mononucleosis. *J Infect Dis* 1994; 170: 436-439.
59. Gerritsen EJA, Stam ED, Hermans J, van den Berg H, Haraldsson A, van Tol MJD, Langlois van den Bergh R, Waaijer JLM, Kroes ACM, Kluin PM, Vossen JM. Risk factors for developing EBV-related B cell lymphoproliferative disorders (BLPD) after non-HLA-identical BMT in children. *Bone Marrow Transplant* 1996; 18: 377-382.
60. Geser A, de-Thé G, Lenoir G, Day NE, Williams EH. Final case reporting from the Ugandan prospective study of the relationship between EBV and Burkitt's lymphoma. *Int J Cancer* 1982; 29: 397-400.
61. Ginsburg CM, Henle W, Henle G, Horwitz CA. Infectious mononucleosis in children: evaluation of Epstein-Barr virus-specific serological data. *JAMA* 1977; 237(8): 781-785.

62. Gnann JW. Other herpesviruses: herpes simplex virus, varicella-zoster virus, human herpesvirus types 6, 7, and 8. In: *Transplant Infections*, Bowden RA, Ljungman P, Paya CV, eds, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1998: 265-285.
63. Gratama JW, Oosterveer MAP, Lepoutre JMM, van Rood JJ, Zwaan FE, Vossen JMJJ, Kapsenberg JG, Richel D, Klein G, Ernberg I. Serological and molecular studies of Epstein-Barr virus infection in allogeneic marrow graft recipients. *Transplantation* 1990; 49(4): 725-730.
64. Gratama JW, Oosterveer MAP, Zwaan FE, Lepoutre JMM, Klein G, Ernberg I. Eradication of Epstein-Barr virus by allogeneic bone marrow transplantation: implications for sites of viral latency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 8693-8696
65. Green M, Cacciarelli TV, Mazariegos GV, Sigurdsson L, Qu L, Rowe DT, Reyes J. Serial measurement of Epstein-Barr viral load in peripheral blood in pediatric liver transplant recipients during treatment for posttransplant lymphoproliferative disease. *Transplantation* 1998; 66(12): 1641-1644.
66. Green M, Kaufmann M, Wilson J, Reyes J. Comparison of intravenous ganciclovir followed by oral acyclovir with intravenous ganciclovir alone for prevention of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus disease after liver transplantation in children. *Clin Infect Dis* 1997; 25(6): 1344-1349.
67. Green M, Michaels MG, Webber SA, Rowe D, Reyes J. The management of Epstein-Barr virus associated post-transplant lymphoproliferative disorders in pediatric solid-organ transplant recipients. *Pediatr Transplant* 1999; 3(4): 271-281.
68. Green M, Reyes J, Jabbour N, Yunis E, Putnam P, Todo S, Rowe D. Use of quantitative PCR to predict onset of Epstein-Barr viral infection and post-transplant lymphoproliferative disease after intestinal transplantation in children. *Transplant Proc* 1996; 28(5): 2759-2760.
69. Greenspan JS, Greenspan D, Lennette ET, Abrams DI, Conant MA, Petersen V, Freese UK. Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral hairy leukoplakia, an AIDS-associated lesion. *N Engl J Med* 1985; 313: 1564-1571.
70. Gregory CD, Murray RJ, Edwards CF, Rickinson AB. Downregulation of cell adhesion molecules LFA-3 and ICAM-1 in Epstein-Barr virus-positive Burkitt's lymphoma underlies tumor cell escape from virus-specific T cell surveillance. *J Exp Med* 1988; 167: 1811-1824.

71. Grierson H, Purtilo DT. Epstein-Barr virus infections in males with the X-linked lymphoproliferative syndrome. *Ann Intern Med* 1987; 106: 538-545.
72. Grogan E, Jenson H, Countryman J, Heston L, Gradoville, Miller G. Transfection of a rearranged viral DNA fragment, WZhet, stably converts latent Epstein-Barr viral infection to productive infection in lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 1332-1336.
73. Grundy JE. Virologic and pathogenetic aspects of cytomegalovirus infection. *Rev Infect Dis* 1990; 12: s711-s719.
74. Gulley ML, Raab-Traub N. Detection of Epstein-Barr virus in human tissues by molecular genetic techniques. *Arch Pathol Lab Med* 1993; 117: 1115-1120.
75. Gustafsson A, Levitsky V, Zou JZ, Frisan T, Dalianis T, Ljungman P, Ringden O, Winiarski J, Ernberg I, Masucci MG. Epstein-Barr virus (EBV) load in bone marrow transplant recipients at risk to develop posttransplant lymphoproliferative disease: prophylactic infusion of EBV-specific cytotoxic T cells. *Blood* 2000; 95(3): 807-814.
76. Hamilton-Dutoit SJ, Pallesen G, Franzmann MB, Karkov J, Black F, Skinhoj P, Pedersen C. AIDS-related lymphoma: histopathology, immunophenotype, and association with Epstein-Barr virus as demonstrated by *in situ* nucleic acid hybridization. *Am J Pathol* 1991; 138(1): 149-163.
77. Hamilton-Dutoit SJ, Pallesen G. A survey of Epstein-Barr virus gene expression in sporadic non-Hodgkin's lymphomas: detection of Epstein-Barr virus in a subset of peripheral T-cell lymphomas. *Am J Pathol* 1992; 140(6): 1315-1325.
78. Hamilton-Dutoit SJ, Raphael M, Audouin J, Diebold J, Lisse I, Pedersen C, Oksenhendler E, Marelle L, Pallesen G. *In situ* demonstration of Epstein-Barr virus small RNAs (EBER 1) in acquired immunodeficiency syndrome-related lymphomas: correlation with tumor morphology and primary site. *Blood* 1993; 82(2): 619-624.
79. Hamilton-Dutoit SJ, Rea D, Raphael M, Sandvoj K, Delecluse HJ, Gisselbrechi C, Marelle L, van Krieken J, Pallesen G. Epstein-Barr virus-latent gene expression and tumor cell phenotype in acquired immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin's lymphoma: correlation of lymphoma phenotype with three distinct patterns of viral latency. *Am J Pathol* 1993; 143(4): 1072-1085.
80. Hanasono MM, Kamel OW, Chang PP, Rizeq MN, Billingham ME, van de Rijn M. Detection of Epstein-Barr virus in cardiac biopsies of heart transplant patients with lymphoproliferative disorders. *Transplantation* 1995; 60(5): 471-473.

81. Hanto DW, Frizzera G, Gajl-Peczalska KJ, Sakamoto K, Purtilo DT, Balfour HH, Simmons RL, Najarian JS. Epstein-Barr virus-induced B-cell lymphoma after renal transplantation. *N Engl J Med* 1982; 306(15): 913-918.
82. Hanto DW, Frizzera G, Gajl-Peczalska KJ, Simmons RL. Epstein-Barr virus, immunodeficiency, and B cell lymphoproliferation. *Transplantation* 1985; 39(5): 461-472.
83. Hanto DW, Gajl-Peczalska KJ, Frizzera G, Arthur DC, Balfour HH, McClain K, Simmons RL, Najarian JS. Epstein-Barr virus induced polyclonal and monoclonal B-cell lymphoproliferative diseases occurring after renal transplantation: clinical, pathologic, and virologic findings and implications for therapy. *Ann Surg* 1983; 198(3): 356-367.
84. Hanto DW. Classification of Epstein-Barr virus-associated posttransplant lymphoproliferative diseases: implications for understanding their pathogenesis and developing rational treatment strategies. *Annu Rev Med* 1995; 46: 381-394.
85. Harabuchi Y, Yamanaka N, Kataura A, Imai S, Kinoshita T, Mizuno F, Osato T. Epstein-Barr virus in nasal T-cell lymphomas in patients with lethal midline granuloma. *Lancet* 1990; 335: 128-130.
86. Harmon WE, Dharnidharka VR. Lymphoproliferative disease in children. *Transplant Proc* 1999; 31: 1268-1269.
87. Henle G, Henle W, Diehl V. Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968; 59: 94-101.
88. Henle G, Henle W, Klein G. Demonstration of two distinct components in the early antigen complex of Epstein-Barr virus-infected cells. *Int J Cancer* 1971; 8: 272-282.
89. Henle W, Henle G. Epstein-Barr virus-specific serology in immunologically compromised individuals. *Cancer Res* 1981; 41: 4222-4225.
90. Herbst H, Dallenbach F, Hummel M, Niedobitek G, Pileri S, Müller-Lantzsch N, Stein H. Epstein-Barr virus latent membrane protein expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 4766-4770.
91. Herndier BG, Sanchez HC, Chang KL, Chen YY, Weiss LM. High prevalence of Epstein-Barr virus in the Reed-Sternberg cells of HIV-associated Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 1993; 142(4): 1073-1079.

92. Heslop HE, Ng CYC, Li C, Smith CA, Loftin SK, Krance RA, Brenner MK, Rooney CM. Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. *Nature Med* 1996; 2(5): 551-555.
93. Heslop HE, Rooney CM. Adoptive cellular immunotherapy for EBV lymphoproliferative diseases. *Immunol Rev* 1997; 157: 217-222.
94. Ho M, Jaffe R, Miller G, Breinig MK, Dummer JS, Makowka L, Atchison RW, Karrer F, Nalesnik MA, Starzl TE. The frequency of Epstein-Barr virus infection and associated lymphoproliferative syndrome after transplantation and its manifestations in children. *Transplantation* 1988; 45: 719-727.
95. Ho M, Miller G, Atchison RW, Breinig MK, Dummer JS, Andiman W, Starzl TE, Eastman R, Griffith BP, Hardesty RL, Bahnson HT, Hakala TR, Rosenthal JT. Epstein-Barr virus infections and DNA hybridization studies in posttransplantation lymphoma and lymphoproliferative lesions: the role of primary infection. *J Infect Dis* 1985; 152(5): 876-886.
96. Hornef MW, Wagner HJ, Fricke L, Bein G, Kirchner H. Immunocytochemical detection of Epstein-Barr virus antigens in peripheral B lymphocytes after renal transplantation. *Transplantation* 1995; 59(1): 138-140.
97. Hornung N, Degiannis D. Up-regulation by cyclosporine (CsA) of the *in vitro* release of soluble CD23 (sCD23) and of the *in vitro* production of IL-6 and IgM. *Scand J Immunol* 1993; 38: 287-292.
98. Horwitz CA, Henle W, Henle G, Goldfarb M, Kubic P, Gehrz RC, Balfour HH, Fleisher GR, Krivit W. Clinical and laboratory evaluation of infants and children with Epstein-Barr virus-induced infectious mononucleosis: report of 32 patients (aged 10-48 months). *Blood* 1981; 57(5): 933-938.
99. Howe JG, Steitz JA. Localization of Epstein-Barr virus-encoded small RNAs by *in situ* hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 9006-9010.
100. Hsu DH, de Waal Malefyt R, Fiorentino DF, Dang MN, Vieira P, deVries J, Spits H, Mosmann TR, Moore KW. Expression of interleukin-10 activity by Epstein-Barr virus protein BCRF1. *Science* 1990; 250: 830-832.
101. Hurley EA, Thorley-Lawson DA. B cell activation and the establishment of Epstein-Barr virus latency. *J Exp Med* 1988; 168: 2059-2075.
102. Joab I, Triki H, de Saint Martin J, Perricaudet M, Nicolas JC. Detection of anti-Epstein-Barr virus *trans*-antivator (ZEBRA) antibodies in sera from patients with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1991; 163: 53-56.

103. Joncas JH, Russo P, Brochu P, Simard P, Brisebois J, Dubé J, Marton D, Leclerc JM, Hume H, Rivard GE. Epstein-Barr virus polymorphic B-cell lymphoma associated with leukemia and with congenital immunodeficiencies. *J Clin Oncol* 1990; 8(3): 378-384.
104. Jones JF, Shurin S, Abramowsky C, Tubbs RR, Sciotto CG, Wahl R, Sands J, Gottman D, Katz BZ, Sklar J. T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infections. *N Engl J Med* 1988; 318(12): 733-741.
105. Kafé H, Wechsler J, Gaulard P, Gosselin B. Le virus d'Epstein-Barr: implications en pathologie. *Ann Pathol* 1998; 18(1): 16-28.
106. Kanavaros P, Lescs MC, Brière J, Divine M, Galateau F, Joab I, Bosq J, Farcet JP, Reyes F, Gaulard P. Nasal T-cell lymphoma: a clinicopathologic entity associated with peculiar phenotype and with Epstein-Barr virus. *Blood* 1993; 81(10): 2688-2695.
107. Karajannis MA, Hummel M, Anagnostopoulos I, Stein H. Strict lymphotropism of Epstein-Barr virus during acute infectious mononucleosis in nonimmuno-compromised individuals. *Blood* 1997; 89(8): 2856-2862.
108. Katz Z, Raab-Traub N, Miller G. Latent and replicating forms of Epstein-Barr virus DNA in lymphomas and lymphoproliferative diseases. *J Infect Dis* 1989; 160(4): 589-598.
109. Kenagy DN, Schlesinger Y, Weck K, Ritter JH, Gaudreault-Keener MM, Storch GA. Epstein-Barr virus DNA in peripheral blood leukocytes of patients with posttransplant lymphoproliferative disease. *Transplantation* 1995; 60(6): 547-554.
110. Khatri VP, Baiocchi RA, Peng R, Oberkircher AR, Dolce JM, Ward PM, Herzig GP, Caligiuri MA. Endogenous CD8+ T cell expansion during regression of monoclonal EBV-associated posttransplant lymphoproliferative disorder. *J Immunol* 1999; 163: 500-506.
111. Kieff E. Epstein-Barr virus and its replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996: 2343-2396.
112. Kikuta H, Taguchi Y, Tomizawa K, Kojima K, Kawamura N, Ishizaka A, Sakiyama Y, Matsumoto S, Imai S, Kinoshita T, Koizumi S, Osato T, Kobayashi I, Hamada I, Hirai K. Epstein-Barr virus genome-positive T lymphocytes in a boy with chronic active EBV infection associated with Kawasaki-like disease. *Nature* 1988; 333: 455-457.

113. Kimura H, Morita M, Yabuta Y, Kuzushima K, Kato K, Kojima S, Matsuyama T, Morishima T. Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 1999; 37(1): 132-136.
114. Kitchingman GR, Rooney CM. Cytotoxic T cells and immunotherapy. *Pediatr Radiol* 1998; 28: 489-491.
115. Klein G. Viral latency and transformation: the strategy of Epstein-Barr virus. *Cell* 1989; 58: 5-8.
116. Knowles DM, Cesarman E, Chadburn A, Frizzera G, Chen J, Rose EA, Michler RE. Correlative morphologic and molecular genetic analysis demonstrates three distinct categories of posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Blood* 1995; 85(2): 552-565.
117. Knowles DM. The molecular genetics of post-transplantation lymphoproliferative disorders. *Springer Semin Immunopathol* 1998; 20: 357-373.
118. Kontoyiannis DP, Rubin RH. Infection in the organ transplant recipient. *Infect Dis Clin North Am* 1995; 9(4): 811-822.
119. Krönke M, Leonard WJ, Depper JM, Arya SK, Wong-Staal F, Gallo RC, Waldmann TA, Greene WC. Cyclosporin A inhibits T-cell growth factor gene expression at the level of mRNA transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 5214-5218.
120. Kuehnle I, Huls MH, Liu Z, Semmelmann M, Krance RA, Brenner MK, Rooney CM, Heslop HE. CD20 monoclonal antibody (rituximab) for therapy of Epstein-Barr virus lymphoma after hemopoietic stem-cell transplantation. *Blood* 2000; 95(4): 1502-1505.
121. Kuo PC, Dafoe DC, Alfrey EJ, Sibley RK, Scandling JD. Posttransplant lymphoproliferative disorders and Epstein-Barr virus prophylaxis. *Transplantation* 1995; 59(1): 135-138.
122. Lange B, Henle W, Meyers JD, Yang LC, August C, Koch P, Arbeter A, Henle G. Epstein-Barr virus-related serology in marrow transplant recipients. *Int J Cancer* 1980; 26: 151-157.
123. Lazarovits AI, Tibbles LA, Grant DR, Ghent CN, Wall WJ, White MJ, Joncas JH. Anti-B cell antibodies for the treatment of monoclonal Epstein-Barr virus-induced lymphoproliferative syndrome after multivisceral transplantation. *Clin Invest Med* 1994; 17(6): 621-625.

124. Le Meur Y, Potelune N, Jaccard A, Petit B, Bordessoule D, Peyronnet P, Ranger S, Labrousse F, Leroux-Robert C. Syndromes lymphoprolifératifs après transplantation rénale. *Néphrologie* 1998; 19(5): 255-261.
125. Leblond V, Sutton L, Dorent R, Davi F, Bitker MO, Gabarre J, Charlotte F, Ghossoub JJ, Fourcade C, Fischer A, Gandjbakhch I, Binet JL, Raphael M. Lymphoproliferative disorders after organ transplantation: a report of 24 cases observed in a single center. *J Clin Oncol* 1995; 13(4): 961-968.
126. Li Q, Spriggs MK, Kovats S, Turk SM, Comeau MR, Nepom B, Hutt-Fletcher LM. Epstein-Barr virus uses HLA class II as a cofactor for infection of B lymphocytes. *J Virol* 1997; 71(6): 4657-4662.
127. Li QX, Young LS, Niedobitek G, Dawson CW, Birkenbach M, Wang F, Rickinson AB. Epstein-Barr virus infection and replication in a human epithelial cell system. *Nature* 1992; 356: 347-350.
128. Liebowitz D. Epstein-Barr virus and a cellular signaling pathway in lymphomas from immunosuppressed patients. *N Engl J Med* 1998; 338(20): 1413-1421.
129. Limaye AP, Huang ML, Atienza EE, Ferrenberg JM, Corey L. Detection of Epstein-Barr virus DNA in sera from transplant recipients with lymphoproliferative disorders. *J Clin Microbiol* 1999; 37(4): 1113-1116.
130. Linde A, Andersson B, Svenson SB, Ahrne H, Carlsson M, Forsberg P, Hugo H, Karstorp A, Lenkei R, Lindwall A, Loftenius A, Säll C, Andersson J. Serum levels of lymphokines and soluble cellular receptors in primary Epstein-Barr virus infection and in patients with chronic fatigue syndrome. *J Infect Dis* 1992; 165: 994-1000.
131. List AF, Greco FA, Vogler LB. Lymphoproliferative diseases in immunocompromised hosts: the role of Epstein-Barr virus. *J Clin Oncol* 1987; 5(10): 1673-1689.
132. Locker J, Nalesnik M. Molecular genetic analysis of lymphoid tumors arising after organ transplantation. *Am J Pathol* 1989; 135(6): 977-987.
133. Lopatin WB, Hickey DP, Nalesnik MA, Vivas CA, Flack CE, Jordan ML, Starzl TE, Hakala TR. Post-transplant lymphoproliferative disease and triple therapy. *Clin Transplant* 1990; 4: 47-50.
134. Lucas KG, Burton RL, Zimmerman SE, Wang J, Cornetta KG, Robertson KA, Lee CH, Emanuel DJ. Semiquantitative Epstein-Barr virus (EBV) polymerase chain reaction for the determination of patients at risk for EBV-induced lymphoproliferative disease after stem cell transplantation. *Blood* 1998; 91(10): 3654-3661.

135. Lucas KG, Filo R, Heilman DK, Lee CH, Emanuel DJ. Semiquantitative Epstein-Barr virus polymerase chain reaction analysis of peripheral blood from organ transplant patients and risk for the development of lymphoproliferative disease. *Blood* 1998; 92(10): 3977-3978.
136. MacMahon EME, Glass JD, Hayward SD, Mann RB, Becker PS, Charache P, McArthur JC, Ambinder RF. Epstein-Barr virus in AIDS-related primary central nervous system lymphoma. *Lancet* 1991; 338: 969-973.
137. Maeda A, Wakiguchi H, Yokoyama W, Hisakawa H, Tomoda T, Kurashige T. Persistently high Epstein-Barr virus (EBV) loads in peripheral blood lymphocytes from patients with chronic active EBV infection. *J Infect Dis* 1999; 179: 1012-1015.
138. Mañez R, Breinig MK, Linden P, Wilson J, Torre-Cisneros J, Kusne S, Dummer S, Ho M. Posttransplant lymphoproliferative disease in primary Epstein-Barr virus infection after liver transplantation: the role of cytomegalovirus disease. *J Infect Dis* 1997; 176(6): 1462-1467.
139. Marker SC, Ascher NL, Kalis JM, Simmons RL, Najarian JS, Balfour HH. Epstein-Barr virus antibody responses and clinical illness in renal transplant recipients. *Surgery* 1979; 85(4): 433-440.
140. Martinez OM, Villanueva JC, Lawrence-Miyasaki L, Quinn MB, Cox K, Krams SM. Viral and immunologic aspects of Epstein-Barr virus infection in pediatric liver transplant recipients. *Transplantation* 1995; 59(4): 519-524.
141. Masucci MG, Ernberg I. Epstein-Barr virus: adaptation to a life within the immune system. *Trends Microbiol* 1994; 2(4): 125-130.
142. Masucci MG, Szigeti R, Ernberg I, Hu CP, Torsteinsdottir S, Frade R, Klein E. Activation of B lymphocytes by Epstein-Barr virus / CR2 receptor interaction. *Eur J Immunol* 1987; 17: 815-820.
143. Mathur A, Kamat DM, Filipovich AH, Steinbuch M, Shapiro RS. Immunoregulatory abnormalities in patients with Epstein-Barr virus-associated B cell lymphoproliferative disorders. *Transplantation* 1994; 57(7): 1042-1045.
144. Miyashita EM, Yang B, Babcock GJ, Thorley-Lawson DA. Identification of the site of Epstein-Barr virus persistence *in vivo* as a resting B cell. *J Virol* 1997; 71(7): 4882-4891.
145. Miyashita EM, Yang B, Lam KMC, Crawford DH, Thorley-Lawson DA. A novel form of Epstein-Barr virus latency in normal B cells *in vivo*. *Cell* 1995; 80: 593-601.

146. Montone KT, Friedman H, Hodinka RL, Hicks DG, Kant JA, Tomaszewski JE. *In situ* hybridization for Epstein-Barr virus Not1 repeats in posttransplant lymphoproliferative disorder. *Mod Pathol* 1992; 5(3): 292-302.
147. Montone KT, Hodinka RL, Salhany KE, Lavi E, Rostami A, Tomaszewski JE. Identification of Epstein-Barr virus lytic activity in post-transplantation lymphoproliferative disease. *Mod Pathol* 1996; 9(6): 621-630.
148. Montone KT, Litzky LA, Wurster A, Kaiser L, Bavaria J, Kotloff R, Palevsky H, Pietra GG, Tomaszewski JE. Analysis of Epstein-Barr virus-associated posttransplantation lymphoproliferative disorder after lung transplantation. *Surgery* 1996; 119: 544-551.
149. Mosier DE, Gulizia RJ, Baird SM, Wilson DB. Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature* 1988; 335: 256-259.
150. Mueller N, Evans A, Harris NL, Comstock GW, Jellum E, Magnus K, Orentreich N, Polk BF, Vogelmann J. Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus: altered antibody pattern before diagnosis. *N Engl J Med* 1989; 320: 689-695.
151. Nakanishi M, Kikuta H, Tomizawa K, Kojima K, Ishizaka A, Okano M, Sakiyama Y, Matsumoto S. Distinct clonotypic Epstein-Barr virus-induced fatal lymphoproliferative disorder in a patient with Wiskott-Aldrich syndrome. *Cancer* 1993; 72(4): 1376-1381.
152. Nakazawa Y, Chisuwa H, Ikegami T, Hashikura Y, Matsunami H, Ichikawa T, Oh-Ishi T, Kawasaki S. Efficacy of quantitative analysis of Epstein-Barr virus-infected peripheral blood lymphocytes by *in situ* hybridization of EBER1 after living-related liver transplantation. *Transplantation* 1997; 63(9): 1363-1366.
153. Nakhleh RE, Manivel JC, Copenhaver CM, Sung JH, Strickler JG. *In situ* hybridization for the detection of Epstein-Barr virus in central nervous system lymphomas. *Cancer* 1991; 67: 444-448.
154. Nalesnik MA, Jaffe R, Starzl TE, Demetris AJ, Porter K, Burnham JA, Makowka L, Ho M, Locker J. The pathology of posttransplant lymphoproliferative disorders occurring in the setting of cyclosporine A-prednisone immunosuppression. *Am J Pathol* 1988; 133: 173-192.
155. Nalesnik MA, Rao AS, Furukawa H, Pham S, Zeevi A, Fung JJ, Klein G, Gritsch HA, Elder E, Whiteside TL, Starzl TE. Autologous lymphokine-activated killer cell therapy of Epstein-Barr virus-positive and -negative lymphoproliferative disorders arising in organ transplant recipients. *Transplantation* 1997; 63(9): 1200-1205.

156. Nalesnik MA, Zeevi A, Randhawa PS, Faro A, Spichty KJ, Demetris AJ, Fung JJ, Whiteside TL, Starzl TE. Cytokine mRNA profiles in Epstein-Barr virus-associated post-transplant lymphoproliferative disorders. *Clin Transplant* 1999; 13(1 Pt 1): 39-44.
157. Nalesnik MA. Clinical and pathological features of post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLD). *Springer Semin Immunopathol* 1998; 20: 325-342.
158. Nazaruk RA, Rochford R, Hobbs MV, Cannon MJ. Functional diversity of the CD8+ T-cell response to Epstein-Barr virus (EBV): implications for the pathogenesis of EBV-associated lymphoproliferative disorders. *Blood* 1998; 91(10): 3875-3883.
159. Nemerow GR, Cooper NR. Early events in the infection of human B lymphocytes by Epstein-Barr virus: the internalization process. *Virology* 1984; 132: 186-198.
160. Newell KA, Alonso EM, Whittington PF, Bruce DS, Millis JM, Piper JB, Woodle ES, Kelly SM, Koeppen H, Hart J, Rubin CM, Thistlethwaite JR. Posttransplant lymphoproliferative disease in pediatric liver transplantation: interplay between primary Epstein-Barr virus infection and immunosuppression. *Transplantation* 1996; 62 (3): 370-375.
161. Niederman JC, Miller G, Pearson HA, Pagano JS, Dowaliby JM. Infectious mononucleosis: Epstein-Barr virus shedding in saliva and the oropharynx. *N Engl J Med* 1976; 294(25): 1355-1359.
162. Niedobitek G, Agathangelou A, Herbst H, Whitehead L, Wright DH, Young LS. Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: virus latency, replication and phenotype of EBV-infected cells. *J Pathol* 1997; 182: 151-159.
163. Niedobitek G, Hamilton-Dutoit S, Herbst H, Finn T, Vetner M, Pallesen G, Stein H. Identification of Epstein-Barr virus-infected cells in tonsils of acute infectious mononucleosis by *in situ* hybridization. *Hum Pathol* 1989; 20(8): 796-799.
164. Niedobitek G, Herbst H, Young LS, Brooks L, Masucci MG, Crocker J, Rickinson AB, Stein H. Patterns of Epstein-Barr virus infection in non-neoplastic lymphoid tissue. *Blood* 1992; 79(10): 2520-2526.
165. Niesters HGM, van Esser J, Fries E, Wolthers KC, Cornelissen J, Osterhaus ADME. Development of a real-time quantitative assay for detection of Epstein-Barr virus. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 712-715.
166. Norville R, Nance D, Cheshire S. Virus-specific cytotoxic T lymphocytes as prophylaxis for Epstein-Barr virus lymphoproliferative disease in pediatric bone marrow transplant recipients. *J Pediatr Oncol Nurs* 1997; 14(4): 194-201.

167. O'Reilly RJ, Small TN, Papadopoulos E, Lucas K, Lacerda J, Koulova L. Biology and adoptive cell therapy of Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders in recipients of marrow allografts. *Immunol Rev* 1997; 157: 195-216.
168. O'Reilly RJ, Small TN, Papadopoulos E, Lucas K, Lacerda J, Koulova L. Adoptive immunotherapy for Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders complicating marrow allografts. *Springer Semin Immunopathol* 1998; 20: 455-491.
169. Oertel SH, Ruhnke MS, Anagnostopoulos I, Kahl AA, Frewer AF, Bechstein WO, Hummel MW, Riess HB. Treatment of Epstein-Barr virus-induced posttransplantation lymphoproliferative disorder with foscarnet alone in an adult after simultaneous heart and renal transplantation. *Transplantation* 1999; 67(5): 765-767.
170. Ohga S, Takada H, Honda K, Inamura T, Gondo K, Ohshima K, Yamamoto M, Hara T. Central nervous system T-cell lymphoproliferative disorder in a patient with chronic active Epstein-Barr virus infection. *J Pediatr Hematol Oncol* 1999; 21(1): 42-46.
171. Ooka T, de Turenne-Tessier M, Stolzenberg MC. Relationship between antibody production to Epstein-Barr virus (EBV) early antigens and various EBV-related diseases. *Springer Semin Immunopathol* 1991; 13: 233-247.
172. Opelz G, Henderson R. Incidence of non-Hodgkin lymphoma in kidney and heart transplant recipients. *Lancet* 1993; 342: 1514-1516.
173. Pagano JS. Detection of Epstein-Barr virus with molecular hybridization techniques. *Rev Infect Dis* 1991; 13(suppl 1): S123-128.
174. Palacios R. Cyclosporin A abrogates proliferation of T cells and generation of suppressor and cytotoxic T-cell function induced by Epstein-Barr virus. *Immunobiol* 1981; 160: 321-329.
175. Pallesen G, Hamilton-Dutoit SJ, Rowe M, Young LS. Expression of Epstein-Barr virus latent gene products in tumor cells of Hodgkin's disease. *Lancet* 1991; 337: 320-322.
176. Pallesen G, Sandvej K, Hamilton-Dutoit SJ, Rowe M, Young LS. Activation of Epstein-Barr virus replication in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Blood* 1991; 78(5): 1162-1165.
177. Patel R, Paya CV. Cytomegalovirus infection and disease in solid organ transplant recipients. In: *Transplant Infections*, Bowden RA, Ljungman P, Paya CV, eds, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1998: 229-244.

178. Pedneault L, Katz BZ, Miller G. Detection of Epstein-Barr virus in the brain by the polymerase chain reaction. *Ann Neurol* 1992; 32: 184-192.
179. Pedneault L, Lapointe N, Alfieri C, Ghadirian P, Carpentier L, Samson J, Joncas JH. Antibody responses to two Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigens (EBNA-1 and EBNA-2) during EBV primary infection in children born to mothers infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 806-808.
180. Penn I. The changing pattern of posttransplant malignancies. *Transplant Proc* 1991; 23(1): 1101-1103.
181. Penn I. The role of immunosuppression in lymphoma formation. *Springer Semin Immunopathol* 1998; 20: 343-355.
182. Preiksaitis JK, Cockfield SM. Epstein-Barr virus and lymphoproliferative disorders after transplantation. In: *Transplant Infections*, Bowden RA, Ljungman P, Paya CV, eds, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1998: 245-263.
183. Preiksaitis JK, Diaz-Mitoma F, Mirzayans F, Roberts S, Tyrrell DLJ. Quantitative oropharyngeal Epstein-Barr virus shedding in renal and cardiac transplant recipients: relationship to immunosuppressive therapy, serologic responses, and the risk of posttransplant lymphoproliferative disorder. *J Infect Dis* 1992; 166: 986-994.
184. Purtilo DT, Cassel CK, Yang JPS, Harper R, Stephenson SR, Landing BH, Vawter GF. X-linked recessive progressive combined variable immunodeficiency (Duncan's disease). *Lancet* 1975; 1: 935-940.
185. Raab-Traub N, Flynn K. The structure of the termini of the Epstein-Barr virus as a marker of clonal cellular proliferation. *Cell* 1986; 47: 883-889.
186. Randhawa PS, Demetris AJ, Nalesnik MA. The potential role of cytokines in the pathogenesis of Epstein-Barr virus associated post-transplant lymphoproliferative disease. *Leuk Lymphoma* 1994; 15: 383-387.
187. Randhawa PS, Demetris AJ, Pietrzak B, Nalesnik M. Histopathology of renal posttransplant lymphoproliferation: comparison with rejection using the Banff schema. *Am J Kidney Dis* 1996; 28(4): 578-584.
188. Randhawa PS, Jaffe R, Demetris AJ, Nalesnik M, Starzl TE, Chen YY, Weiss LM. Expression of Epstein-Barr virus-encoded small RNA (by the EBNA-1 gene) in liver specimens from transplant recipients with post-transplantation lymphoproliferative disease. *N Engl J Med* 1992; 327(24): 1710-1714.

189. Randhawa PS, Jaffe R, Demetris AJ, Nalesnik M, Starzl TE, Chen YY, Weiss LM. The systemic distribution of Epstein-Barr virus genomes in fatal post-transplantation lymphoproliferative disorders: an *in situ* hybridization study. *Am J Pathol* 1991; 138(4): 1027-1033.
190. Randhawa PS, Magnone M, Jordan M, Shapiro R, Demetris AJ, Nalesnik M. Renal allograft involvement by Epstein-Barr virus associated post-transplant lymphoproliferative disease. *Am J Surg Pathol* 1996; 20(5): 563-571.
191. Randhawa PS, Whiteside TL, Zeevi A, Elder EM, Rao AS, Demetris AJ, Weng X, Valdivia LA, Rakela J, Nalesnik MA. Effects of immunotherapy on experimental immunodeficiency-related lymphoproliferative disease. *Transplantation* 1998; 65(2): 264-268.
192. Randhawa PS, Yousem SA, Paradis IL, Dauber JA, Griffith BP, Locker J. The clinical spectrum, pathology, and clonal analysis of Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders in heart-lung transplant recipients. *Am J Clin Pathol* 1989; 92: 177-185.
193. Raphael MM, Audouin J, Lamine M, Delecluse HJ, Vuillaume M, Lenoir GM, Gisselbrecht C, Lennert K, Diebold J. Immunophenotypic and genotypic analysis of acquired immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Clin Pathol* 1994; 101(6): 773-782.
194. Raymond E, Tricottet V, Samuel D, Reynès M, Bismuth H, Misset JL. Epstein-Barr virus-related localized hepatic lymphoproliferative disorders after liver transplantation. *Cancer* 1995; 76(8): 1344-1351.
195. Rea D, Fourcade C, Leblond V, Rowe M, Joab I, Edelman L, Bitker MO, Gandjbakhch I, Suberbielle C, Farcet JP, Raphael M. Patterns of Epstein-Barr virus latent and replicative gene expression in Epstein-Barr virus B cell lymphoproliferative disorders after organ transplantation. *Transplantation* 1994; 58(3): 317-324.
196. Renard TH, Andrews WS, Foster ME. Relationship between OKT3 administration, EBV seroconversion, and the lymphoproliferative syndrome in pediatric liver transplant recipients. *Transplant Proc* 1991; 23(1): 1473-1476.
197. Resnick L, Herbst JS, Ablashi DV, Atherton S, Frank B, Rosen L, Horwitz SN. Regression of oral hairy leukoplakia after orally administered acyclovir therapy. *JAMA* 1988; 259(3): 384-388.
198. Reyes J, Green M, Bueno J, Jabbour N, Nalesnik M, Yunis E, Kocoshis S, Kauffman M, Todo S, Starzl TE. Epstein-Barr virus associated posttransplant lymphoproliferative disease after intestinal transplantation. *Transplant Proc* 1996; 28(5): 2768-2769.

199. Reynolds DJ, Banks PM, Gulley ML. New characterization of infectious mononucleosis and a phenotypic comparison with Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 1995; 146: 379-388.
200. Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr virus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*, 3rd ed, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996: 2397-2446.
201. Rickinson AB, Lee SP, Steven NM. Cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus. *Curr Opin Immunol* 1996; 8(4): 492-497.
202. Rickinson AB, Moss DJ. Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 405-431.
203. Rickinson AB. Epstein-Barr virus in action *in vivo*. *N Engl J Med* 1998; 338(20): 1461-1463.
204. Riddler SA, Breinig MC, McKnight JLC. Increased levels of circulating Epstein-Barr virus (EBV)-infected lymphocytes and decreased EBV nuclear antigen antibody responses are associated with the development of posttransplant lymphoproliferative disease in solid-organ transplant recipients. *Blood* 1994; 84(3): 972-984.
205. Rinaldo CR. Immune suppression by herpesviruses. *Annu Rev Med* 1990; 41: 331-338.
206. Rocchi G, de Felici A, Ragona G, Heinz A. Quantitative evaluation of Epstein-Barr-virus-infected mononuclear peripheral blood leukocytes in infectious mononucleosis. *N Engl J Med* 1977; 296: 132-134.
207. Rogers BB, Conlin C, Timmons CF, Dawson DB, Krisher K, Andrews WS. Epstein-Barr virus PCR correlated with viral histology and serology in pediatric liver transplant patients. *Pediatr Pathol Lab Med* 1997; 17: 391-400.
208. Rooney CM, Heslop HE, Brenner MK. EBV specific CTL: a model for immune therapy. *Vox Sanguinis* 1998; 74(Suppl 2): 497-498.
209. Rooney CM, Loftin S, Holladay MS, Brenner MK, Krance RA, Heslop HE. Early identification of Epstein-Barr virus-associated post-transplantation lymphoproliferative disease. *Br J Haematol* 1995; 89: 98-103.
210. Rooney CM, Rowe M, Wallace LE, Rickinson AB. Epstein-Barr virus-positive Burkitt's lymphoma cells not recognized by virus-specific T-cell surveillance. *Nature* 1985; 317: 629-631.

211. Rooney CM, Smith CA, Ng CYC, Loftin S, Li C, Krance RA, Brenner MK, Heslop HE. Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation. *Lancet* 1995; 345: 9-13.
212. Rooney CM, Smith CA, Ng CY, Loftin SK, Sixbey JW, Gan Y, Srivastava DK, Bowman LC, Krance RA, Brenner MK, Heslop HE. Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood* 1998; 92(5): 1549-1555.
213. Rosdahl N, Larsen SO, Clemmesen J. Hodgkin's disease in patients with previous infectious mononucleosis: 30 years' experience. *Br Med J* 1974; 2: 253-256.
214. Rosendale B, Yousem SA. Discrimination of Epstein-Barr virus-related posttransplant lymphoproliferations from acute rejection in lung allograft recipients. *Arch Pathol Lab Med* 1995; 119: 418-423.
215. Rousset F, Garcia E, Defrance T, Péronne C, Vezzio N, Hsu DH, Kastelein R, Moore KW, Banchereau J. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 1890-1893.
216. Rowe M, Niedobitek G, Young LS. Epstein-Barr virus gene expression in post-transplant lymphoproliferative disorders. *Springer Semin Immunopathol* 1998; 20: 389-403.
217. Rowe DT, Qu L, Reyes J, Jabbour N, Yunis E, Putnam P, Todo S, Green M. Use of quantitative competitive PCR to measure Epstein-Barr virus genome load in the peripheral blood of pediatric transplant patients with lymphoproliferative disorders. *J Clin Microbiol* 1997; 35(6): 1612-1615.
218. Rowe M, Young LS, Crocker J, Stokes H, Henderson S, Rickinson AB. Epstein-Barr virus (EBV)-associated lymphoproliferative disease in the SCID mouse model: implications for the pathogenesis of EBV-positive lymphomas in man. *J Exp Med* 1991; 173: 147-158.
219. Rubin RH. Impact of cytomegalovirus infection on organ transplant recipients. *Rev Infect Dis* 1990; 12: s754-s766.
220. Rubin RH. The indirect effects of cytomegalovirus infection on the outcome of organ transplantation. *JAMA* 1989; 261(24): 3607-3609.
221. Saemundsen AK, Berkel AI, Henle W, Henle G, Anvret M, Sanal Ö, Ersoy F, Çaglar M, Klein G. Epstein-Barr-virus-carrying lymphoma in a patient with ataxia-telangiectasia. *Br Med J* 1981; 282: 425-427.

222. Sample J, Brooks L, Sample C, Young L, Rowe M, Gregory C, Rickinson A, Kieff E. Restricted Epstein-Barr virus protein expression in Burkitt lymphoma is due to a different Epstein-Barr nuclear antigen 1 transcriptional initiation site. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6343-6347.
223. Sandvej K, Krenács L, Hamilton-Dutoit SJ, Rindum JL, Pindborg JJ, Pallesen G. Epstein-Barr virus latent and replicative gene expression in oral hairy leukoplakia. *Histopathol* 1992; 20: 387-395.
224. Savoie A, Perpète C, Carpentier L, Joncas J, Alfieri C. Direct correlation between the load of Epstein-Barr virus-infected lymphocytes in the peripheral blood of pediatric transplant patients and risk of lymphoproliferative disease. *Blood* 1994; 83(9): 2715-2722.
225. Schwab M, Böswald M, Korn K, Ruder H. Epstein-Barr virus in pediatric patients after renal transplantation. *Clin Nephrol* 2000; 53(2): 132-139.
226. Shapiro RS, Chauvenet A, McGuire W, Pearson A, Craft AW, McGlave P, Filipovich A. Treatment of B-cell lymphoproliferative disorders with interferon alfa and intravenous gamma globulin. *N Engl J Med* 1988; 318(20): 1334.
227. Shapiro RS, McClain K, Frizzera G, Gajl-Peczalska KJ, Kersey JH, Blazar BR, Arthur DC, Patton DF, Greenberg JS, Burke B, Ramsay NKC, McGlave P, Filipovich AH. Epstein-Barr virus associated B cell lymphoproliferative disorders following bone marrow transplantation. *Blood* 1988; 71(5): 1234-1243.
228. Shurin SB. Infectious mononucleosis. *Pediatr Clin North Am* 1979; 26(2): 315-326.
229. Singh N, Dummer JS, Kusne S, Breinig MK, Armstrong JA, Makowka L, Starzl TE, Ho M. Infections with cytomegalovirus and other herpesviruses in 121 liver transplant recipients: transmission by donated organ and the effect of OKT3 antibodies. *J Infect Dis* 1988; 158(1): 124-131.
230. Sixbey JW, Nedrud JG, Raab-Traub N, Hanes RA, Pagano JS. Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *N Engl J Med* 1984; 310(19): 1225-1230.
231. Sixbey JW, Shirley P, Chesney PJ, Buntin DM, Resnick L. Detection of a second widespread strain of Epstein-Barr virus. *Lancet* 1989; 2: 761-765.
232. Sixbey JW, Vesterinen EH, Nedrud JG, Raab-Traub N, Walton LA, Pagano JS. Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected *in vitro*. *Nature* 1983; 306: 480-483.

233. Sokal EM, Antunes H, Beguin C, Bodeus M, Wallemacq P, de Ville de Goyet J, Reding R, Janssen M, Buts JP, Otte JB. Early signs and risk factors for the increased incidence of Epstein-Barr virus-related posttransplant lymphoproliferative diseases in pediatric liver transplant recipients treated with tacrolimus. *Transplantation* 1997; 64(10): 1438-1442.
234. Sokal EM, Caragiozoglou T, Lamy M, Reding R, Otte JB. Epstein-Barr virus serology and Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders in pediatric liver transplant recipients. *Transplantation* 1993; 56(6): 1394-1398.
235. Starzl TE, Nalesnik MA, Porter KA, Ho M, Iwatsuki S, Griffith BP, Rosenthal JT, Hakala TR, Shaw BW, Hardesty RL, Atchison RW, Jaffe R, Bahnson HT. Reversibility of lymphomas and lymphoproliferative lesions developing under cyclosporin-steroid therapy. *Lancet* 1984; 1; 583-587.
236. Steven NM, Annels NE, Kumar A, Leese AM, Kurilla MG, Rickinson AB. Immediate early and early lytic cycle proteins are frequent targets of the Epstein-Barr virus-induced cytotoxic T cell response. *J Exp Med* 1997; 185(9): 1605-1617.
237. Stevens SJC, Vervoort MBHJ, van den Brule AJC, Meenhorst PL, Meijer CJ, Middeldorp JM. Monitoring of Epstein-Barr virus DNA load in peripheral blood by quantitative competitive PCR. *J Clin Microbiol* 1999; 37(9): 2852-2857.
238. Su IJ, Chen RL, Lin DT, Lin KS, Chen CC. Epstein-Barr virus (EBV) infects T lymphocytes in childhood EBV-associated hemophagocytic syndrome in Taiwan. *Am J Pathol* 1994; 144(6): 1219-1225.
239. Su IJ, Hsieh HC, Lin KH, Uen WC, Kao CL, Chen CJ, Cheng AL, Kadin ME, Chen JY. Aggressive peripheral T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA: a clinicopathologic and molecular analysis. *Blood* 1991; 77(4): 799-808.
240. Sullivan JL, Byron KS, Brewster FE, Baker SM, Ochs HD. X-linked lymphoproliferative syndrome: natural history of the immunodeficiency. *J Clin Invest* 1983; 71: 1765-1778.
241. Sumaya CV, Ench Y. Epstein-Barr virus infectious mononucleosis in children: 1. Clinical and general laboratory findings. *Pediatrics* 1985; 75(6): 1003-1010.
242. Sumaya CV, Ench Y. Epstein-Barr virus infectious mononucleosis in children: 2. Heterophil antibody and viral-specific responses. *Pediatrics* 1985; 75(6): 1011-1019.

243. Swinnen LJ, Costanzo-Nordin MR, Fisher SG, O'Sullivan EJ, Johnson MR, Heroux AL, Dizikes GJ, Pifarre R, Fisher RI. Increased incidence of lymphoproliferative disorder after immunosuppression with the monoclonal antibody OKT3 in cardiac-transplant recipients. *N Engl J Med* 1990; 323: 1723-1728.
244. Swinnen LJ, Mullen GM, Carr TJ, Costanzo MR, Fisher RI. Aggressive treatment for postcardiac transplant lymphoproliferation. *Blood* 1995; 86(9): 3333-3340.
245. Tan LC, Gudgeon N, Annels NE, Hansasuta P, O'Callaghan CA, Rowland-Jones S, McMichael AJ, Rickinson AB, Callan MF. A re-evaluation of the frequency of CD8+ T cells specific for EBV in healthy virus carriers. *J Immunol* 1999; 162(3): 1827-1835.
246. a) Tanner J, Weis J, Fearon D, Whang Y, Kieff E. Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell* 1987; 50: 203-213.
- b) Tanner JE, Alfieri C. Epstein-Barr virus induces Fas (CD95) in T cells and Fas ligand in B cells leading to T-cell apoptosis. *Blood* 1999; 94(10): 3439-3447.
247. Taub R, Kirsch I, Morton C, Lenoir G, Swan D, Tronick S, Aaronson S, Leder P. Translocation of the *c-myc* gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 7837-7841.
248. Telenti A, Marshall WF, Smith TF. Detection of Epstein-Barr virus by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990; 28(10): 2187-2190.
249. Thomas JA, Felix DH, Wray D, Southam JC, Cubie HA, Crawford DH. Epstein-Barr virus gene expression and epithelial cell differentiation in oral hairy leukoplakia. *Am J Pathol* 1991; 139: 1369-1380.
250. Thorley-Lawson DA, Babcock GJ. A model for persistent infection with Epstein-Barr virus: the stealth virus of human B cells. *Life Sciences* 1999; 65(14): 1433-1453.
251. Thorley-Lawson DA, Miyashita EM, Khan G. Epstein-Barr virus and the B cell: that's all it takes. *Trends Microbiol* 1996; 4(5): 204-208.
252. Tokunaga M, Imai S, Uemura Y, Tokudome T, Osato T, Sato E. Epstein-Barr virus in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Am J Pathol* 1993; 143(5): 1263-1269.
253. Tosato G, Jones K, Breinig MK, McWilliams HP, McKnight JLC. Interleukin-6 production in posttransplant lymphoproliferative disease. *J Clin Invest* 1993; 91: 2806-2814.

254. Tosato G, Seamon KB, Goldman ND, Sehgal PB, May LT, Washington GC, Jones KD, Pike SE. Monocyte-derived human B-cell growth factor identified as interferon- β_2 (BSF-2, IL-6). *Science* 1988; 239: 502-504.
255. Tosato G, Teruya-Feldstein J, Setsuda J, Pike SE, Jones KD, Jaffe ES. Post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD): lymphokine production and PTLN. *Springer Semin Immunopathol* 1998; 20: 405-423.
256. Touraine JL, Bosi E, El Yafi MS, Chapuis-Cellier C, Blanc N, Dubernard JM, Piatti PM, Chevalier M, Pouteil-Noble C, Lenoir G, Trepo C, Gelet A, Creyssel R, Traeger J. The infectious lymphoproliferative syndrome in transplant patients under immunosuppressive treatment. *Transplant Proc* 1985; 17 (1): 96-98.
257. Vieira P, de Waal-Malefyt R, Dang MN, Johnson KE, Kastelein R, Fiorentino DF, deVries JE, Roncarolo MG, Mosmann TR, Moore KW. Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 1172-1176.
258. Wagner HJ, Bein G, Bitsch A, Kirchner H. Detection and quantification of latently infected B lymphocytes in Epstein-Barr virus-seropositive, healthy individuals by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30(11): 2826-2829.
259. Wakasugi H, Rimsky L, Mahe Y, Kamel AM, Fradelizi D, Tursz T, Bertoglio J. Epstein-Barr virus-containing B-cell line produces an interleukin 1 that it uses as a growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 804-808.
260. Walker RC, Marshall WF, Strickler JG, Wiesner RH, Velosa JA, Habermann TM, McGregor CGA, Paya CV. Pretransplantation assessment of the risk of lymphoproliferative disorder. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 1346-1353.
261. Walker RC, Paya CV, Marshall WF, Strickler JG, Wiesner RH, Velosa JA, Habermann TM, Daly RC, McGregor CGA. Pretransplantation seronegative Epstein-Barr virus status is the primary risk factor for posttransplantation lymphoproliferative disorder in adult heart, lung, and other solid organ transplantations. *J Heart Lung Transplant* 1995; 14: 214-221.
262. Walter EA, Bowden RA. Infection in the bone marrow transplant recipient. *Infect Dis Clin North Am* 1995; 9(4): 823-841.
263. Walz G, Zanker B, Melton LB, Suthanthiran M, Strom TB. Possible association of the immunosuppressive and B cell lymphoma-promoting properties of cyclosporine. *Transplantation* 1990; 49(1): 191-194.

264. Wang F, Gregory C, Sample C, Rowe M, Liebowitz D, Murray R, Rickinson A, Kieff E. Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear proteins 2 and 3C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP1 cooperatively induce CD23. *J Virol* 1990; 64(5): 2309-2318.
265. Weiss LM, Chen YY, Liu XF, Shibata D. Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: a correlative *in situ* hybridization and polymerase chain reaction study. *Am J Pathol* 1991; 139(6): 1259-1265.
266. Weiss LM, Jaffe ES, Liu XF, Chen YY, Shibata D, Medeiros LJ. Detection and localization of Epstein-Barr viral genomes in angioimmunoblastic lymphadenopathy and angioimmunoblastic lymphadenopathy-like lymphoma. *Blood* 1992; 79(7): 1789-1795.
267. Weiss LM, Movahed LA. *In situ* demonstration of Epstein-Barr viral genomes in viral-associated B cell lymphoproliferations. *Am J Pathol* 1989; 134(3): 651-659.
268. Weiss LM, Strickler JG, Warnke RA, Purtilo DT, Sklar J. Epstein-Barr viral DNA in tissues of Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 1987; 129(1): 86-91.
269. Wilkinson AH, Smith JL, Hunsicker LG, Tobacman J, Kapelanski DP, Johnson M, Wright FH, Behrendt DM, Corry RJ. Increased frequency of posttransplant lymphomas in patients treated with cyclosporine, azathioprine, and prednisone. *Transplantation* 1989; 47(2): 293-296.
270. Williams GT. Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell* 1991; 65: 1097-1098.
271. Witherspoon RP, Fisher LD, Schoch G, Martin P, Sullivan KM, Sanders J, Deeg HJ, Doney K, Thomas D, Storb R, Thomas ED. Secondary cancers after bone marrow transplantation for leukemia or aplastic anemia. *N Engl J Med* 1989; 321: 784-789.
272. Wright DH. What is Burkitt's lymphoma? *J Pathol* 1997; 182: 125-127.
273. Wu TC, Mann RB, Charache P, Hayward D, Staal S, Lambe BC, Ambinder RF. Detection of EBV gene expression in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Int J Cancer* 1990; 46: 801-804.
274. Wu TC, Mann RB, Epstein JI, MacMahon E, Lee WA, Charache P, Hayward SD, Kurman RJ, Hayward GS, Ambinder RF. Abundant expression of EBER1 small nuclear RNA in nasopharyngeal carcinoma. *Am J Pathol* 1991; 138(6): 1461-1469.

275. Yamamoto M, Kimura H, Hironaka T, Hirai K, Hasegawa S, Kuzushima K, Shibata M, Morishima T. Detection and quantification of virus DNA in plasma of patients with Epstein-Barr virus-associated diseases. *J Clin Microbiol* 1995; 33(7): 1765-1768.
276. Yao QY, Ogan P, Rowe M, Wood M, Rickinson AB. Epstein-Barr virus-infected B cells persist in the circulation of acyclovir-treated virus carriers. *Int J Cancer* 1989; 43: 67-71.
277. Young LS, Clark D, Sixbey JW, Rickinson AB. Epstein-Barr virus receptors on human pharyngeal epithelia. *Lancet* 1986; 1(8475): 240-242.
278. Zangwill SD, Hsu DT, Kichuk MR, Garvin JH, Stolar CJH, Haddad J, Stylianos S, Michler RE, Chadburn A, Knowles DM, Addonizio LJ. Incidence and outcome of primary Epstein-Barr virus infection and lymphoproliferative disease in pediatric heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 1998; 17: 1161-1166.

ANNEXE 1

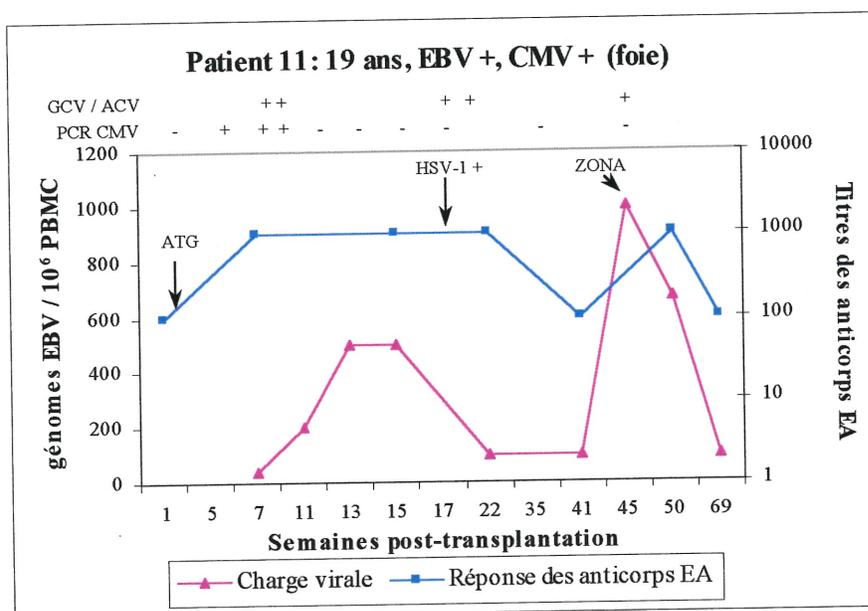
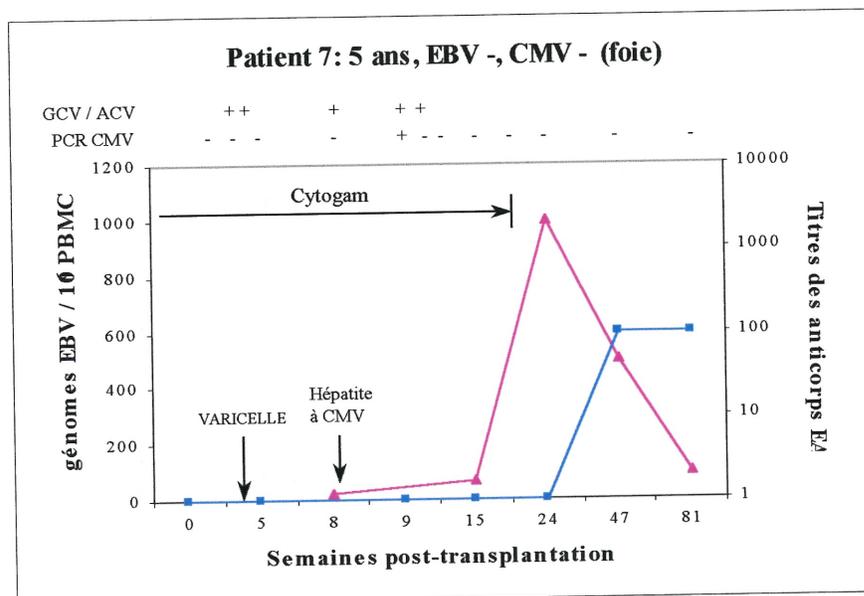
Tableau X Infection primaire avec le virus Epstein-Barr et le Cytomégalovirus (CMV) chez des patients séronégatifs suite à une transplantation d'organe solide.

Patient	Statut CMV et EBV (D / R)	Infection primaire (semaines post-transplantation)		Prophylaxie anti-CMV	Diagnostic clinique suite à l'infection par le CMV
		EBV	CMV		
2	+ / -	4 (PTLD)	4	GCV + γ -Ig	hépatite
3	+ / -	5 (PTLD)	dcd (6 sem.)	Cytogam	-
5	+ / -	10	10	GCV	-
7	+ / -	6	8	Cytogam	hépatite
9	+ / -	6	9	Cytogam	-
10	+ / -	7	4	Cytogam	-
12	+ / -	12	5	γ -Ig	duodénite
19	+ / -	6	6	Cytogam	hépatite
23	+ / -	dcd (19 sem.)	dcd (19 sem.)	Cytogam	-
24	+ / -	4 (PTLD)	> 3 ans	γ -Ig	-
25	+ / -	20	5	Cytogam	-

Abréviation : D / R : donneur / receveur, GCV : ganciclovir, γ -Ig : gammaglobulines

ANNEXE 2

Figure 5: Effet d'une infection herpétique sur l'infection EBV suite à une transplantation



Abréviations: GCV / ACV: ganciclovir / acyclovir

PBMC: cellules mononucléées du sang périphérique

ATG: globulines anti-thymocytes

REMERCIEMENTS

REMERCIEMENTS

Plusieurs personnes ont rendu la réalisation de cette étude possible en y apportant leur généreuse contribution. C'est pourquoi j'aimerais tout d'abord remercier ma directrice de maîtrise, Dr Carolina Alfieri, pour ses judicieux conseils et son aide apportée tout au long de cette étude et qui de plus, m'a permis d'étudier et de travailler sur un sujet aussi passionnant et d'actualité que le milieu de la transplantation; merci également à toute l'équipe de maladies infectieuses et tout particulièrement au Dr Bruce Tapiero et au Dr Céline Laferrière ainsi qu'aux différentes équipes de transplantation de l'hôpital Sainte-Justine dont Dr Fernando Alvarez et Mme Carole Viau (transplantation hépatique), et Dr Marie-Josée Clermont (transplantation rénale) avec lesquelles j'ai travaillé en étroite collaboration et qui m'ont initié au côté clinique de la recherche qui m'intéresse vivement; finalement un merci tout spécial à toute l'équipe du laboratoire de virologie de l'hôpital Sainte-Justine et tout particulièrement à Mme Louise Lambert avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler (et à voyager!) et qui m'a été d'une aide précieuse avec ses connaissances pratiques de la virologie et tout particulièrement avec les transplantés. Le Dr Jean H. Joncas est également une personne qui a également eu beaucoup d'influence sur le suivi en maladies infectieuses des patients transplantés dans notre institution puisqu'il a été un des premiers chercheurs à s'intéresser et à introduire la recherche sur le virus Epstein-Barr à l'hôpital Sainte-Justine. Cette étude est donc le prolongement de son œuvre à l'hôpital Sainte-Justine.

J'aimerais également remercier le fonds FCAR (Fonds pour la formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche) qui m'a permis d'obtenir une bourse pour financer mes études de maîtrise ainsi que "The Sick Children Hospital Foundation" qui subventionne actuellement cette étude sur une plus grande échelle regroupant l'hôpital de Montréal pour Enfants, l'hôpital pour Enfants Malades de Toronto et l'hôpital Sainte-Justine. Je suis également très reconnaissante à la "Pan American Society for Clinical Virology" qui m'a accordé à deux reprises une bourse de voyage pour aller présenter cette étude en Floride, ainsi qu'à l'Association des Médecins Microbiologistes et Infectiologues du Québec qui m'a, elle aussi, accordé un prix pour la meilleure présentation des étudiants de maîtrise et de doctorat.