

Université de Montréal

**Les immunoglobulines intraveineuses et la réponse
spécifique des cellules T dans la prévention de la
maladie lymphoproliférative post-greffe associée au
virus Epstein-Barr chez les enfants greffés de cellules
souches hématopoïétiques**

Par

Ramatoulaye Bah

Département de Microbiologie-Infectiologie-Immunologie, Université de Montréal

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Doctorat (Ph.D.)

en Virologie-Immunologie

Janvier, 2015

© Ramatoulaye Bah, 2015

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Les immunoglobulines intraveineuses et la réponse spécifique des cellules T dans la prévention de la maladie lymphoproliférative post-greffe associée au virus Epstein-Barr chez les enfants greffés de cellules souches hématopoïétiques

Présentée par :

Ramatoulaye Bah

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur : Dr. Ali Ahmad

Directrice de recherche : Dre. Caroline Alfieri

Membre du jury : Dre. Louise-Geneviève Labrecque

Examineur Externe : Dr. Pierre Lebel

Représentant du doyen : Dr. Azemi Barama

Résumé

La maladie lymphoproliférative post-greffe (MLP) est une complication grave chez les greffés (d'organes solides ou de cellules souches hématopoïétiques) immunosupprimés suite à l'infection par le virus Epstein-Barr (VEB). En l'absence d'une réponse efficace des lymphocytes T cytotoxiques, les cellules B infectées par le VEB peuvent proliférer et donner lieu à la MLP. Dans le cas des receveurs de greffe immunosupprimés, les cellules B infectées par le VEB de façon lytique, produisent activement de nouveaux virions. Ces derniers infectent les cellules B voisines, entraînant leur expansion polyclonale. La gp350, une protéine du cycle lytique située dans l'enveloppe virale, joue un rôle important dans l'infection par le VEB. Elle interagit avec le récepteur CD21 exprimée à la surface des cellules B pour permettre l'entrée du virus. Ainsi, des anticorps neutralisants anti-gp350 sont considérés être des acteurs clés dans le blocage de l'infection, empêchant ainsi le développement de la MLP. L'effet protecteur des immunoglobulines intraveineuses (IgIV) à titre prophylactique contre le VEB et la MLP chez les greffés de cellules souches hématopoïétiques n'est pas clairement démontré. Par conséquent, le premier objectif de cette thèse a proposé d'évaluer l'efficacité des IgIV contre l'infection par le VEB et la MLP chez les receveurs de cellules souches hématopoïétiques. Le deuxième objectif a proposé de déterminer, en utilisant la technique ELISpot, si la présence d'une réponse forte des lymphocytes T contre l'antigène précoce BMLF1 du cycle lytique du VEB pourrait constituer un marqueur de protection contre la MLP chez les greffés de cellules souches hématopoïétiques. Les résultats ont montré d'une part que, si les IgIV peuvent neutraliser efficacement l'infection par le VEB *in vitro*, ils ne protègent pas

efficacement les patients greffés contre l'infection par le VEB *in vivo*. D'autre part, l'étude de la réponse des lymphocytes T contre des antigènes du VEB a démontré que les cellules T de certains patients sont capables de reconnaître l'antigène lytique BMLF1. Cette réponse spécifique des lymphocytes T peut s'avérer un bon marqueur de la protection contre la MLP.

Les résultats de cette thèse démontrent que l'infection lytique au VEB joue un rôle fondamental dans le développement de la MLP. Les données indiquent également que la présence d'une réponse spécifique des lymphocytes T contre un antigène du cycle lytique du VEB peut constituer un bon marqueur de la protection contre la MLP. Cependant, le traitement des patients recevant des greffes de cellules souches hématopoïétiques avec les IgIV n'apparaît pas efficace dans la prévention de la MLP.

Mots-clés : virus Epstein-Barr, maladie lymphoproliférative post-greffe, sang de cordon, moelle osseuse, immunosuppression, immunoglobulines intraveineuses, cellules T.

Abstract

Post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD) is a serious complication in immunosuppressed transplant patients following infection by the Epstein-Barr virus (EBV). In the absence of an efficient cytotoxic T-lymphocyte response, EBV-infected B cells can expand in number and give rise to PTLD. In the immunosuppressed setting, EBV infected B cells are postulated to be lytically activated, such that the virions released can infect bystander B cells, resulting in polyclonal B cell expansion. Because gp350, a lytic-cycle protein located in the viral envelope, plays an important role in EBV infection, anti-gp350 neutralizing antibodies are thought to be a key player in blocking infection, hence preventing the development of PTLD. The use of intravenous immune globulin (IVIG) as a prophylactic against opportunistic infections (including EBV) for patients receiving hematopoietic stem cell transplantation calls into question the effectiveness of IVIG to inhibit or temper EBV infection in this patient group. Therefore the first objective of this thesis proposed to evaluate the efficacy of IVIG against EBV infection and PTLD in hematopoietic stem cell recipients. The second objective proposed to determine, using the ELISpot technique, whether the presence of a strong T cell response against the EBV lytic-cycle antigen BMLF1 could constitute a marker for protection against PTLD in hematopoietic stem cell transplant recipients. The results revealed firstly that, while IVIG can efficiently neutralize EBV infection *in vitro*, it does not effectively protect transplant patients against EBV infection *in vivo*. Secondly, the study of the T-cell response against EBV antigens demonstrated that T cells from certain patients are able to recognize the BMLF1 lytic-cycle antigen. This specific T-cell response may prove to be a good marker of protection against PTLD.

In summary, the results of this thesis demonstrate that EBV lytic infection plays a fundamental role in PTLD development. The data also indicate that the presence of a specific T-cell response against an EBV lytic-cycle antigen may constitute a good marker of protection against PTLD. However, IVIG treatment of patients receiving hematopoietic stem cell grafts does not appear effective in preventing PTLD.

Keywords: Epstein-Barr virus, post-transplant lymphoproliferative disease, cord-blood, bone marrow, immune suppression, intravenous immune globulin, T cells.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des figures	xii
Remerciements	xix
Avant-propos	xxii
CHAPITRE I: INTRODUCTION.....	1
1.1 Découverte du virus Epstein-Barr.....	2
1.2 Classification du virus Epstein-Barr	3
1.3 Structure du virus Epstein-Barr, son génome et ses gènes codés	5
1.3.1 Structure.....	5
1.3.2 Génome du virus Epstein-Barr et ses gènes codés	8
1.4 Modes d'infection par le virus Epstein-Barr	14
1.4.1 Cycle viral conduisant à l'infection lytique.....	16
1.4.2 Infection latente	19
1.4.3 Réactivation du virus Epstein-Barr	20
1.5 Immunité contre le virus Epstein-Barr chez l'individu immunocompétent.....	20
1.5.1 Immunité innée	20

1.5.2	Immunité adaptative.....	22
1.6	Mécanismes d'évasion à la surveillance immune par le virus Epstein-Barr.....	27
1.6.1	Inhibition de la présentation antigénique	27
1.6.2	Inhibition de l'apoptose.....	28
1.6.3	Perturbations du réseau des cytokines	29
1.6.4	Variations génétiques.....	29
1.7	Méthodes de diagnostic du virus Epstein-Barr	30
1.8	Épidémiologie de l'infection par le virus Epstein-Barr et maladies associées.....	32
1.9	Greffes de cellules souches hématopoïétiques	34
1.9.1	Définition et types de greffes	34
1.9.2	Greffe de sang de cordon versus greffe de moelle osseuse.....	34
1.9.3	Reconstitution immunitaire après greffe de sang de cordon et de moelle osseuse chez l'enfant.....	35
1.10	Les complications associées à la greffe de sang de cordon ou de moelle osseuse	40
1.10.1	Influence du régime de conditionnement.....	40
1.10.2	Rejet de greffe et échec de la greffe	40
1.10.3	Maladie du greffon contre l'hôte ou GvHD.....	41
1.10.4	Infections opportunistes	42
1.11	Maladie lymphoproliférative post-greffe associée au virus Epstein-Barr	45
1.11.1	Caractéristiques cliniques.....	45

1.11.2 Facteurs de risque	46
1.12 Traitements contre l'infection par le virus Epstein-Barr et la maladie lymphoproliférative post-greffe	47
1.12.1 Traitements administrés aux patients.....	47
1.12.2 Traitements en développement (la vaccination).....	55
1.13 Problématique, hypothèses et objectifs de l'étude	57
1.13.1 Problématique.....	57
1.13.2 Hypothèses de recherche	60
1.13.3 Objectifs de recherche	60
- Objectif 1	61
- Objectif 2	61
CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	62
2.1 Évaluer <i>in vivo</i> la capacité des IgIV à bloquer l'infection par le virus Epstein-Barr chez les enfants greffés de cellules souches hématopoïétiques.....	63
2.1.1 La cohorte de patients.....	63
2.1.2 Charge virale du virus Epstein Barr dans le sang périphérique	64
2.1.3 Reconstitution des cellules immunitaires dans le sang périphérique.....	64
2.2 Déterminer l'activité neutralisante des IgIV contre l'infection par le virus Epstein-Barr <i>in vitro</i>	65
2.2.1 Cellules	65
2.2.2 Production de virus	66

2.2.3 Tests de neutralisation.....	67
2.2.4 Test de neutralisation pour examiner la capacité des IgIV à inhiber l'expression des antigènes précoces (EA) et latents (EBNA) dans les cellules Raji et Bjab infectées par le virus Epstein-Barr respectivement	67
2.2.5 Test de neutralisation pour examiner la capacité des IgIV à inhiber la transformation des cellules mononucléaires de sang de cordon par le virus Epstein-Barr.....	69
2.2.6 Source des IgIV	70
2.2.7 Sérologie pour le virus Epstein-Barr dans les 36 préparations commerciales d'IgIV....	70
2.2.8 Les titres anti-gp350 par ELISA dans les 36 préparations commerciales d'IgIV	71
2.3 Le test ELISpot pour étudier la réponse des cellules T contre les antigènes lytique et latents du virus d'Epstein-Barr.....	72
2.3.1 Cohorte d'étude.....	73
2.3.2 Isolement des cellules mononucléaires du sang périphérique	73
2.3.3 Antigènes lytique et latent du virus Epstein-Barr.....	74
2.3.4 Test ELISpot pour la production d'IFN- γ	75
2.4 Charge virale du VEB dans le sang périphérique des patients	77
2.5 Outils d'analyses des données	77
CHAPITRE III : RÉSULTATS.....	79
3.1 Les IgIV ne protègent pas efficacement les enfants greffés de cellules souches hématopoïétiques contre l'infection par le virus Epstein-Barr	80
3.2 Les IgIV sont capables de neutraliser l'infection par le VEB <i>in vitro</i>	88

3.3 Cinétique de reconstitution du système immunitaire des patients durant les 12 mois après la greffe de cellules souches hématopoïétiques.....	95
3.4 La réponse des cellules T contre les antigènes lytique et latent du virus Epstein-Barr chez les enfants greffés de sang de cordon ou de moelle osseuse	100
3.5 Corrélation entre la charge virale et la réponse contre les antigènes lytique et latent chez les greffés de cellules souches hématopoïétiques.....	109
CHAPITRE IV : DISCUSSION.....	116
4.1 Les IgIV ne protègent pas les greffés de cellules souches hématopoïétiques contre l'infection par le virus Epstein-Barr	117
4.1.1 Les niveaux d'anticorps neutralisants dans la dose d'IgIV administrée aux patients .	118
4.1.2 Infection primaire et réactivation du virus Epstein-Barr	119
4.1.3 La sévérité de l'immunosuppression.....	121
4.2 Réponse des cellules T contre les antigènes lytique et latent chez les greffés de sang de cordon et de moelle osseuse.....	122
4.2.1 Développement d'une réponse spécifique à l'antigène lytique BMLF1 chez les greffés de moelle osseuse dont le donneur est VEB séropositif	122
4.2.2 Absence de réponse spécifique à l'antigène latent EBNA3A après greffe de sang de cordon ou de moelle osseuse.....	125
4.3 Relation entre la réactivation du virus Epstein-Barr et la réponse spécifique anti-BMLF1	126
4.3.1 La détection de la charge virale dans le sang périphérique après greffe de sang de cordon ou de moelle osseuse.....	127

4.3.2	Corrélation entre la charge virale du virus Epstein Barr et la réponse spécifique anti-BMLF1 après greffe de moelle osseuse.....	129
4.3.3	L'influence du traitement avec le rituximab et les antiviraux sur la charge virale.....	130
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	133
	Bibliographie	137
	Annexes	173

Liste des tableaux

Tableau I : Principales fonctions des douze gènes latents codés par le VEB	11
Tableau II: Principales maladies associées au VEB.....	33
Tableau III: Caractéristiques cliniques des 49 patients VEB séropositifs avant la greffe avec un donneur VEB séronégatif.	81
Tableau IV: Détermination des rapports de cotes ou ORs (odds ratios) pour l'association entre l'infection par le VEB et le traitement avec les IgIV.	84
Tableau V : Charge virale du VEB dans le sang périphérique des patients traités (18/37) et non traités (3/12) avec les IgIV.....	85
Tableau VI : Les 36 différents lots d'IgIV produits par les 3 compagnies (Talecris, Baxter et CSL Behring).....	88
Tableau VII : Les titres anti-gp350 dans 36 différents lots d'IgIV déterminés par immunofluorescence à partir des lignées CEM transfectées avec le gène viral codant la gp350.	91
Tableau VIII : Les titres anti-VCA dans 36 différents lots d'IgIV déterminés par immunofluorescence à partir de la lignée cellulaire B95-8.	91
Tableau IX : Concentrations en pg/ml d'anti-gp350 contenus dans les 36 préparations commerciales d'IgIV.	93
Tableau X: Caractéristiques cliniques de 11 patients greffés de cellules souches hématopoïétiques. SCN = sang de cordon non apparenté, MO = moelle osseuse apparentée, MON = moelle osseuse non apparentée, ATG = anti-thymocyte globulin, VP16 = étoposide, ICT = irradiation corporelle totale, MMF = mycophénolate mofétil, IgIV = immunoglobulines intraveineuses, GvHD = graft versus host disease, S.O = sans objet et p = patient.	101

Liste des figures

Figure 1.1: Classification des <i>Herpesviridae</i>	4
Figure 1.2: Structure du VEB.....	6
Figure 1.3 : Arrangement des gènes du VEB	8
Figure 1.4 : Localisation des gènes latents du VEB sur l'ADN viral double brin circulaire (ou épisode).....	10
Figure 1.5 : Expression des gènes lytiques suite à la réactivation de VEB latent.....	12
Figure 1.6 : Représentation des phases latente et lytique lors de l'infection <i>in vivo</i> par le VEB.....	15
Figure 1.7 : Infection des lymphocytes B et des cellules épithéliales par le VEB.	17
Figure 1.8 : Cinétique de la réponse humorale contre le VEB lors d'une infection primaire symptomatique	23
Figure 1.9 : Réponses des cellules T CD8 induites par le VEB durant l'infection primaire et lors de la réactivation virale chez l'individu sain immunocompétent	25
Figure 1.10 : Principales fonctions des immunoglobulines intraveineuses	52
Figure 1.11 : Modèles de modulation de l'expression des récepteurs FcγR par les IgIV chez la souris et chez l'humain	54
Figure 3.1: Effets des IgIV sur l'infection par le VEB dans une cohorte de 49 enfants greffés de sang de cordon ou de moelle osseuse.....	83
Figure 3.2: Début de détection du VEB par qPCR dans le sang périphérique des patients traités avec les IgIV ainsi que la période de diagnostic de la MLP.....	86
Figure 3.3 : Les titres anti-VEB neutralisants à 50% (TN 50%) contenus dans les préparations commerciales d'IgIV.. ..	92
Figure 3.4 : La corrélation entre les titres neutralisant à 50% l'induction des EBNA et les titres anti- gp350 (pg/ml) déterminés par ELISA est positive.....	94

Figure 3.5 : Nombre absolu de cellules NK dans le sang périphérique des enfants greffés de cellules souches hématopoïétiques.....	96
Figure 3.6 : Nombre absolu de cellules B dans le sang périphérique des enfants greffés de cellules souches hématopoïétiques.....	97
Figure 3.7: Nombre absolu de cellules T CD4 dans le sang périphérique des enfants greffés de cellules souches hématopoïétiques.....	98
Figure 3.8 : Nombre absolu de cellules T CD8 dans le sang périphérique des enfants greffés de cellules souches hématopoïétiques.....	99
Figure 3.9 : Test ELISpot sur la production d'IFN-γ par les PBMC des greffés.....	105
Figure 3.10: Étude par ELISpot de la réponse spécifique des cellules T des greffés de sang de cordon contre les peptides lytique et latent (BMLF1 et EBNA3A).	106
Figure 3.11 : Étude par ELISpot de la réponse spécifique des cellules T des greffés de moelle osseuse, contre les peptides lytique et latent (BMLF1 et EBNA3A).....	108
Figure 3.12 : Cinétique de la charge du VEB dans le sang périphérique des patients p6, p7 et p8 durant les 12 premiers mois après la greffe.	110
Figure 3.13 : Corrélation entre la charge du VEB dans le sang périphérique du patient p6 et la réponse spécifique des cellules T du sang périphérique contre le peptide lytique BMLF1.....	112
Figure 3.14 : Corrélation entre la charge du VEB dans le sang périphérique du patient p7 et la réponse spécifique des cellules T du sang périphérique contre le peptide lytique BMLF1.....	113
Figure 3.15 : Corrélation entre la charge virale du VEB dans le sang périphérique du patient p8 et la réponse spécifique des cellules T du sang périphérique contre le peptide lytique BMLF1.....	114

Listes des abréviations

ADCC	Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AIHV-1	Alcelaphine Herpesvirus-1
ARN	Acide Ribonucléique
ATG	Anti-Thymocyte Globuline
BALF2	BamHI-A Leftward reading Frame 2
BALF4	BamHI-A Leftward reading Frame 4
BALF5	BamHI-A Leftward reading Frame 5
BARF1	BamHI-A Rightward reading Frame 1
BART	BamHI-A Rightward Transcripts
BBLF1	BamHI-B Leftward reading Frame 1
BBLF4	BamHI-B Leftward reading Frame 4
BBRF3	BamHI-B Rightward reading Frame 3
BDLF2	BamHI-D Leftward reading Frame 2
BDLF3	BamHI-D Leftward reading Frame 3
BdRF1	BamHI-d Rightward reading Frame 1
BFRF3	BamHI-F Rightward reading Frame 3
BGLF1	BamHI-G Leftward reading Frame 1
BGLF2	BamHI-G Leftward reading Frame 2
BGLF4	BamHI-G Leftward reading Frame 4
BGLF5	BamHI-G Leftward reading Frame 5
BILF1	BamHI-I Leftward reading Frame 1
BILF2	BamHI-I Leftward reading Frame 2
BKRF2	BamHI-K Rightward reading Frame 2
BKRF4	BamHI-K Rightward reading Frame 4
BLLF1	BamHI-L Leftward reading Frame 1
BLRF1	BamHI-L Rightward reading Frame 1
BLRF2	BamHI-L Rightward reading Frame 2
BMLF1	BamHI-M Leftward reading Frame 1

BNLF2a	BamHI-N Leftward reading Frame 2a
BNRF1	BamHI-N Rightward reading Frame 1
BOLF1	BamHI-O Leftward reading Frame 1
BPLF1	BamHI-P Leftward reading Frame 1
BRLF1	BamHI-R Leftward reading Frame 1
BRRF2	BamHI-R Rightward reading Frame 2
BSA	Bovine Serum Albumin
BSLF1	BamHI-S Leftward reading Frame 1
BSRF1	BamHI-S Rightward reading Frame 1
BVRF1	BamHI-V Rightward reading Frame 1
BXLF2	BamHI-X Leftward reading Frame 2
BZLF1	BamHI-Z Leftward reading Frame 1
BZLF2	BamHI-Z Leftward reading Frame 2
CD	Cluster de différenciation
CDc	Cellules dendritiques conventionnelles
CDp	Cellules dendritiques plasmacytoïdes
CHOP	Cyclophosphamide Hydroxyadriamycine Oncovine Prednisone
CMV	Cytomégalovirus
CMSC	Cellules mononucléées du sang de cordon
CSF	Colony Stimulating Factor
CTL-4	Cytotoxic T-Lymphocyte antigen-4
EA	Early Antigen, antigène précoce
EBERs	Epstein-Barr virus Encoded small RNAs,
EBNALP	Epstein-Barr virus Nuclear Antigen- Leader Protein
EHV-2	Equine Herpesvirus-2
EHV-1	Elephantid Herpesvirus-1
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ELISpot	Enzyme-Linked ImmunoSpot
FBS	Fetal Bovine Serum, sérum foetal de bœuf
GaHV-1	Gallid Herpesvirus-1
GaHV-2	Gallid Herpesvirus-2
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor

Gp350	Glycoprotéine-350
GvHD	Graft versus Host Disease
HCMV	Human Cytomegalovirus
HHV-4	Human Herpesvirus-4
HHV-6	Human Herpesvirus-6
HHV-8	Human Herpesvirus-8
HLA	Human Leucocyte Antigen
HSP 70	Heat Shock Protein 70
HSP 90	Heat Shock Protein 90
HSV-1	Human Simplexvirus-1
ICT	Irradiation Corporelle Totale
IFN- α	Interféron-alpha
IFN- γ	Interféron-gamma
IgA	Immunoglobuline A
IgG	Immunoglobuline G
IgIV	Immunoglobuline Intraveineuse
IgM	Immunoglobuline M
IL-	Interleukine
IL-1ra	Recepteur antagoniste de l'IL-1
IL-10v	Interleukine-10 virale
IR	Internal Repeat
IVIG	Intravenous Immunoglobulin
kDa	kilo Dalton
KIR	Killer cell Ig-like Receptor
Kpb	kilo paire de bases
LCL	Lignée Cellulaire Lymphoblastoïde
LMP	Latent Membrane Protein
MCMV	Mouse Cytomegalovirus
MCP	Monocyte Chemoattractant Protein
MI	Mononucléose Infectieuse
MIP-1 α	Macrophage Inflammatory Protein-1alpha
MLP	Maladie Lymphoproliférative Post-greffe

NASBA	Nucleic Acid Sequence Based Amplification
NK	Natural Killer
ORF	Open Reading Frame
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PKR	Protéine Kinase R
PTLD	Post Transplant Lymphoproliferative Disease
RPM	Rotation Par Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SEM	Standard Error of the mean
SFC	Spot Forming Cells
SIDA	Syndrom d'Immunodéficience Acquis
Sp1	Specificity protein 1
TAP	Transporter associated with Antigen Processing
Th1	T helper 1 lymphocytes
Th2	T helper 2 lymphocytes
TLR	Toll Like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TR	Terminal Repeat
U1-5	Unique sequence 1-5
UL	Long Unique sequence
US	Short Unique sequence
VEB	Virus Epstein-Barr
VCA	Viral Capside Antigen
VCA-p18	Viral Capside Antigen-Protein 18 kDa
VCA-p40	Viral Capside Antigen-Protein 40 kDa
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VZV	Varicella-Zoster Virus
XLP	Maladie Lymphoproliférative liée à l'X
ZBP-89	Zinc Binding Protein-89

À mes parents, mes enfants et mon époux

« L'effort fait le fort » (inconnu)

Remerciements

J'adresse mes sincères remerciements à ma directrice de thèse Dre. Caroline Alfieri, de m'avoir accueillie dans son laboratoire. Ce fut un grand privilège pour moi de travailler avec elle durant ces cinq années de doctorat. Je lui suis entièrement reconnaissante pour sa disponibilité, son écoute et sa direction avisée.

Je remercie tous les membres actuels et passés du laboratoire. Particulièrement, Jing Hu et Dr. Tanner, avec lesquels j'ai eu à interagir dans le laboratoire concernant l'avancement de mon projet; Dre. Janie Trépanier et Valérie Leblond qui m'ont guidée durant mes débuts dans le laboratoire; Insaf Salem qui a contribué à l'isolement des leucocytes des patients pendant mon congé de maternité; Janey Fang, qui dans le cadre de son stage, a contribué au dosage des titres anti-gp350 par ELISA. Je suis très reconnaissante à Dre. Élodie Rance pour sa fidèle amitié. Je tiens à souligner qu'au delà de nos discussions scientifiques, elle est toujours présente pour me soutenir dans les moments difficiles.

Je voudrais souligner que ce travail a été réalisé en partie grâce au soutien financier de la Fondation du CHU Ste-Justine et la Fondation des Étoiles. Je remercie également le centre de recherche du CHU Ste-Justine de m'avoir fait profiter d'une des bourses de voyage pour pouvoir présenter mes travaux de recherche dans un congrès international; la FESP (Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales) de m'avoir accordé la bourse de maternité et la bourse de fin d'études doctorales. Mes remerciements s'adressent aussi aux membres de mon comité de suivi, Dr. Hugo Soudeyns et Dre. Françoise LeDeist. Leurs commentaires constructifs ont contribué à l'avancement de mon projet. Ma reconnaissance s'adresse aussi à

tous les membres du GRETISC pour leurs commentaires instructifs. Je voudrais aussi remercier particulièrement Samira Mezziani d'avoir pris le temps de fouiller tous les dossiers des patients pour me fournir les informations cliniques. Je remercie également Dre. Helen Trottier de son aide sur l'analyse statistique par régression logistique, Dr. Pierre Teira de nous avoir fourni les fioles d'IgIV et Dre Chantal Buteau pour ses pertinents commentaires sur l'infection par le VEB chez les enfants receveurs de greffes.

Je tiens à préciser que durant mes années de doctorat au centre de recherche du CHU Ste-Justine, j'ai vécu une belle expérience en milieu de recherche. J'ai côtoyé du personnel de recherche ouvert et très disponible. Je cite Dre. Natacha Merindol (ancien membre du laboratoire de Dr. Soudeyns) qui m'a beaucoup assistée pour la mise au point du protocole sur l'ELISpot et m'a guidée sur l'utilisation du lecteur de spots. Je suis entièrement reconnaissante à Martine Cathy (membre actuel du laboratoire de Dr. Soudeyns) pour sa disponibilité, toujours prête à aider et à écouter. Je la remercie pour toutes les fois où elle a fait les ficolls lorsque j'avais un empêchement. Tous mes remerciements à Dre. Doris Ransy (membre actuel du laboratoire de Dr Soudeyns) pour tout le soutien qu'elle m'a apporté, ainsi que les nombreuses discussions scientifiques constructives qu'on a eu à partager. Je voudrais aussi remercier Sandy Lalonde, Dominika Kozubska avec lesquelles j'ai eu à interagir quelques fois concernant mon dossier académique, le congrès annuel des étudiants, les conférences du vendredi matin et les demandes de bourses. Elles sont toujours disponibles et attentives.

Je remercie infiniment mes parents, mes frères (Ahmadou Dian et Aliou) et ma sœur (Binta) qui sont toujours présents pour me soutenir dans les moments difficiles. Ils m'ont toujours bien entourée et encouragée dans mes projets. Papa et maman, vous êtes les meilleurs parents au monde. Je remercie également mes beaux parents, qui m'ont soutenue et

encouragée tout au long de ma thèse. Leurs fréquents appels téléphoniques pour me remonter le moral et leur amour sans condition m'ont beaucoup réconfortée et encouragée. Je suis privilégiée d'avoir tout ce monde autour de moi.

Je remercie mon frère Rafiou et son épouse Mariam pour tout le soutien qu'ils m'ont apporté, de même que mon beau frère Sékou Baniré et son épouse Fatim.

Je ne pourrai finir sans remercier ma petite maisonnée. Il s'agit de mes enfants (Thierno Aliou et Aïssatou) et mon époux (Abdoulaye Baniré), pour leur patience et leur compréhension. Ils m'ont apporté la joie, le bonheur et la motivation durant les moments difficiles de ma thèse. Je suis chanceuse de les avoir autour de moi. Abdoulaye, je te remercie infiniment de m'avoir tenu la main tout au long de cette thèse. Tes réflexions scientifiques, ton sens d'analyse critique, tes conseils judicieux sont des valeurs que tu m'as enseignées et qui m'ont permis de m'améliorer tous les jours. Grâce à toi, je suis rendue à cette étape. Tu es le meilleur.

Je suis entièrement reconnaissante envers mes amis (es) et voisins (entre autres Fati, Diao, Alpha Oumar, Cissé, Hassan) qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de cette aventure. Je remercie tous ceux qui ont contribué de loin ou de près à l'accomplissement de cette thèse.

Avant-propos

La maladie lymphoproliférative post-greffe (MLP) est une forme de lymphome non hodgkinien qui résulte de la capacité unique du VEB à infecter et immortaliser les lymphocytes B. Son taux d'incidence est plus élevé chez l'enfant (53%) que chez l'adulte (15%). L'infection par le VEB est l'un des principaux facteurs de risque de développer la MLP. Elle survient généralement durant le jeune âge. Ainsi, les enfants sont plus à risque de faire une infection primaire au VEB et sont plus vulnérables au développement de la MLP. Dans le contexte d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques, son incidence est de 1 à 3%. La MLP constitue l'une des complications majeures chez les enfants greffés de cellules souches hématopoïétiques.

En plus du jeune âge et de l'infection par le VEB, la sévérité de l'immunosuppression due au régime de conditionnement, est un grand facteur de risque associée à la MLP. Elle inhibe la capacité du système immunitaire de l'hôte à freiner la lymphoprolifération en raison du recouvrement tardif des cellules T cytotoxiques. Ainsi, la recherche de traitements sécuritaires et efficaces contre l'infection par le VEB reste fondamentale pour la prévention du développement de la MLP chez les patients immunosupprimés.

En guise de traitement prophylactique pour prévenir les infections (incluant le VEB), les cliniciens administrent aux receveurs de greffes (d'organes solides ou de cellules souches hématopoïétiques) des immunoglobulines intraveineuses (IgIV) en combinaison avec les antiviraux. Cependant, leur efficacité dans la prévention ou le traitement de la MLP est controversée.

Dans ce projet, nous abordons deux problématiques principales. La première consiste à évaluer l'efficacité des IgIV dans la prévention de l'infection par le VEB et la MLP chez les enfants greffés de cellules souches. La deuxième vise à déterminer si la présence d'une robuste réponse spécifique contre les antigènes du VEB est un bon marqueur de protection contre la MLP chez les jeunes patients greffés de cellules souches hématopoïétiques. Ces travaux permettront aux cliniciens de cibler un traitement prophylactique plus efficace pour prévenir la MLP et d'identifier plus efficacement les patients à risque de développer la MLP. Les résultats sur l'efficacité des IgIV contre l'infection par le VEB chez les enfants greffés de cellules souches font l'objet d'un article qui sera soumis prochainement pour publication.

Cette thèse comporte quatre chapitres principaux. Le chapitre I présente l'état des connaissances sur l'infection par le VEB, la greffe de cellules souches hématopoïétiques, la maladie lymphoproliférative post-greffe associée au VEB et les traitements disponibles incluant les IgIV. Il se termine par une présentation de la problématique de l'étude ainsi que les hypothèses et les objectifs de recherche. Le chapitre II présente la méthodologie et le matériel utilisés pour atteindre ces objectifs. Le chapitre III présente les résultats obtenus au cours de cette thèse. Enfin le chapitre IV présente une discussion permettant d'interpréter les résultats en intégrant les connaissances actuelles, suivi des principales conclusions et des perspectives d'avenir.

CHAPITRE I: INTRODUCTION

1.1 Découverte du virus Epstein-Barr

En 1958, le chirurgien anglais Denis Burkitt a identifié une forme de tumeur de la mâchoire chez des enfants en Ouganda (Afrique de l'est) qu'il a nommé le lymphome de Burkitt [1]. Il a remarqué que ce lymphome est fréquent dans cette région de l'Afrique. Il relia cette fréquence aux caractéristiques géographiques et climatiques de la région [2]. Ainsi, un ou plusieurs facteurs biologiques seraient impliqués dans l'étiologie de cette tumeur. Ces facteurs seraient des agents infectieux propagés par un insecte dépendamment du climat. De nombreuses études axées sur la détection d'une présence de virus dans les biopsies de lymphomes de Burkitt furent entamées. Ce n'est qu'à la fin de 1963 que des particules virales ont été observées dans des cellules tumorales au microscope électronique [3]. Le virus a été morphologiquement reconnu comme un membre des virus herpès [4]. Son nom « Epstein-Barr » vient du fait que, les premières étapes de production des cultures continues de lymphoblastes issus des biopsies du lymphome de Burkitt, ont été produites par le Dr Anthony Epstein et son étudiante Yvonne Barr. Pour différencier ces cellules des autres en culture dans le laboratoire, elles ont été nommées EB. Ainsi, le virus produit par ces cellules a aussi été appelé virus EB (VEB) [5]. Quatre ans plus tard, l'équipe de Henle l'a identifié comme étant l'agent étiologique de la mononucléose infectieuse [6]. En 1970, il a été associé au carcinome nasopharyngé par la détection du virus dans les tissus des patients [7]. Dans les années 1980, le VEB a été associé aux lymphomes reliés à l'immunodéficience acquise (SIDA) [8] et à la maladie lymphoproliférative B post-greffe dans les conditions immunosuppressives [9, 10]. L'équipe de Su a publié en 1989 que la lymphohistiocytose hémophagocytaire est une forme létale de l'infection primaire par le VEB ou de la mononucléose infectieuse [11]. Depuis cette

publication, de nombreuses études pilotes ont permis une meilleure compréhension de la pathogenèse du VEB et des mécanismes par lesquels il persiste chez l'hôte. Cependant, plusieurs aspects concernant, entre autres, son mode d'infection et sa réactivation ne sont pas clairs. De nos jours, l'infection par le VEB ou sa réactivation constitue une préoccupation majeure chez les patients immunosupprimés receveurs de greffes d'organes ou de cellules souches hématopoïétiques.

1.2 Classification du virus Epstein-Barr

Le VEB est un membre de la famille des *Herpesviridae* qui ont été classifiés en fonction de leurs propriétés biologiques en trois sous-familles. Chaque sous-famille est classifiée en genre selon la similarité des séquences d'ADN, de leur arrangement ainsi que de l'homologie des protéines virales (Figure 1.1) [12].

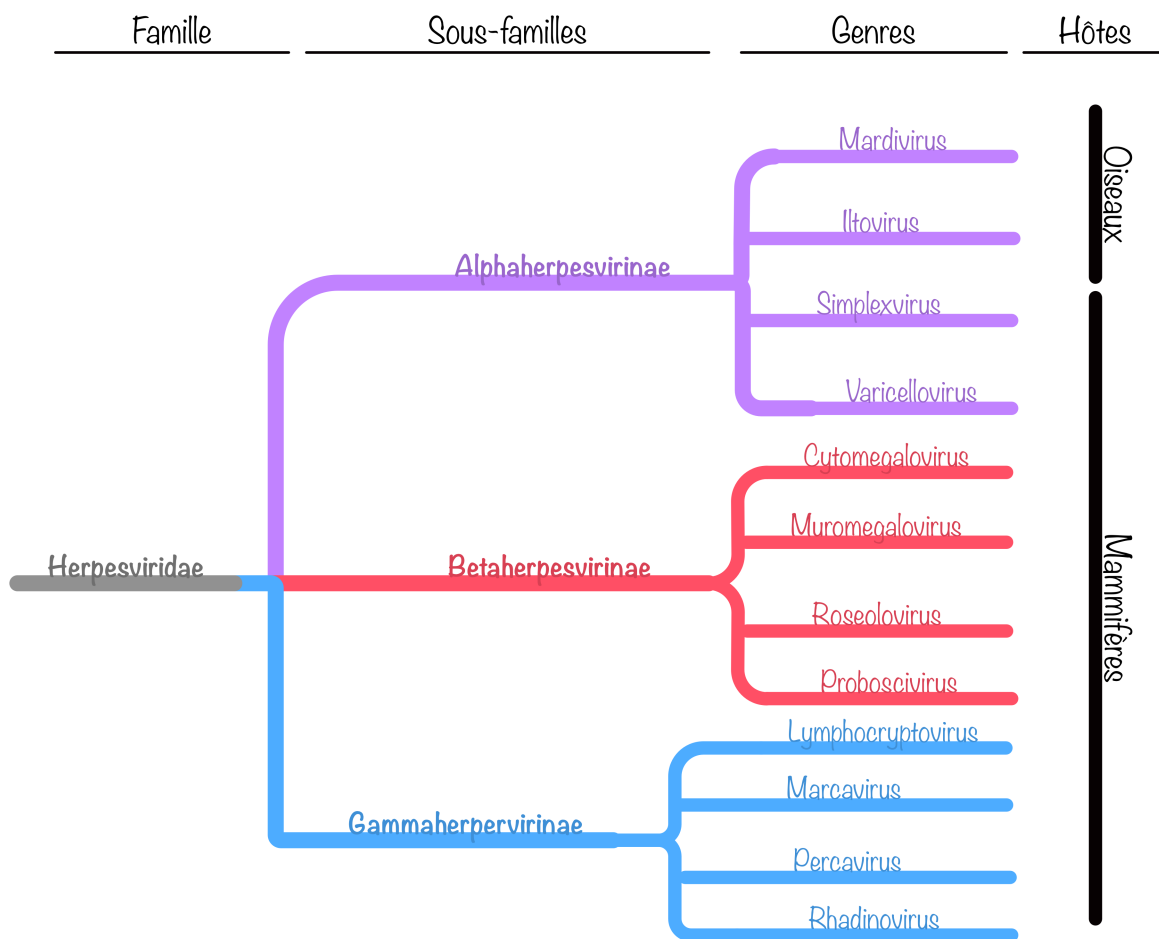


Figure 1.1: Classification des *Herpesviridae* (adapté de Pellett et Roizman. 2013) [12].

La première sous-famille nommée *Alphaherpesvirinae*, contient les genres *Simplexvirus* (HSV-1, Human Simplexvirus-1), *Varicellovirus* (VZV, Varicella-Zoster virus), *Mardivirus* (GaHV-2, Gallid Herpesvirus-2) et *Iltovirus* (GaHV-1, Gallid Herpesvirus-1). Elle se caractérise par une gamme variable d’hôtes, un cycle répliatif court, une rapide propagation en culture avec une destruction efficace des cellules infectées [12]. La sous-famille *Betaherpesvirinae*, contrairement à la précédente, a une gamme restreinte d’hôtes, un long cycle répliatif et une lente propagation en culture. Elle contient les genres

Cytomegalovirus (HCMV, Human Cytomegalovirus), *Muromegalovirus* (MCMV, Mouse Cytomegalovirus), *Roseolovirus* (HHV-6, Human Herpesvirus-6) et *Proboscivirus* (EHV-1, Elephantid Herpesvirus-1) [12]. La troisième sous-famille ou *Gammaherpesvirinae* comprend principalement 4 genres : les ***Lymphocryptovirus* (VEB)**, les *Rhadinovirus* (HHV-8, Human Herpesvirus-8), les *Macavirus* (AlHV-1, Alcelaphine Herpesvirus-1) et les *Percavirus* (EHV-2, Equine Herpesvirus-2) [12].

1.3 Structure du virus Epstein-Barr, son génome et ses gènes codés

1.3.1 Structure

Le VEB se caractérise par son tropisme lymphocytaire et sa capacité à induire une prolifération de ses cellules hôtes chez lesquelles il a établi une infection latente. Il porte aussi le nom de virus herpès humain de type 4 (HHV-4, Human Herpesvirus-4). Le VEB est formé d'une nucléocapside avec 162 capsomères, d'une enveloppe externe riche en glycoprotéines formant des pointes externes et d'un tégument localisé entre la nucléocapside et l'enveloppe externe (Figure 1.2) [13].

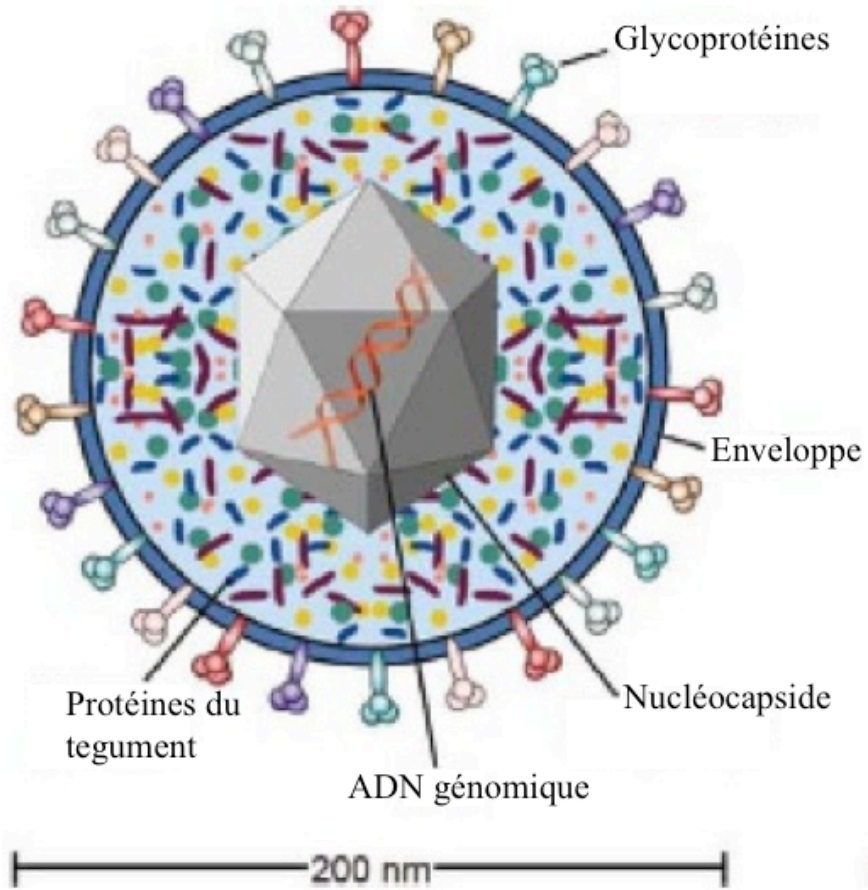
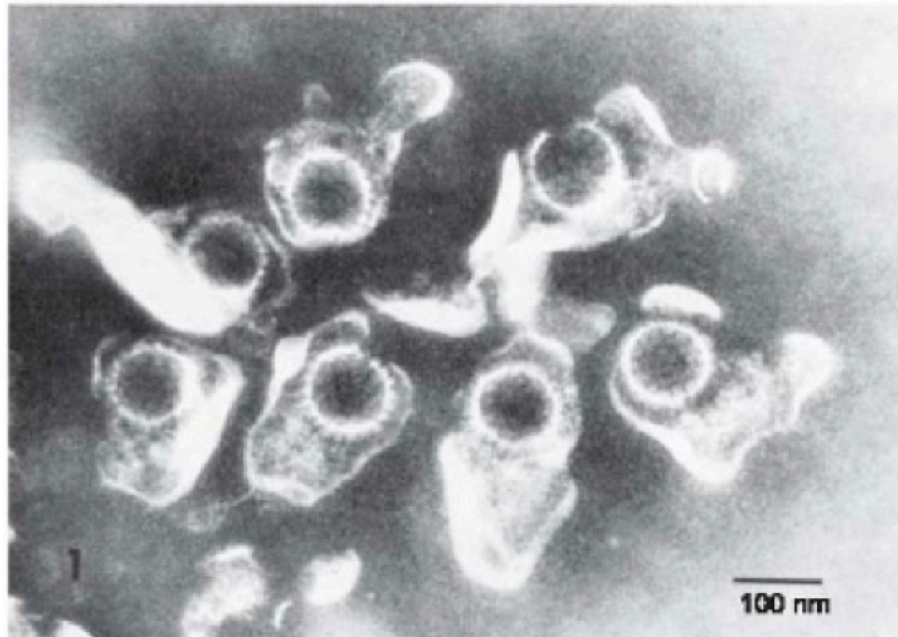


Figure 1.2: Structure du VEB (adapté de Longnecker et al. 2013) [13].

1.3.1.1 La nucléocapside

La nucléocapside comprend la protéine majeure de la capside de 155 kDa, la protéine mineure de la capside de 30 kDa, la petite protéine de la capside de 18 kDa, la protéine de liaison de la protéine mineure de 40 kDa et la protéine *portail* (ou entrée) de 68 kDa [13].

1.3.1.2 Le tégment

Le tégment est formé des composantes communes aux tégments des *Herpesviridae* et des composantes spécifiques aux tégments de la sous-famille des *Gammaherpesvirinae* [13].

Parmi les composantes communes, on note:

- la grande protéine du tégment de 350 kDa (BPLF1)
- la protéine liant la grande protéine de 140 kDa (BOLF1)
- la protéine myristoylée de 15 kDa (BBLF1)
- la protéine liant la protéine myristoylée de 32 kDa (BGLF2)
- la protéine associée à la capside de 58 kDa (BVRF1)
- la protéine d'emballage de 58 kDa (BGLF1)
- la protéine palmitoylée de 27 kDa (BSRF1)
- la kinase de 47 kDa (BGLF4)

Les composantes spécifiques sont constituées de cinq protéines distinctes [13]. Ce sont :

- la protéine majeure du tégment, BNRF1 de 140 kDa
- la protéine BLRF2 de 19 kDa
- la protéine BRRF2 de 72 kDa
- la protéine BDLF2 de 54 kDa

- la protéine BKRF4 de 42 kDa

En plus des composantes communes et spécifiques, les protéines cellulaires telles que l'actine, la β -tubuline et les protéines de choc thermique (Hsp 70 et Hsp 90) font partie des composantes du tégument du VEB [14]. Ceci est probablement attribué au processus d'enveloppement cytoplasmique [13].

1.3.1.3 L'enveloppe externe

L'enveloppe externe est majoritairement formée des glycoprotéines [13, 14] suivantes :

- la glycoprotéine majeure de l'enveloppe ou gp350 (BLLF1)
- les glycoprotéines gH (BXLF2), gB-N, gB-C et gB (BALF4)
- les glycoprotéines gp42 (BZLF2), gM (BBRF3), gp78 (BILF2)
- les glycoprotéines gN (BLRF1), gp150 (BDLF3) et gL (BKRF2)

1.3.2 Génome du virus Epstein-Barr et ses gènes codés

Le VEB est un virus à ADN double brin linéaire de 184 kpb (kilo paire de bases) [15].

L'arrangement de ses gènes est présenté ci-dessous (Figure 1.3).

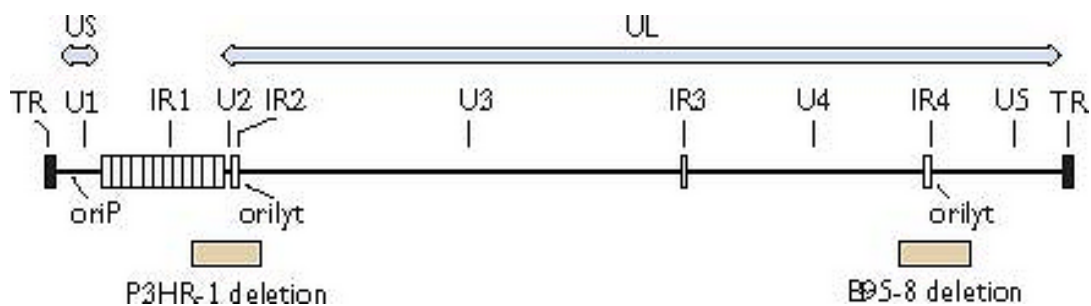


Figure 1.3 : Arrangement des gènes du VEB [13].

Les deux extrémités de l'ADN linéaire sont formées par un nombre variable de répétitions directes disposées en tandem. Ces répétitions se nomment « répétitions terminales » ou « TRs » (Terminal Repeats) avec une taille de 0.5 kpb [16]. Elles constituent les points de jonction circulaire de l'ADN viral. Plusieurs répétitions directes internes ou IR1 (internal repeats) de 3 kpb disposées en tandem, divisent le génome en deux domaines de séquences uniques. Il s'agit du domaine US (Short Unique sequence) de 1.5 kpb et du domaine UL (Long Unique sequence) de 150 kpb. Ces derniers contiennent presque la totalité de la capacité codante du génome [17]. Les répétitions directes IR2, IR3, IR4 définissent les domaines des séquences uniques U2, U3, U4 et U5 [18]. Le génome comprend plus de cent cadres de lecture ou ORFs (Open Reading Frames) et environ 60% des gènes ont déjà été caractérisés. Ils sont nommés selon leur position sur la carte de restriction par rapport à l'endonucléase BamHI [19] et sont repartis en gènes latents et lytiques. Les gènes latents sont les gènes exprimés durant l'infection non productive et leurs ORFs sur le génome viral, en forme d'épisome, sont illustrés sur la Figure 1.4.

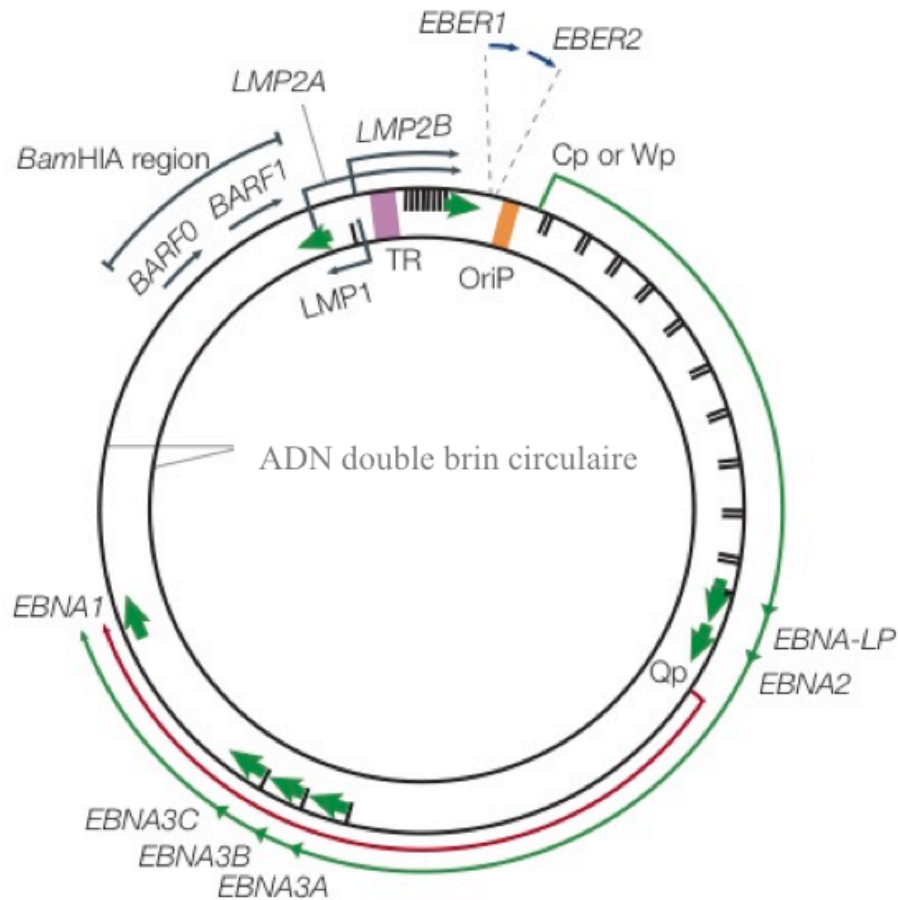


Figure 1.4 : Localisation des gènes latents du VEB sur l'ADN viral double brin circulaire (ou épisome) (adapté de Young et Rickinson. 2004) [20]. La partie orange représente l'origine de réplication (OriP). Les grandes flèches vertes représentent les exons codant chacune des protéines latentes. Les petites flèches vertes indiquent la direction dans laquelle les gènes codant ces protéines sont transcrits [20].

1.3.2.1 Gènes latents

Les gènes latents sont les plus impliqués dans les lymphomes associés au VEB. Au total, 12 gènes latents sont caractérisés. Selon leur modèle d'expression, ils sont associés à trois

principaux programmes de latence qui sont : les latences I, II et III. L'expression unique des *EBERs*, d'*EBNA-1* et des *BARTs* qualifie la *latence I*. À ceux-ci s'ajoutent les *LMP-1*, *-2a* et *-2b* ainsi que *BARF-1* dans la *latence II*. La *latence III* quant à elle, se démarque par l'expression de douze gènes latents. En plus des sept gènes mentionnés précédemment, on note les *EBNA-2*, *-3A*, *-3B*, *-3C* et *-LP* [19, 21]. Pour la transcription de l'ensemble de ces gènes, cinq promoteurs distincts sont impliqués. Il s'agit des promoteurs Wp, Cp, Qp, Fp et Ap, tous situés au niveau du fragment de restriction BamHI. Le Tableau I ci-après résume la fonction de chacun des gènes latents.

Tableau I : Principales fonctions des douze gènes latents codés par le VEB (adapté de Resk et Weiss. 2007 et de Longnecker et al. 2013) [13, 21].

Gènes latents	Définition	Principales fonctions connues ou prédites
EBER1 et 2	<i>Epstein-Barr virus Encoded RNAs</i>	Inhibent l'apoptose et la protéine kinase PKR.
EBNA1	<i>Epstein-Barr virus Nuclear Antigen 1</i>	Maintient l'épisode viral durant la division cellulaire; régule la transcription de certaines protéines latentes nucléaires et membranaires. Il est aussi impliqué dans l'évasion immunitaire.
EBNA2	<i>Epstein-Barr virus Nuclear Antigen 2</i>	Régulateur majeur de la transcription des gènes viraux (LMP1, 2A et 2B) et cellulaire (CD23, CD21, c - fgr et c - myc). Elle est essentielle à la transformation des cellules B.
EBNA3A	<i>Epstein-Barr virus Nuclear Antigen 3A</i>	Régule l'expression de certains gènes cellulaires.
EBNA3B	<i>Epstein-Barr virus Nuclear Antigen 3B</i>	Augmente l'expression de CD40 <i>in vitro</i> et n'est pas nécessaire pour la transformation des cellules B.
EBNA3C	<i>Epstein-Barr virus Nuclear Antigen 3C</i>	Régule l'expression de certains gènes cellulaires et augmente l'expression de LMP1.
EBNALP	<i>Epstein-Barr virus Nuclear Antigen</i>	Régule les effets d'EBNA2.

	<i>Leader Protein</i>	
LMP1	<i>Latent Membrane Protein 1</i>	Principal oncogène, mime les voies de signalisation induites par CD40; inhibe l'apoptose et régule à la hausse l'expression de bcl-2.
LMP2A	<i>Latent Membrane Protein 2A</i>	Mime le récepteur des cellules B (BCR) de façon constitutive.
LMP2B	<i>Latent Membrane Protein 2B</i>	Régulateur des fonctions de LMP1 et LMP2A.
BARTs	<i>BamHI-A Rightward Transcripts</i>	Micro ARNs, impliqués dans le contrôle de la transcription et le maintien de la latence.

1.3.2.2. Gènes lytiques

Contrairement aux gènes latents, les gènes lytiques sont exprimés durant l'infection répliquative. Ils sont répartis en gènes pré-précoces ou IE (Immediate Early), précoces ou E (Early) et tardifs ou L (Late), comme illustré par la figure 1.5 ci-après.

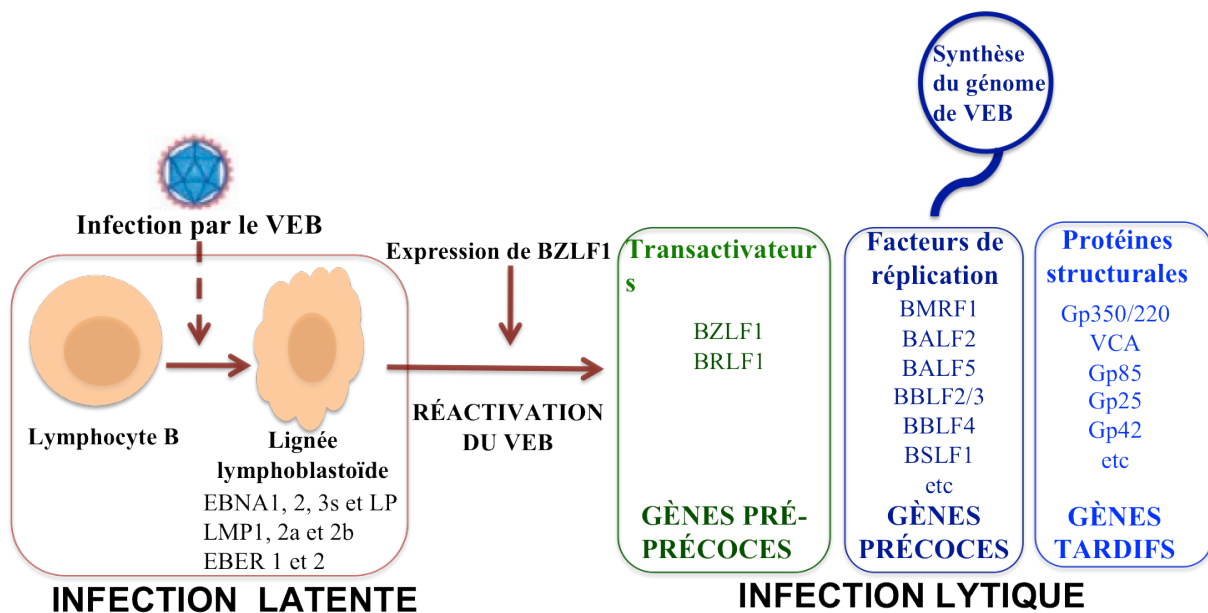


Figure 1.5 : Expression des gènes lytiques suite à la réactivation de VEB latent (adapté de

Tsurumi et al. 2005) [22].

a) Gènes pré-précoces

Ils sont essentiels pour former la transition entre les cycles latent et lytique. Le gène le plus étudié est le BZLF1 (ou Zebra), le trans-activateur de l'expression des gènes précoces. La protéine Zebra comprend un domaine trans-activateur, un domaine basique qui a des homologies au niveau des régions conservées avec les facteurs de transcription c-jun/c-fos [23] et un domaine qui lui permet d'interagir avec la protéine p53 [24]. Son expression peut interférer avec la signalisation de l'IFN- γ en diminuant l'expression du récepteur de celui-ci et en prévenant la phosphorylation de STAT1 induite par l'IFN- γ . Ce qui entraîne la suppression de la régulation à la hausse du CMH de classe II induite par l'IFN- γ , contribuant ainsi à l'évasion immune [25].

b) Gènes précoces

Ils sont brièvement exprimés dans les tumeurs associées au VEB et ne contribuent pas à son processus oncogénique à l'exception du gène BHRF1. Ce dernier est abondamment transcrit à partir de son promoteur BamHI-H (Hp) durant l'infection lytique [13]. La protéine peut aussi être détectée et se rapporte à 17 kDa [26]. Dans les lignées infectées de façon latente, les transcrits de BHRF1 incluent les séquences leaders trouvées dans les promoteurs Cp/Wp des transcrits EBNA [27]. La protéine BHRF1 est indétectable dans la plupart de ces cellules [28]. Elle présente des homologies structurales et fonctionnelles avec la protéine anti-apoptotique Bcl-2 de la cellule hôte [29]. BHRF1 est fortement conservée parmi les gammaherpèsvirus. Cela suggère qu'elle pourrait jouer un important rôle *in vivo* durant l'évolution de cette famille de virus [30, 31]. L'implication de BHRF1 dans l'inhibition de l'apoptose conduit à penser qu'elle contribuerait à prévenir la lyse des cellules lytiquement infectées par les lymphocytes

T cytotoxiques, prolongeant ainsi la durée de la production des virus. Une dérégulation de l'expression de BHRF1 dans les tumeurs associées au VEB, contribue à une meilleure survie des cellules tumorales [32]. Les enzymes comprises dans les gènes lytiques précoces sont des cibles potentielles pour les drogues antivirales pouvant être appliquées dans le futur au traitement de certaines tumeurs [33-35].

c) Gènes tardifs

Les gènes tardifs codent pour les protéines structurales virales. Parmi elles, plusieurs protéines sont fortement immunogéniques et constituent des cibles sérologiques pour le diagnostic. Tous les individus infectés par le VEB développent des anticorps contre ces protéines. Ces protéines sont : la petite protéine de la capsid VCA-p18 codée par le gène BFRF3; la protéine d'échafaudage VCA-p40 codée par le BDRF1 et la protéine de la membrane nucléaire gp125 codée par BALF4 [36, 37]. Le gène BLLF1 code aussi pour la protéine majeure de l'enveloppe virale gp350/220 [38]. Cette protéine lie le virus au récepteur cellulaire CD21 et constitue la principale cible des anticorps neutralisants [39]. Ces facteurs font de la gp350/220 une protéine d'intérêt capital dans la recherche d'un traitement contre l'infection par le VEB.

Par ailleurs, les gènes tardifs comptent aussi le gène BCRF1 codant l'IL (Interleukine) -10v (virale) qui présente des homologies structurale et fonctionnelle avec l'IL-10 humaine [40-42]. Cette dernière joue un rôle fondamental dans l'altération des réponses des cellules immunitaires [43-46].

1.4 Modes d'infection par le virus Epstein-Barr

L'infection primaire par le VEB se produit à travers la salive dans l'oropharynx où le virus infecte les cellules épithéliales et les lymphocytes B [47]. Le VEB possède deux modes

d'infection qui sont : l'infection lytique et latente (Figure 1.6). L'infection lytique se caractérise par une répllication active du virus dans les cellules permissives (cellules épithéliales et plasmocytes), avec une production de nouveaux virus infectieux et une lyse des cellules [47, 48]. Au contraire, l'infection latente est non-cytolytique et se produit uniquement dans les lymphocytes B matures, dans lesquels le VEB persiste à vie [49].

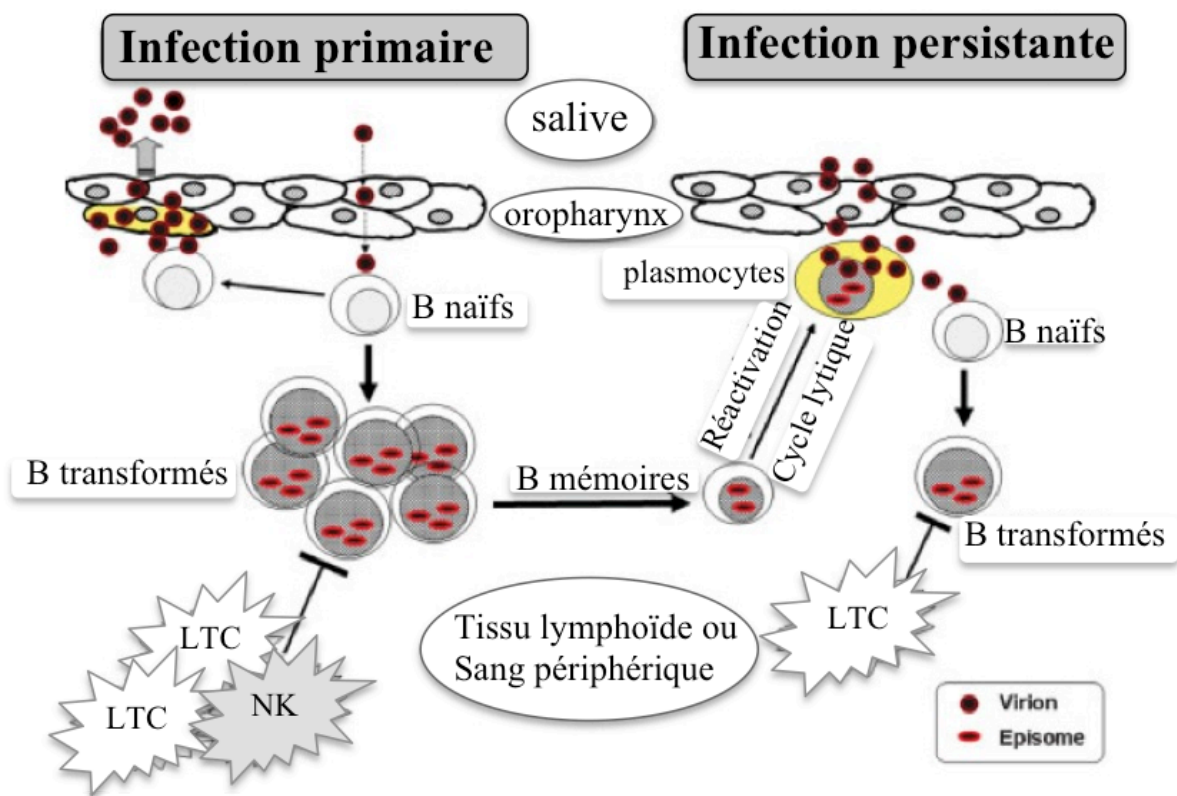


Figure 1.6 : Représentation des phases latente et lytique lors de l'infection *in vivo* par le VEB (adapté de Kimura et al. 2008) [47]. Dans l'infection primaire, le VEB infecte les lymphocytes B naïfs dans l'oropharynx à travers la salive d'un individu infecté. Ceci résulte en la transformation de ces cellules (suivant l'expression des gènes latents du VEB décrits précédemment). Mais leur prolifération est contrôlée par les

réponses immunitaires qui sont décrites dans la section suivante. Dans l'infection persistante ou infection latente, l'ADN viral se circularise dans les lymphocytes B mémoires. Et, dans les conditions physiologiques favorisant la différenciation des cellules B mémoires en plasmocytes, il y a réactivation du VEB dans ces dernières et la production de nouveaux virions [47].

1.4.1 Cycle viral conduisant à l'infection lytique

L'infection commence par l'entrée du VEB dans les cellules cibles (lymphocyte B ou cellule épithéliale). Lors d'une infection impliquant les lymphocytes B, la glycoprotéine de l'enveloppe du VEB (gp350) se lie au récepteur cellulaire CD21 exprimé à leur surface. Ensuite, le complexe glycoprotéique (gp) viral (gp25/gp85/gp42) interagit avec les molécules du CMH de classe II (HLA-DR, HLA-DP ou HLA-DQ) sur la surface des cellules B [50, 51], comme représenté par la Figure 1.7 ci-dessous.

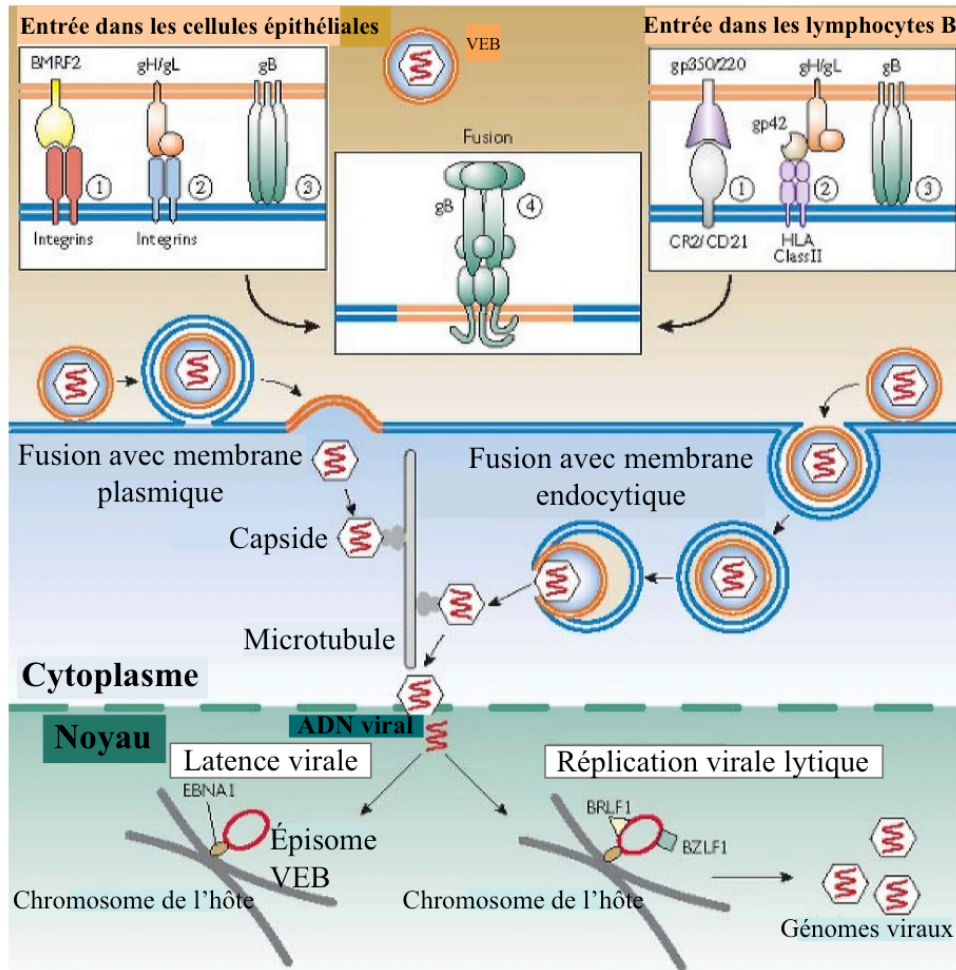


Figure 1.7 : Infection des lymphocytes B et des cellules épithéliales par le VEB (adapté de Longnecker et al. 2013) [13].

Le mécanisme d'entrée du virus dans les cellules épithéliales est moins bien connu et serait d'une grande complexité. Cependant, plusieurs équipes ont démontré qu'en l'absence du récepteur CD21, les deux glycoprotéines virales (gp85 et gp25) forment un complexe qui sert de ligand aux cellules épithéliales [50, 52]. La gp42 n'est pas nécessaire à la liaison du virus aux cellules épithéliales [53]. De plus elle inhibe la liaison du complexe gp85/gp25 aux cellules épithéliales [52]. Par ailleurs, il a été démontré que les cellules épithéliales peuvent

être infectées par le VEB à travers leur membrane basolatérale impliquant l'interaction entre les intégrines (beta1, alpha5 et alpha3) et la protéine de fusion virale BMRF2 [54, 55].

Suite à l'entrée du virus dans le cytoplasme de la cellule, de nombreux événements se produisent, conduisant à l'arrivée du génome viral dans le noyau cellulaire où il se réplique de manière lytique (production de nouveaux virions infectieux). L'ensemble de ces événements est très peu connu. Il renferme pour la plupart des spéculations basées sur des démonstrations déjà obtenues chez d'autres virus herpès de la même famille. Ainsi, deux glycoprotéines (gN et gM) de l'enveloppe virale semblent être impliquées dans l'assemblage du virus et l'acquisition de l'enveloppe virale [56, 57]. La glycoprotéine gN est une petite protéine membranaire de type I. La glycoprotéine gM est une protéine membranaire avec une longue queue cytoplasmique fortement riche en prolines et possède des sites potentiels de phosphorylation permettant de réguler les interactions protéines-protéines. Ces deux glycoprotéines sont co-dépendantes pour leur expression [56, 57].

Par ailleurs, la réplication lytique (ou infection productive) de l'ADN viral se déroule sur des sites discrets (compartiments de réplication) dans le noyau de la cellule hôte. Elle est activée par l'expression des gènes pré-précoces dont les trans-activateurs BZLF1 et BRLF1 qui activent les promoteurs des gènes viraux. Ceci conduit à l'expression des gènes précoces (facteurs de réplication) suivie de la réplication du génome viral et de l'expression des gènes tardifs [22]. Parmi les facteurs de réplication, six gènes viraux sont nécessaires. Il s'agit de la sous unité catalytique de la polymérase virale (BALF5), la sous unité accessoire de la polymérase virale (BMRF1), la protéine de liaison à l'ADN viral simple brin (BALF2), la primase (BSLF1), l'hélicase (BBLF4) ainsi que la protéine associée à l'hélicase et à la primase (BBLF2/3) [58, 59]. La réplication débute par la formation d'un complexe d'initiation au site

oriLyt (origine de réplication). Ceci consiste en la liaison de la protéine BZLF1 et des deux facteurs de transcription (ZBP-89 et Sp1) au niveau de l'origine de réplication, oriLyt [60]. Le BZLF1 interagit ensuite avec les complexes BBLF4/BSLF1/BBLF2 (complexes hélicases et primases) permettant ainsi leur recrutement au site oriLyt pour former le complexe de pré-amorçage [61]. Les protéines BALF5 et BMRF1 forment ensemble un hétérodimère qui fonctionne comme une holoenzyme et interagit avec BZLF1 [60, 62]. La protéine BALF2 à son tour, interagit avec le complexe de pré-amorçage BZLF1- BBLF4/BSLF1/BBLF2 [61]. Il en résulte l'ouverture de l'ADN linéaire double brin et la synthèse des amorces d'ARN. L'interaction entre l'holoenzyme et les complexes BBLF4/BSLF1/BBLF2 permet d'amener la polymérase virale dans le complexe de pré-amorçage pour initier la synthèse d'ADN viral [63].

1.4.2 Infection latente

Le VEB entre en latence dans les lymphocytes B mémoires où il persiste durant toute la vie. Durant cette infection latente, le virus a la capacité de transformer la cellule hôte selon les conditions physiologiques et immunologiques à travers l'expression des différents gènes latents mentionnés précédemment (section 1.3.2.1). De plus, à travers l'infection latente, le virus développe des mécanismes (qui seront discutés plus tard) pour échapper aux cellules immunitaires. Le génome viral se circularise et se localise dans le nucléosome avec les histones [64]. Il se réplique une seule fois durant la phase-S de la division cellulaire [65] et est réparti fidèlement dans les cellules filles durant la mitose [66]. Pour maintenir l'ADN viral, deux éléments du virus (OriP et EBNA-1) sont nécessaires [67, 68].

1.4.3 Réactivation du virus Epstein-Barr

Des études *in vitro* ont démontré que c'est le transactivateur BZLF1 qui commande la transition du cycle latent au cycle lytique [69]. Dans des conditions immunologiques particulières impliquant la différenciation des plasmocytes, leur facteur de différenciation XBP-1s active l'expression de BZLF1. En effet, XBP-1s est capable de transactiver le promoteur de BZLF1 dans des lignées cellulaires de plasmocytes et autres lignées cellulaires lymphoïdes [70]. Par ailleurs, il a aussi été démontré que les cellules T CD4 expriment, en plus des cytokines Th2, le ligand de CD40 (gp39). Ainsi, à travers l'interaction entre le CD40 et son ligand gp39, les cellules T CD4 sont capables d'activer les cellules B et d'induire l'expression de BZLF1 (transactivateur du cycle lytique de VEB) [71].

1.5 Immunité contre le virus Epstein-Barr chez l'individu immunocompétent

L'infection primaire par le VEB, lorsqu'elle survient dans l'enfance, est généralement peu symptomatique. Lorsqu'elle se produit à l'adolescence ou à l'âge adulte, elle se caractérise par des symptômes cliniques (environ 77% des cas) qui traduisent une forte réponse inflammatoire connue sous le nom de 'Mononucléose Infectieuse' (MI) [72]. Cette réponse inflammatoire est régie par l'interaction entre l'immunité innée et adaptative.

1.5.1 Immunité innée

Lors d'une première infection par le VEB, l'immunité innée constitue la première ligne de défense où les cellules dendritiques, les monocytes et les cellules tueuses naturelles ou NK (Natural Killer) jouent un rôle fondamental.

1.5.1.1 Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont reconnues comme d'excellentes cellules présentatrices d'antigènes grâce à leur grande capacité de détecter les pathogènes via leurs récepteurs de type Toll ou TLRs (Toll like receptors). Il s'agit des cellules dendritiques conventionnelles (CDc), des cellules dendritiques plasmacytoïdes (CDp) et des cellules dendritiques inflammatoires. Les CDc via leur TLR-3 sont activées par les EBERs conduisant ainsi à leur maturation et à l'augmentation de leur pouvoir de présentation antigénique [73].

Les CDp expriment les TLR-7 et TLR-9 à travers lesquels elles captent les antigènes viraux conduisant ainsi à leur activation et à la production d'interféron de type I [74], de cytokines et de chimiokines. Lorsque les CDp sont cultivées en présence du VEB, elles détectent les motifs CPG non méthylés de l'ADN viral ainsi que les ARN viraux simples brins via leur TLR-9 et TLR-7 respectivement, et produisent l'interféron (IFN)- α , l'IL-6 et l'IL-8 [75-77].

Les cellules dendritiques inflammatoires sont activées à travers leur TLR-2 et -3 [73, 77]. Elles sont capables d'initier la réponse spécifique des cellules T contre le VEB en présentant de façon croisée les fragments des cellules B infectées [78, 79].

1.5.1.2 Monocytes

Les monocytes sont activés d'une part par l'ADN du VEB à travers leur TLR-9 et induisent la production d'IL-8 [77]. Et d'autre part, ils reconnaissent les glycoprotéines du VEB via leur TLR-2, entraînant la production de cytokines inflammatoires dont l'IL-8, l'IL-10 et la MCP (Monocyte Chemotactic Protein)-1 [77, 80].

1.5.1.3 Cellules NK

Les cellules NK jouent un rôle important contre l'infection par le VEB durant les réponses immunes innées. Ceci a été démontré, d'une part, par l'augmentation de leur nombre ainsi que leur fréquence dans le sang périphérique des patients diagnostiqués de MI, [72, 81] et d'autre part, par l'altération de leur activité cytotoxique chez les patients atteints de la maladie lymphoproliférative liée à l'X (XLP) [82, 83]. Cette dernière a été associée à l'incapacité de ces patients à contrôler l'infection par le VEB, conduisant à des complications pouvant entraîner la mort [82, 84]. Les cellules NK sont capables d'éliminer les cellules B infectées par le VEB et d'augmenter la réponse spécifique des cellules T contre le VEB. Elles éliminent plus efficacement les cellules B infectées de façon lytique que celles infectées de manière latente [85]. Ce qui s'explique par la sous régulation des HLA de classe I et par l'augmentation de l'expression des ligands activateurs du récepteur NKG2D [85]. Ce récepteur est impliqué dans l'induction de l'activité cytotoxique des cellules NK [86].

1.5.2 Immunité adaptative

L'immunité adaptative comprend principalement les réponses humorales des lymphocytes B, le réseau des cytokines et les réponses des cellules T spécifiques au VEB. Ces dernières permettent de contrôler plus efficacement la prolifération des cellules B infectées et transformées par le virus.

1.5.2.1 Cellules B

Les cellules B sont responsables de l'immunité humorale qui consiste en la production d'anticorps ou immunoglobulines (Ig) contre les protéines virales. Lors d'une infection primaire par le VEB, la première réponse humorale spécifique est de type IgM contre les

antigènes de la capsid virale (VCA). L'apparition de signes cliniques concorde avec la production d'anticorps hétérophiles IgM contre les globules rouges d'autres espèces de mammifères (telles les bovins, chevaux, etc). Ceux-ci sont suivis par l'apparition des anticorps IgG dirigés contre le VCA et les antigènes précoces (EA) [87]. Cependant, la réponse humorale aux antigènes nucléaires (EBNA) apparaît plus tardivement, lors du début de la phase de convalescence [87, 88]. Les anticorps IgG dirigés contre la gp350 se développent eux aussi plus tardivement après l'infection [89]. Les anticorps anti-EA et les IgM anti-VCA déclinent assez rapidement et deviennent faiblement ou non détectables au bout de 3 à 4 mois après l'infection. Cependant les IgG anti-VCA, anti-gp350 et anti-EBNA persistent à vie [89]. La cinétique de production des anticorps suivant l'infection primaire par le VEB est représentée par la Figure 1.8 ci-après.

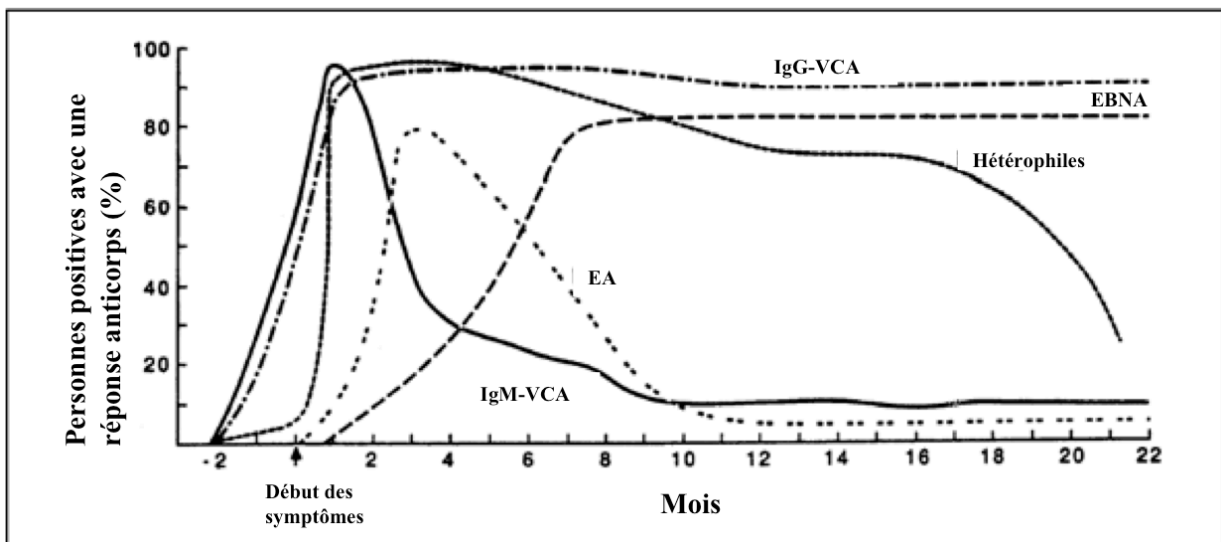


Figure 1.8 : Cinétique de la réponse humorale contre le VEB lors d'une infection primaire symptomatique (adapté de Desai et Rodrigues. 2013) [88].

1.5.2.2 Cellules T CD8

L'infection aiguë par le VEB est associée à une importante lymphocytose qui reflète l'expansion des cellules T CD8 activées. Celles-ci se caractérisent par l'expression du HLA-DR (récepteur à la surface cellulaire des molécules HLA de classe II), de CD38 (une glycoprotéine exprimée à la surface des cellules et impliquée dans l'adhésion cellulaire, la transduction du signal ainsi que dans la signalisation du calcium), de CD45RO (protéine transmembranaire, essentielle régulatrice de la signalisation du récepteur de l'antigène des cellules T et B) et l'absence d'expression de CD62L (molécule d'adhésion de la famille des sélectines, exprimée principalement à la surface des cellules T naïves) [90]. Les lymphocytes T CD8 des patients diagnostiqués avec MI ont, *in vitro*, une grande réactivité spécifique contre les antigènes lytiques, notamment les protéines pré-précoces (BZLF1 et BRLF1), précoces (BMLF1, BMRf1 et BALF2) et tardive (gp350). Ce qui suggère qu'*in vivo*, les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques aux antigènes lytiques jouent un rôle fondamental dans le contrôle de la réplication virale et que ces antigènes constituent des cibles immunodominantes [91, 92]. Ces cellules T cytotoxiques spécifiques aux antigènes lytiques représentent plus de 44% de l'ensemble des cellules T CD8 du sang périphérique. Après rémission de la MI, cette proportion lymphocytaire diminue fortement [90]. Chez le porteur sain du VEB, le pourcentage de lymphocytes T spécifiques au virus dans le sang périphérique est d'environ 1% [93, 94] avec un phénotype de cellules inactives (HLA-DR⁻, CD38⁻, CD62L⁺) ayant une faible expression de CD45RO versus une augmentation de l'isoforme CD45RA [90]. Des études résumées par Vietsika et Callan (2004) permettent de spéculer que ce changement d'expression de CD45RO pour CD45RA permet à ces cellules de se rendre aux organes lymphoïdes où les antigènes d'intérêt sont susceptibles d'être exprimés [89]. Ainsi, après la

phase aiguë de l'infection, une petite proportion de cellules T CD8 spécifiques aux antigènes du VEB est conservée chez l'individu afin d'assurer sa protection à long terme contre l'infection persistante. Ci-dessous, le résumé de la réponse anti-VEB conduite par les cellules T CD8 est représenté sur la Figure 1.9.

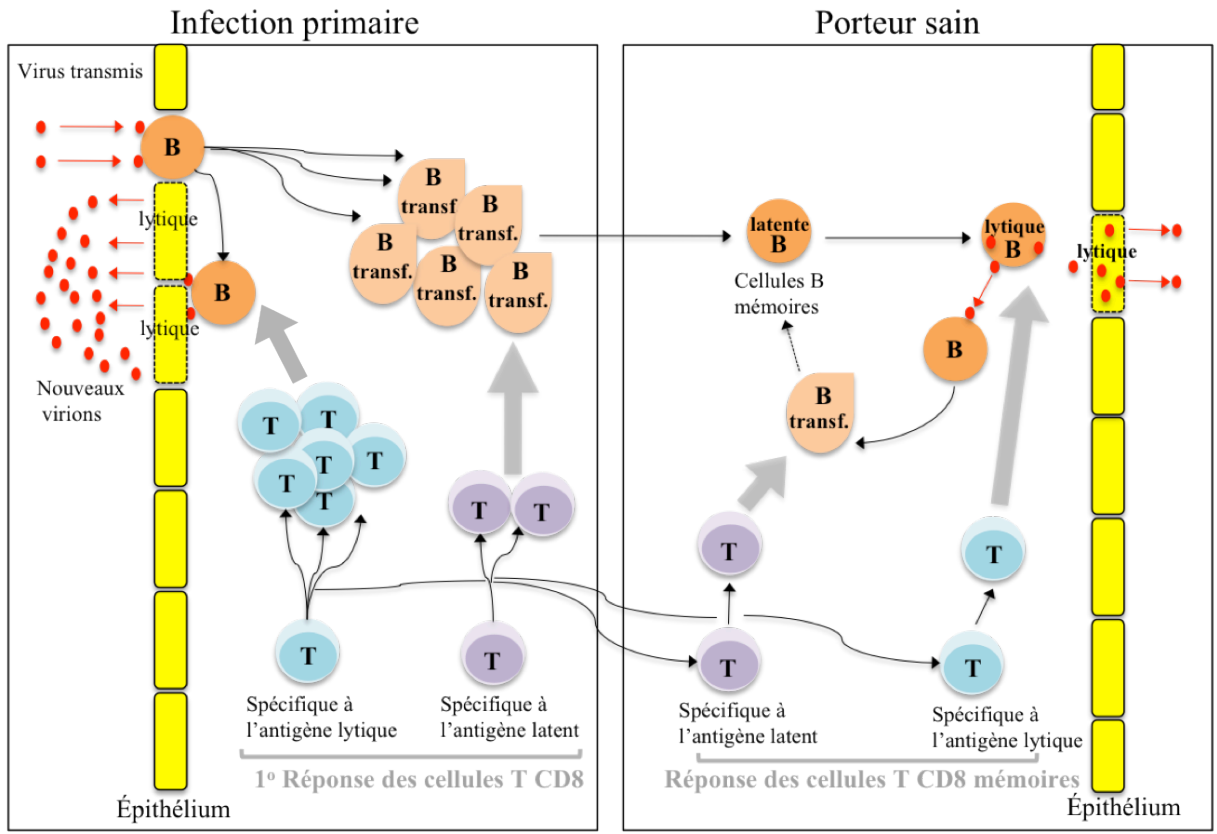


Figure 1.9 : Réponses des cellules T CD8 induites par le VEB durant l'infection primaire et lors de la réactivation virale chez l'individu sain immunocompétent (adapté de Hislop et al. 2007) [95]. Les flèches rouges indiquent la transmission du virus; les flèches noires montrent le mouvement des cellules et les larges flèches ombragées indiquent la fonction des cellules T effectrices [95].

1.5.2.3 Cellules T CD4

Il a aussi été démontré que les cellules T CD4 spécifiques au VEB jouent un rôle dans l'infection primaire et le maintien des cellules T CD8 mémoires [96]. Contrairement aux cellules T CD8, le compartiment des cellules T CD4 augmente faiblement durant la MI et plusieurs d'entre elles présentent un phénotype activé. Des études menées sur la réponse primaire des cellules T CD4 contre le VEB chez les patients symptomatiques ont démontré qu'une proportion de ces cellules est capable de répondre aux antigènes du VEB en produisant de l'IFN- γ [97]. Parmi les cellules T CD4 circulant durant la MI, 1.4% sont capables de reconnaître les antigènes du VEB avec un maximum de 5.2% chez certains individus [89]. La plupart des individus ont montré une réactivité des cellules T CD4 contre les antigènes BZLF-1, BMLF-1 et EBNA-1 [98]. Lorsque les lymphocytes T CD4 provenant d'individus séropositifs pour les antigènes EBNA-1 et -3C sont stimulés *in vitro* avec ces mêmes antigènes, ils prolifèrent de façon importante. Mais, le profil des cytokines produites en réponse à la stimulation par EBNA-1 est différent de celui induit par EBNA3C. En effet, les cellules T CD4 spécifiques à EBNA-1 produisent préférentiellement des cytokines Th2 contrairement aux cellules spécifiques à EBNA-3C qui induisent des cytokines Th1 [99].

1.5.2.4 Cytokines

Le réseau des cytokines joue aussi un rôle crucial dans la réponse inflammatoire contre le VEB. Les marqueurs d'activation des cellules T dont le récepteur soluble de l'IL-2 (sIL-2R) et des monocytes (la néoptérine) ainsi que l'IL-1 α et l'IFN- α ont montré des niveaux élevés durant la MI aiguë dans le sérum des patients [100]. Le profil des cytokines dépend principalement de l'expansion des cellules T CD8 activées bien que d'autres cellules, telles

que les cellules T CD4, les cellules NK, les monocytes, les neutrophiles, les cellules épithéliales et les lymphocytes B infectés par le VEB, produisent aussi des cytokines. Notamment, le TNF- α et le G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor) sont aussi exprimés dans les cellules B infectées par le VEB et sont régulés par la protéine EBNA-2 [101]. Par ailleurs, l'IFN- α est sécrété par les cellules NK et les cellules B dans les 24 heures suivant l'infection. L'IFN- γ est exclusivement sécrété à partir des cellules T en présence d'IL-1 et d'IL-2 au maximum 8 jours après l'infection [102]. Le VEB est aussi capable d'induire la production d'IL-8 ainsi que la protéine-1 α inflammatoire des macrophages (ou MIP-1 α , Macrophage Inflammatory Protein-1 α). La production de ces cytokines (chimioattractantes) favorise l'habilité du VEB à infecter les cellules B en augmentant leur recrutement au site de l'infection [103].

1.6 Mécanismes d'évasion de la surveillance immune par le virus

Epstein-Barr

Le VEB est capable d'induire des perturbations immunes pour échapper au système de défense de l'hôte. Ces perturbations peuvent être au niveau de la présentation antigénique, de l'apoptose, du réseau des cytokines et des variations génétiques.

1.6.1 Inhibition de la présentation antigénique

De nombreuses protéines du VEB sont connues pour avoir le potentiel de perturber la présentation des antigènes aux lymphocytes T cytotoxiques. Par exemple la protéine BZLF2 lie la chaîne bêta du HLA de classe II et bloque la présentation des épitopes restreints à ce HLA aux cellules T CD4 [104]. Le gène lytique *BILF1* qui code pour une glycoprotéine ayant

des propriétés de signalisation d'un récepteur couplé à la protéine-G, est capable de réduire les niveaux du HLA de classe I à la surface cellulaire et d'inhiber la reconnaissance des antigènes endogènes par les cellules T CD8 [105]. Après l'activation du cycle lytique, la protéine virale codée par le gène *BNLF2a* est capable d'inhiber la molécule TAP (Transporter associated with Antigen processing) qui est impliquée dans le chargement peptidique des molécules du HLA de classe I. Ceci a pour conséquence de réduire la présentation des antigènes viraux [106]. La protéine du cycle lytique BGLF5 (une DNase virale) bloque la synthèse de nouvelles molécules du HLA de classe I [106]. Le VEB est aussi capable d'altérer l'expression du TLR-9 qui joue un rôle fondamental dans l'activation du système immunitaire inné. Il s'agit d'une part de la surexpression de la protéine LMP-1 dans les cellules B qui régule à la baisse l'expression de TLR-9 [107]. Et, d'autre part, de la DNase virale BGLF5 qui diminue les niveaux d'expression de TLR9 en dégradant son ARN [108]. Par ailleurs, la protéine EBNA1 contient un domaine à répétition de Glycine-Alanine ou GAR (Glycine-Alanine repeat) qui empêche la présentation de ses épitopes restreints au HLA de classe I [109, 110].

1.6.2 Inhibition de l'apoptose

Le VEB code pour deux protéines capables d'inhiber l'apoptose [32]. Il s'agit de la protéine LMP-1 et de celle codée par le gène *BHRF-1*. Cette dernière possède une homologie fonctionnelle avec la protéine anti-apoptotique Bcl-2. De ce fait, elle protège les cellules infectées par le virus (cellules B et épithéliales) de l'apoptose [111]. Quant à la protéine LMP-1, son expression dans les cellules B induit l'expression des antigènes d'activation à la surface cellulaire (CD23 et CD40 par exemple) ainsi que les molécules d'adhésion [32]. Elle protège

aussi les cellules de l'apoptose via l'induction des protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 [112].

1.6.3 Perturbations du réseau des cytokines

Les altérations du réseau des cytokines impliquent les protéines BARF1 et la protéine BCRF1 encore appelée l'IL-10 virale (IL-10v). Cette dernière est homologue à l'IL-10 humaine et agit directement sur les cellules T pour inhiber les signaux de co-stimulation impliquant les récepteurs CD28 et CTL-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4) [40]. Quant aux protéines BARF1, elles fonctionnent comme un récepteur soluble pour le CSF (Colony Stimulating Factor)-1 [113]. Par conséquent en liant le CSF-1, elles inhibent l'action de cette cytokine qui consiste à augmenter l'expression de l'IFN- α dans les monocytes, contribuant ainsi à l'évasion immunitaire [114].

1.6.4 Variations génétiques

Les variations génétiques du VEB lui permettent d'échapper à la réponse immunitaire des cellules T cytotoxiques. Ainsi, les souches virales isolées en Papouasie-Nouvelle-Guinée où le HLA-A11 est fortement exprimé, ont montré une mutation dans l'épitope de l'antigène EBNA4 (EBNA3B) qui est restreint au HLA-A11. Par conséquent, la reconnaissance de cet épitope par les cellules T est compromise. Ces observations sont confirmées dans le sud de la Chine où le HLA-A11 est aussi exprimé chez plus de 50% des individus [115]. Par ailleurs, une délétion (d'environ 30 bp) à l'extrémité 3' du gène *LMP1* a aussi été rapportée bien que son potentiel dans les tumeurs associées au VEB soit controversé [116].

En effet, ces variations génétiques sont reliées aux régions géographiques. Par exemple, l'analyse moléculaire de l'évolution des séquences nucléotidiques virales a révélé que les souches isolées en Papouasie-Nouvelle-Guinée ont évolué différemment de celles de l'Afrique, d'Asie du sud-est et des caucasiens d'Australie [117]. Deux principales souches du VEB sont identifiées. Il s'agit du type 1 (ou type A) et du type 2 (ou type B). Ces deux types diffèrent largement dans les gènes codant les antigènes nucléaires dont les EBNA-LP, -2, -3A, -3B et -3C [118].

1.7 Méthodes de diagnostic du virus Epstein-Barr

Le diagnostic de l'infection par le VEB se fait à partir des tests immunologiques (agglutination et sérologique) ou moléculaires. Le test d'agglutination encore appelé MNI test ou Paul-Bunnell test, est le test classique de détection des anticorps hétérophiles durant la MI [119]. Il consiste à mettre en évidence les anticorps IgM capables d'agglutiner les hématies hétérologues. Les anticorps hétérophiles sont des anticorps pouvant agglutiner les globules rouges d'autres espèces animales (le cheval et le mouton par exemple) [87].

Parmi les tests sérologiques, nous pouvons citer le test ELISA (Enzyme Linked Immunoassay) et l'immunofluorescence qui consistent à détecter la présence d'anticorps spécifiques contre les protéines virales (VCA, EBNA par exemple) dans le sérum des patients. Ces anticorps incluent les IgM et les IgG. Les IgM sont produites tôt après l'infection et disparaissent avec le temps. Par contre les IgG restent dans la circulation pour la vie [89, 120]. Sachant que les anticorps anti-EBNA se développent plus tardivement que ceux anti-VCA suite à une infection primaire, la détection unique d'anticorps anti-VCA sans la présence d'anti-EBNA indique une primo-infection récente. Quand aux tests moléculaires, il s'agit de

l'évaluation de l'ADN du VEB à l'aide de techniques biomoléculaires dont la PCR (Polymerase Chain Reaction) quantitative ou la PCR en temps réel, le NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) et le Southern blot [121]. Ces tests sont surtout réalisés chez les patients immunosupprimés receveurs de greffes, chez lesquels l'augmentation de l'ADN viral témoigne d'une intense réplication du VEB ou d'une prolifération des cellules transformées par le VEB. Ils permettent de détecter l'ADN viral dans le sang périphérique total, dans le plasma ou sérum et dans les cellules mononucléées du sang périphérique [87].

La PCR en temps réel est la principale technique utilisée pour quantifier la charge virale du VEB. Elle est basée sur le principe de détecter et de quantifier une séquence conservée de l'ADN viral (EBNA1, LMP2, BZLF1 ou BALF5 par exemple) d'environ 100 bp via un émetteur fluorescent durant le processus d'amplification. Cet émetteur peut être un agent qui se lie à l'ADN double brin (SYBRGreen) ou une sonde fluorescente (Taqman). Ainsi, l'augmentation du signal fluorescent est proportionnelle à la quantité d'amplicons produits pendant la réaction [122]. La quantification du génome viral peut être exprimée en copies par ml, en copies par microgramme d'ADN, en copies par 100 000 cellules ou en copies par cellule positive [87].

Le NASBA est une technique isotherme qui consiste en l'amplification de l'ARN par l'action simultanée de 3 enzymes (la transcriptase inverse, la RNase H et la T7 ARN polymérase). Les amplicons qui en résultent sont des ARN simples brins et peuvent être détectés par le bromure d'éthidium après migration sur gel d'agarose [123].

La technique de Southern-blot quant à elle, repose sur le fait que l'ADN est digéré par des enzymes de restrictions (BamHI par exemple). Les fragments qui en résultent sont soumis

à une électrophorèse sur gel d'agarose et sont ensuite transférés sur une membrane de nitrocellulose pour être détectés par les sondes correspondantes. Les sondes consistent en un fragment d'ADN marqué avec un composé radioactif ou fluorescent qui permet ainsi de localiser la séquence d'ADN d'intérêt [124].

En plus de ces trois techniques moléculaires, il est important de mentionner que l'hybridation *in situ* des EBERs est fortement utilisée pour confirmer la présence du VEB dans les biopsies de tumeurs (MLP ou carcinome nasopharyngé par exemple). Le principe consiste à hybrider une sonde marquée par un isotope radioactif ou par un fluorochrome avec la biopsie préalablement fixée. La détection peut se faire par autoradiographie (sonde marquée par un isotope radioactif) ou par le microscope à fluorescence (sonde marquée par un fluorochrome) [122].

1.8 Épidémiologie de l'infection par le virus Epstein-Barr et maladies associées

Le VEB est un virus ubiquitaire et infecte environ 90-95% de la population mondiale. Dans les pays en voie de développement, l'infection survient plus fréquemment dans l'enfance et s'avère peu symptomatique (plus de 90% des enfants en âge préscolaire sont déjà infectés). Dans les pays développés, la moitié des individus sont infectés durant l'adolescence ou la vie adulte (aux Etats-Unis environ 95% des adultes s'avèrent infectés à l'âge de 35-40 ans) [118]. Parmi les deux types de VEB, le type 1 est le plus prévalent, mais dans certaines régions géographiques (Afrique équatoriale, Papouasie-Nouvelle-Guinée et Alaska) le type 2 est plus prédominant [118]. Les deux types de VEB ont tous les deux été détectés chez les patients immunosupprimés atteints de VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine). Cependant, la

fréquence du type 2 dans les cas de VIH est identique à celle observée chez les individus sains. Ce qui veut dire que la forte détection du génotype de type 2 chez les patients avec le VIH ne peut s'expliquer par le syndrome d'immunodéficience [125]. Par ailleurs, de nombreuses variations dans le gène LMP1 ont été identifiées, et certaines parmi elles sont associées à l'augmentation du risque de carcinome nasopharyngé [126]. Ce dernier a une forte incidence dans la région sud-est de l'Asie contrairement aux régions d'Australie, de Papouasie-Nouvelle-Guinée et d'Afrique, où son incidence est relativement faible [127]. L'infection par le VEB est associée à différentes maladies qui sont résumées dans le Tableau II ci-dessous selon le type de cellules infectées [20, 128].

Tableau II: Principales maladies associées au VEB

Cellules infectées par le VEB	Maladies associées au VEB
Lymphocytes B	<ul style="list-style-type: none"> • Mononucléose infectieuse • Infection VEB chronique active • Maladie lymphoproliférative liée à l'X • Maladie de Hodgkin • Lymphome de Burkitt • Maladie lymphoproliférative
Autres types cellulaires (épithéliales, NK, lymphocytes T)	<ul style="list-style-type: none"> • Carcinome nasopharyngien • Carcinome gastrique • Lymphomes des cellules T/NK • Leucoplasie blanche chevelue

1.9 Greffes de cellules souches hématopoïétiques

1.9.1 Définition et types de greffes

La greffe de cellules souches est couramment utilisée en hémato-oncologie pour traiter des pathologies hématologiques et certains cancers. Elle consiste à remplacer les cellules défectueuses par de nouvelles cellules normales et fonctionnelles ou à restaurer le système immunitaire suite à une chimiothérapie. Selon l'origine des cellules souches à greffer, nous distinguons trois principaux types de greffe: la greffe de **moelle osseuse**, la greffe de **sang périphérique** et la greffe de **sang de cordon**. Le donneur de ces cellules souches peut être : **1)** un proche de la famille du receveur (*greffe allogénique apparentée*) ou un individu quelconque (*greffe allogénique non apparentée*) ; **2)** un jumeau identique du receveur (*greffe syngénique*) ou **3)** le receveur lui-même (*greffe autologue*). Dans le cadre de cette thèse, je vais parler principalement des greffes de sang de cordon et de moelle osseuse chez l'enfant.

1.9.2 Greffe de sang de cordon versus greffe de moelle osseuse

Depuis la réalisation avec succès de la première greffe de sang de cordon en 1989 [129], le sang de cordon s'est avéré être une bonne alternative comme source de cellules souches. Contrairement à la moelle osseuse, il est rapidement disponible grâce à un large nombre de donneurs et sans risque pour le donneur. Le sang de cordon a une grande tolérance immune qui lui permet une plus grande liberté de disparité des HLA lors de la greffe, contrairement à la moelle osseuse. Il est riche en cellules NK matures munies d'une meilleure activité lytique que celles issues de la moelle osseuse [130]. De plus, la greffe de sang de cordon présente moins de risques de transmission virale allant du donneur au receveur et moins de GvHD par

rapport à la greffe de moelle osseuse [131]. Cependant, le sang de cordon présente un plus haut risque de transmission des maladies génétiques et contient peu de cellules nucléées. De plus, la prise de greffe est plus lente après greffe de sang de cordon par rapport à la greffe de moelle osseuse [132].

1.9.3 Reconstitution immunitaire après greffe de sang de cordon et de moelle osseuse chez l'enfant

La reconstitution immunitaire après greffe de sang de cordon et de moelle osseuse chez l'enfant dépend de différents facteurs dont l'origine des cellules souches, la quantité de cellules infusées dans la greffe, l'âge du receveur, la maladie sous-jacente du receveur et le régime de conditionnement. Cependant, le recouvrement du système immunitaire après greffe de sang de cordon présente des similarités avec la greffe de moelle osseuse, avec quelques différences au niveau du recouvrement des cellules T. L'un des points communs aux deux types de greffe, consiste au fait que le recouvrement des cellules du système immunitaire inné se fait plus rapidement que l'immunité adaptative.

1.9.3.1 Reconstitution du système immunitaire inné après greffe de sang de cordon ou de moelle osseuse chez l'enfant

L'immunité innée représente la première barrière de défense contre les pathogènes intra- et extra-cellulaires auxquels les receveurs de greffe sont très vulnérables. Son recouvrement est complété en quelques semaines après la greffe. Parmi ses composantes, les neutrophiles et les plaquettes sont recouverts plus rapidement (en quelques jours après la greffe) et permettent d'évaluer la prise de greffe.

1.9.3.1.1 Neutrophiles et plaquettes

Leur période de recouvrement est plus longue après une greffe de sang de cordon (temps médian d'environ 27 jours). Cela s'explique surtout par le fait que durant la greffe de sang de cordon, il y a peu de cellules nucléées qui sont infusées [133]. La sévérité du régime de conditionnement peut aussi influencer le temps de recouvrement des neutrophiles et des plaquettes. Dans les conditions d'un conditionnement moins intensif que le régime myéloablatif, la période neutropénique est moins longue [134]. Par ailleurs, il est possible de réduire le temps de recouvrement des neutrophiles en utilisant du G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) après greffe de sang de cordon ou de moelle osseuse [135]. Mais plusieurs études ont démontré que ce dernier altère la fonction des cellules T en induisant les réponses Th2 [135-137], mettant ainsi en doute son utilisation chez les patients greffés de cellules souches.

1.9.3.1.2 Cellules NK

Les cellules NK jouent un rôle majeur dans la défense anti-virale et dans l'effet greffe versus leucémie (ou GvL, Graft versus Leukemia) [138, 139]. Leur recouvrement se fait rapidement et atteint des niveaux normaux dans les 2 premiers mois après la greffe de sang de cordon ou de moelle osseuse [140-142]. Les cellules NK représentent plus de 80% des lymphocytes du sang périphérique durant les 3 premiers mois après la greffe. Ce recouvrement rapide des cellules NK se caractérise par une prédominance transitoire des lymphocytes CD56^{bright} (précurseurs de NK CD56^{dim}) lesquelles expriment préférentiellement le récepteur inhibiteur, NKG2A qu'elles perdent graduellement au cours de leur différenciation pour acquérir les récepteurs CD57 et KIR (Killer cell Ig-like Receptor). Les cellules fonctionnelles NK CD56^{dim}

KIR émergentes expriment les perforines et granzymes ainsi que Fas/Fas ligand, lesquelles sont indispensables pour leur activité cytotoxique [143, 144].

1.9.3.1.3 Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques myéloïdes dans le sang sont recouvrées à 3 mois post-greffe. Cependant, le compte des cellules dendritiques plasmacytoïdes est faible jusqu'à 1 an post-greffe [145, 146]. Quant aux cellules dendritiques folliculaires, qui sont importantes pour supporter la commutation de classe et la mutation somatique des immunoglobulines, elles restent remarquablement diminuées à 1 an post-greffe. Ceci peut contribuer à la régénération lente des centres germinaux et des cellules B mémoires [147].

1.9.3.1.4 Monocytes/Macrophages

Le recouvrement des monocytes après une greffe allogénique est rapide et se produit en 1 mois approximativement [148]. Par contre, des équipes ont rapporté une diminution du chimiotaxisme des macrophages pulmonaires pendant 1 an après une greffe de moelle osseuse [149-152].

1.9.3.2 Reconstitution du système immunitaire adaptatif après greffe de sang de cordon ou de moelle osseuse chez l'enfant

Le recouvrement de l'immunité adaptative est plus lent et diffère selon la source des cellules souches greffées. Les principales cellules impliquées sont les lymphocytes T et B.

1.9.3.2.1 Lymphocytes T

Dans le contexte d'une greffe de sang de cordon chez l'enfant, la reconstitution lymphoïde est fortement influencée par le nombre de cellules CD45 (antigène commun des lymphocytes)

contenues dans l'unité de sang de cordon [153]. Les cellules T de sang de cordon sont des cellules naïves avec un répertoire très diversifié [154, 155]. La plupart des cellules T infusées avec la greffe sont des cellules émigrant récemment du thymus (CD45RA+/CD62L+) avec peu de cellules T qui ont été au préalable en contact avec un antigène [130]. Chez l'hôte immunosupprimé, la majorité de ces cellules qui émergent durant les 3 premiers mois après une greffe de sang de cordon non apparenté constitue une expansion périphérique des lymphocytes T dérivés de la greffe. L'expansion homéostatique chez le receveur lymphopénique génère un répertoire restreint de cellules T avec une distribution asymétrique du TCR. Les niveaux normaux de la diversité clonale ne sont pas atteints avant l'initiation de la thymopoïèse [156, 157]. La reconstitution des cellules T est graduelle et atteint le nombre approprié chez l'enfant à partir de 9 mois après la greffe [157].

Cependant, la greffe de moelle osseuse chez l'enfant montre une plus rapide reconstitution des lymphocytes T comparativement à la greffe de sang de cordon. Durant les 3 premiers mois suivant la greffe allogénique de moelle osseuse, on note chez certains patients un pourcentage élevé de cellules T CD45RO+ versus un faible pourcentage de CD45RA+ avec un recouvrement des cellules T CD8. Ces dernières sont aussi observées entre 3 et 6 mois après la greffe allogénique de moelle osseuse [158]. Par ailleurs, Bartelink et al. (2013) ont observé un nombre plus élevé de cellules T CD4 et CD8 chez les greffés de moelle osseuse que chez les greffés de sang de cordon, avec une reconstitution des cellules T CD8 plus rapide chez les greffés de moelle osseuse [159]. Cependant, le recouvrement des cellules T CD4 est plus lent. Cela peut durer jusqu'à 2 ans post-greffe chez l'enfant [158, 160]. Ce retard dans le recouvrement des cellules T CD4 (incluant les cellules CD45RA+) est associé à l'âge et à la coexistence de GvHD avec une réactivation de CMV après la greffe [160].

1.9.3.2.2 Lymphocytes B

Le recouvrement des lymphocytes B commence entre le troisième et le quatrième mois après la greffe allogénique de cellules souches. Il atteint un nombre significatif comparable à celui de l'individu sain entre le sixième et le neuvième mois post-greffe [161]. Récemment, les travaux de Bartelink et al. (2013) ont montré que durant les 3 premiers mois post-greffe, la reconstitution des cellules B est plus rapide chez les greffés de sang de cordon que chez les receveurs d'une greffe allogénique de moelle osseuse [159]. En 1996, l'équipe de van Tol [162] a évalué la cinétique d'apparition des immunoglobulines G (IgG) provenant du donneur versus la disparition de celles du receveur chez 25 enfants ayant reçu une greffe allogénique de moelle osseuse. Elle a caractérisé les Ig-H de l'isotype IgG (IgG-H) des sous-classes d'IgG et des allotypes Gm (allotypes des chaînes lourdes d'IgG) dans le sérum des patients après la greffe. Les Ig-H sont des composantes transitoires homogènes d'immunoglobuline qui sont fréquemment retrouvées dans le sérum (à faible concentration) des patients greffés de moelle osseuse. Leur cinétique d'apparition suggère qu'elles représentent l'expansion clonale des cellules B provenant du donneur [162]. Les résultats ont montré que dès 3 mois post-greffe, les IgG homogènes (IgG-H) provenant du donneur sont détectables, et elles atteignent des valeurs normales (comparables au sujet sain) dans les 6 mois après la greffe. Celles du receveur persistent durant plusieurs années après la greffe [162]. De même, les IgM dans le sérum de la plupart des patients atteignent des niveaux normaux dans les 6 mois après la greffe allogénique de moelle osseuse [163].

1.10 Les complications associées à la greffe de sang de cordon ou de moelle osseuse

Après une greffe de sang de cordon ou de moelle osseuse, les patients peuvent souffrir de certaines complications graves, parmi lesquelles l'échec de greffe, le rejet de greffe, les infections opportunistes et la GvHD sont les plus communes. Généralement, ces complications apparaissent tôt après la greffe, période durant laquelle le système immunitaire du receveur de greffe est déficient ou presque absent dû au régime de conditionnement.

1.10.1 Influence du régime de conditionnement

Le régime de conditionnement consiste en un traitement de chimiothérapie avec ou sans irradiation corporelle pour détruire les cellules du receveur et favoriser la prise de greffe afin de reconstituer son système immunitaire. Il permet de prévenir le rejet de greffe et la GvHD. Le conditionnement peut être myéloablatif et lymphoablatif ou non myéloablatif. Ce dernier utilise une chimiothérapie moins intensive et est associé à une plus courte période de neutropénie par rapport au conditionnement myéloablatif [134]. Cependant, l'immunosuppression induite par le régime de conditionnement rend les patients greffés très vulnérables aux infections opportunistes.

1.10.2 Rejet de greffe et échec de la greffe

Le rejet de greffe se définit par l'ensemble des réactions développées par l'organisme du receveur contre le greffon (cellules du donneur) conduisant à sa destruction complète. Ces réactions sont générées par les cellules T et NK du receveur qui reconnaissent les cellules du donneur comme « non soi » [164]. Ce qui a pour conséquence l'échec de la greffe dont la

fréquence est plus élevée après la greffe de sang de cordon (10 à 15%) comparativement à la greffe de moelle osseuse (1-2%). Ceci s'explique par le fait que la greffe de sang de cordon utilise une dose plus faible de cellules souches avec plus de disparités HLA, se traduisant par un retard dans le recouvrement des neutrophiles et plaquettes [165, 166].

La reconstitution rapide des neutrophiles et des plaquettes favorise la prise de greffe, processus dans lequel les cellules T et NK du donneur ont des effets bénéfiques. Par exemple, des études chez la souris ont permis de montrer que l'infusion de cellules NK activées tôt après la greffe de moelle permet une prise rapide de greffe avec une diminution du taux d'échec de la greffe [167-169]. L'effet positif des cellules NK du donneur sur la prise de greffe est associé à leur activité cytotoxique à travers laquelle elles détruisent les cellules présentatrices d'antigènes et les cellules T du receveur [170]. Quant aux lymphocytes T du donneur, ils contribuent à l'appauvrissement du receveur en effecteurs immunologiques pour donner avantage à la prise de greffe. Leurs effets sont médiés par les mécanismes impliquant les cytokines qu'ils sécrètent, les contacts cellulaires et la différenciation des cellules souches [171-174].

1.10.3 Maladie du greffon contre l'hôte ou GvHD

La GvHD aiguë est une pathologie inflammatoire causée par une prédominance de la production des cytokines Th1 et des lymphocytes T cytotoxiques entraînant des dommages aux tissus [175]. Son incidence est faible dans le cas de la greffe de sang de cordon contrairement à la greffe de moelle osseuse. En effet, la majorité des cellules T contenues dans le sang de cordon est naïve et dépourvue d'activité cytolytique avec un faible potentiel de production des cytokines inflammatoires (IL-2; IL-4, IL-10 et IFN par exemple) [176, 177].

Elles présentent plutôt un profil Th2 avec une forte production d'IL-13 [178]. De plus, les cellules T régulatrices provenant du sang de cordon participent aussi à la suppression de l'alloréactivité [179-181]. Ainsi, malgré le haut degré de disparité HLA, l'incidence et la sévérité de la GvHD aiguë chez les enfants greffés de sang de cordon, sont faibles dans les 3 mois post-greffe comparativement à ceux greffés de moelle osseuse non apparentée [182-184]. Par ailleurs, d'autres études associent les faibles incidence et sévérité de la GvHD après greffe aux cellules NK contenues dans le sang de cordon [170, 185, 186].

Quant à la GvHD chronique, elle est diagnostiquée chez 9 à 31% des greffés de sang de cordon à des périodes de temps variables, comparée à 42% à 2 ans après greffe de moelle osseuse [187]. Son développement est associé avec la présence d'une GvHD aiguë sévère, mais il n'a montré aucune relation avec le degré de disparité HLA [188].

1.10.4 Infections opportunistes

Les infections opportunistes sont très fréquentes après greffe de sang de cordon ou de moelle osseuse à cause du recouvrement tardif des cellules T [189, 190], lesquelles jouent un rôle crucial dans la protection contre ces infections. L'incidence la plus élevée est observée après la greffe de sang de cordon. Mais en terme de mortalité reliée aux infections opportunistes, il n'y a pas de différence entre les deux types de greffe [190, 191]. Ces infections peuvent être d'origine bactérienne, fongique ou virale et apparaissent généralement durant les 3 premiers mois post-greffe.

L'incidence et la sévérité des infections bactériennes et fongiques après greffe de sang de cordon ne diffèrent pas de la greffe de moelle osseuse. Les patients avec un échec de greffe sont plus à risque de faire des infections bactériennes [190, 192].

Parmi les infections virales, les plus fréquentes sont les infections aux virus herpès. Par exemple, les infections à CMV et VEB ou leur réactivation apparaissent très tôt après la greffe et ont des conséquences néfastes sur l'état des patients durant les 6 mois après greffe de sang cordon [193]. De même, l'incidence du virus de la varicelle-zona (VZV) est de 46% chez les greffés de sang de cordon à 3 ans post-greffe, comparé à 31% chez les greffés de moelle osseuse [194]. L'incidence élevée de VZV après greffe de sang de cordon versus greffe de moelle osseuse et ses apparitions retardées (au delà de 3 mois post-greffe) s'expliquent difficilement. Il est possible que les manifestations tardives des infections au VZV reflètent le rôle des lymphocytes T dans la pathogenèse du virus de la varicelle [195, 196]. En effet, les cellules T peuvent être productivement infectées avec le VZV et on pense qu'elles médient le transfert du virus de la racine dorsale des ganglions aux autres sites en périphérie durant la dissémination cutanée et viscérale du VZV [197-201].

La faible incidence d'infections opportunistes après greffe de moelle osseuse a été associée à des niveaux élevés de cellules NK [202, 203]. Ainsi, par extrapolation, ceci suggère que la reconstitution rapide des cellules NK après greffe de sang de cordon permettrait un contrôle des infections virales chez ces greffés. Mais, d'autres études ont rapporté que la disparité au niveau du ligand KIR chez les greffés de sang de cordon est marquée par l'augmentation de la mortalité associée aux infections opportunistes [204, 205]. Ainsi, la fonction cytotoxique des cellules NK est affectée dans les cas de greffe de sang de cordon ayant une disparité du ligand KIR. Au contraire, l'équipe de Cohen (2006) a attribué les réponses antivirales (HSV, VZV et CMV) chez les enfants greffés de sang de cordon aux cellules T, et ces réponses étaient associées à une diminution de la mortalité liée aux infections opportunistes [206]. Cela indique que les lymphocytes T naïfs transférés dans la

greffe de sang de cordon sont capables de générer une immunité spécifique aux antigènes viraux avant le recouvrement thymique. Cependant, cette immunité n'est pas effective. Durant la reconstitution immune, les lymphocytes T dérivés du sang de cordon résultent en un répertoire de cellules T asymétrique avec une réactivité limitée contre les antigènes nouvellement rencontrés, où ils entrent en apoptose [207, 208].

Par ailleurs, le régime de conditionnement n'a pas d'influence sur la fréquence des infections. Toutefois, lorsqu'il inclut l'ATG (anti-thymocyte globuline), la fréquence d'apparition des infections tôt après la greffe est augmentée [134, 209]. Ceci est relié au fait que l'ATG entraîne la perte significative des cellules T fonctionnelles. Son utilisation dans le régime de conditionnement a été associée à une forte incidence de réactivation du CMV [210, 211].

Quant au VEB, son infection primaire ou sa réactivation survient généralement durant les 6 premiers mois après la greffe [212-214]. Et, en l'absence d'une réponse immune robuste, elle peut conduire au développement de la maladie lymphoproliférative B post-greffe (MLP). Ainsi, pour prévenir l'infection par le VEB et la MLP chez les receveurs de greffes, il est impératif d'améliorer ou de renforcer la fonction du système immunitaire durant son recouvrement. À cet effet, certaines thérapies sont administrées aux patients, telles que : les antiviraux, les cytokines, l'infusion de lymphocytes du donneur spécifiques à l'antigène, les immunoglobulines intraveineuses [133], et d'autres qui sont en développement telle que la vaccination. L'ensemble de ces thérapies est abordé plus loin (section 1.12).

1.11 Maladie lymphoproliférative post-greffe associée au virus Epstein-Barr

La maladie lymphoproliférative post-greffe associée au VEB se caractérise par l'unique incapacité des patients greffés de contrôler l'infection par le VEB. Par conséquent, les cellules B transformées par le VEB prolifèrent de façon incontrôlée. Cette lymphoprolifération peut se produire à partir d'une seule cellule (lymphome monoclonal), ou de plusieurs cellules (lymphome polyclonal). Elle peut aussi être monomorphique (homogène) ou polymorphique (hétérogène) [215].

1.11.1 Caractéristiques cliniques

La MLP peut se manifester par des symptômes non spécifiques tels que les malaises, la fièvre et la perte de poids [216, 217] et des symptômes plus spécifiques tels que la lymphadénopathie, l'amygdalite et la perforation intestinale [217]. Elle peut se développer tôt (durant la première année) après la greffe (MLP précoce) ou plus tard (MLP tardive). Environ 47% des cas précoces se manifestent dans les 6 mois suivant la greffe et 62% se développent durant la première année de greffe [215]. Quant à la MLP tardive, 30% des cas se développent entre 1 à 5 ans après la greffe et moins de 10% se produisent 5 ans après la greffe [218]. Son diagnostic nécessite de nombreux examens en plus des symptômes et des signes cliniques des patients. Par exemple, une biopsie de la moelle osseuse et des tissus est nécessaire. À ceci s'ajoutent la détection de la présence du VEB par hybridation *in situ* des ARN viraux et la mesure de la charge virale par PCR quantitative dans le sang périphérique [219].

1.11.2 Facteurs de risque

La MLP est associée à plusieurs facteurs de risque tels que le statut sérologique anti-VEB du donneur et du receveur de la greffe, le type de greffe (solide ou liquide), l'intensité de l'immunosuppression et l'âge du receveur [220, 221]. L'infection par le VEB est l'un des plus grands facteurs de risque. Elle peut être acquise suite à une réactivation du virus chez le receveur séropositif ou à travers une infection primaire chez le receveur séronégatif. Le virus peut aussi venir de la greffe dans le cas où le donneur est VEB séropositif. Lorsqu'une telle greffe est transférée à un receveur séronégatif, le risque de développer la MLP est de 25 à 50 fois plus élevée [222]. En effet, l'incidence de la MLP varie beaucoup en fonction du type d'organes greffés. Cette variation est associée à la quantité de tissus lymphoïdes transférés par la greffe, car les tissus lymphoïdes constituent un réservoir du VEB [215]. L'incidence la plus élevée (soit 19%) est observée chez les greffés d'intestins, 8% chez les greffés de poumons, 3% chez les greffés du cœur ou du foie et moins d'1% chez les greffés du rein [217, 223]. L'incidence de la MLP chez les greffés de cellules souches hématopoïétiques (sang de cordon ou moelle osseuse) varie de 1 à 3% [224]. Les agents immunosuppresseurs sont des facteurs de risque pour la MLP à cause de leurs effets pro-néoplasiques et de leur pouvoir immunosuppresseur. L'âge aussi est un important facteur de risque pour la MLP. Les enfants sont immunologiquement naïfs contre le VEB et sont prédisposés à une infection primaire. Ainsi, dans le contexte où ils reçoivent une greffe, ils sont très vulnérables à développer la MLP après la greffe [225]. La MLP constitue une grave complication de l'infection par le VEB, avec un taux de mortalité de 50-80% [224].

1.12 Traitements contre l'infection par le virus Epstein-Barr et la maladie lymphoproliférative post-greffe

1.12.1 Traitements administrés aux patients

Il est évident que la meilleure défense contre l'infection par le VEB et la MLP post-greffe est la réponse spécifique des cellules T. Or, chez les greffés, cette fonction est temporairement abolie par le régime de conditionnement, et son recouvrement prend plusieurs mois après la greffe. De ce fait, l'une des stratégies serait d'accélérer le recouvrement des cellules T, ce qui n'est pas encore le cas. Dans cette perspective, l'administration du G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) aux patients greffés réduit le temps de recouvrement des neutrophiles et des plaquettes [135]. Ainsi, le G-CSF pourrait être un traitement de choix. Mais son utilisation est controversée car il peut altérer la fonction des cellules T.

À défaut de recouvrer rapidement les cellules T, les cliniciens administrent aux patients des traitements leur permettant de renforcer leur système immunitaire affaibli. Ces traitements peuvent être préemptifs et / ou préventifs. Les plus communs sont: la réduction de l'intensité d'immunosuppression, la chimiothérapie, les anticorps anti-CD20 (rituximab), la thérapie cellulaire expérimentale adoptive, les antiviraux et les immunoglobulines intraveineuses [226].

1.12.1.1 Réduction de l'intensité de l'immunosuppression

On sait qu'un régime immunosuppresseur sévère prolonge la période de recouvrement du système immunitaire des patients greffés. Ainsi, l'idée de réduire l'intensité de l'immunosuppression vise à accélérer la reconstitution de l'immunité. Dans le cas des greffes de cellules souches hématopoïétiques, une revue de la littérature (publiée entre 1999 et 2008)

rapportée par l'équipe de Styczynski (2009) indique qu'il n'est pas évident d'évaluer l'effet de la réduction de l'intensité de l'immunosuppression sur la MLP. Car ce traitement est généralement utilisé en combinaison avec d'autres agents thérapeutiques [226]. Cependant, parmi les publications investiguées par Styczynski et collaborateurs (2009) [226], une étude associe la diminution de l'intensité de l'immunosuppression à la réduction du développement de la MLP [227].

1.12.1.2 Chimiothérapie

La chimiothérapie est plus fréquemment employée chez les adultes que chez les enfants greffés. L'un des régimes de chimiothérapie utilisés est le régime CHOP (Cyclophosphamide, Hydroxyadriamycine, Oncovine, Prednisone). Il est basé sur le traitement des tumeurs lymphoprolifératives B. Selon deux revues publiées par l'équipe de Styczynski (2009) et celle de Reddy (2011), son efficacité contre la MLP chez les greffés de cellules souches hématopoïétiques n'est pas claire [226, 228].

1.12.1.3 Anticorps anti-CD20

L'anticorps anti-CD20 est aussi appelé le rituximab. Il est dirigé contre les lymphocytes B incluant ceux transformés par le VEB. Son efficacité dans la prévention de la MLP chez les greffés de cellules souches hématopoïétiques a été rapportée par plusieurs études (48 publications) résumées par Styczynski et collaborateurs (2009) [226]. Ces derniers concluent que l'utilisation préemptive du rituximab chez les patients avec une charge virale élevée est efficace pour prévenir la MLP, avec un taux de succès de 89.7%. Il est important de préciser que dans la plupart de ces études, le rituximab était utilisé en combinaison avec d'autres protocoles thérapeutiques [226].

1.12.1.4 Thérapie cellulaire expérimentale adoptive

Elle semble être efficace contre les MLP après une greffe de moelle osseuse [229]. Mais en général, ses succès sont très faibles. Elle requiert de l'expertise, beaucoup de temps pour produire les cellules (plus de 2-3 mois) [230] et nécessite l'appariement des épitopes des peptides au grand nombre de polymorphismes HLA disponibles dans une population humaine [231]. Notons qu'il est important dans ce cas-ci que les cellules T, nouvellement générées, fonctionnent dans un environnement immunosuppresseur.

1.12.1.5 Antiviraux

Les antiviraux sont généralement utilisés dans le cadre du traitement contre les infections par les virus herpès incluant le VEB. Ce sont principalement l'acyclovir, le valacyclovir, le ganciclovir, le cidofovir et le foscarnet. Ils inhibent la réplication virale en bloquant l'ADN polymérase virale sans affecter celle de la cellule. Par exemple l'acyclovir et le ganciclovir inhibent la réplication lytique du VEB et ainsi, ils freinent la production de nouveaux virions infectieux. Leur efficacité contre le VEB est très controversée. L'administration d'acyclovir aux patients diagnostiqués de MI ou présentant des symptômes similaires à la MI, entraîne une réduction du niveau de fièvre ainsi que la durée d'hospitalisation chez ces patients. De ce fait, l'acyclovir est considéré comme un potentiel agent thérapeutique contre la MI [232]. Par ailleurs, le traitement avec le valacyclovir permet de réduire l'excrétion du VEB dans des cas de MI [233]. Cependant, plusieurs études soutiennent l'inefficacité des antiviraux contre le VEB dans les cas de MI et ont été résumées par Gershburg et Pagano (2005) [234]. Cette inefficacité est fort probablement due au fait que la majorité des symptômes cliniques de la MI n'est pas directement liée à la cytopathologie virale dans les tissus infectés. Ces symptômes et

signes cliniques sont plutôt une conséquence des réponses immunologiques contre les cellules infectées par le VEB [234]. Dans la prévention de la MLP associée au VEB, les traitements avec les antiviraux sont généralement combinés avec d'autres agents thérapeutiques, tels que le rituximab et les immunoglobulines intraveineuses [226].

1.12.1.6 Immunoglobulines intraveineuses ou IgIV

Les immunoglobulines intraveineuses sont administrées en guise de traitement prophylactique anti-infectieux chez les receveurs de greffe de sang de cordon ou de moelle osseuse. Elles possèdent, entre autres, diverses propriétés biologiques et fonctions qui sont discutées ci-dessous.

1.12.1.6.1 Propriétés biologiques et domaines d'application des IgIV

Les IgIV commerciales sont des produits sanguins préparés à partir du sérum de milliers d'individus sains (1000 et plus) [235, 236]. Elles sont utilisées principalement en neurologie, hématologie, immunologie, néphrologie, rhumatologie et dermatologie. En hématologie, elles servent à traiter la cytopénie immune, l'aplasie des globules rouges associée au parvovirus B19, à la leucémie lymphoïde chronique et à l'hypogammaglobulinémie secondaire au myélome [236]. Elles sont aussi administrées aux patients immunosupprimés receveurs de greffes de cellules souches hématopoïétiques ou d'organes solides en guise de prévention contre les infections opportunistes [237]. Chez les patients atteints d'une déficience en anticorps, les IgIV constituent un traitement de choix. À cette indication, elles sont administrées à une dose de remplacement de 200 à 400 mg/kg de poids corporel par semaine, pendant trois semaines. Les fortes doses d'IgIV sont de 2g/kg/mois et sont utilisées comme

des agents immunomodulateurs dans les troubles immunitaires et inflammatoires. Elles ont été utilisées pour la première fois dans la thrombocytopénie chez l'enfant [236, 238].

1.12.1.6.2 Mécanismes d'action des IgIV

Les IgIV contiennent un vaste répertoire d'anticorps d'une grande spécificité, ce qui résulte en la neutralisation d'une large gamme d'antigènes [239]. Leurs mécanismes d'action sont complexes et dépendent de la dose administrée ainsi que de la pathogenèse de la maladie. À travers leur chaîne $F(ab')_2$, les IgIV jouent diverses fonctions (figure 1.10). Par exemple, elles inhibent la prolifération des cellules T *in vitro* [240] et induisent l'apoptose des monocytes, des lymphocytes leucémiques ainsi que des cellules B normales des amygdales [241]. Une étude évaluant l'importance des anticorps naturels sur le développement des cellules dendritiques chez les patients déficients en lymphocytes B et en anticorps circulants a démontré que les IgIV (source d'anticorps naturels) jouent un rôle fondamental dans la différenciation des cellules dendritiques [242].

Par ailleurs, à travers la liaison à leurs récepteurs Fc (inhibiteurs et activateurs), les IgIV médient de nombreux effets (figure 1.10). Entre autres, la liaison des IgIV au récepteur Fc inhibiteur désactive la phagocytose. Ceci implique la cytokine CSF-1 qui agit comme un senseur des régions Fc des IgIV [243]. L'activation des récepteurs Fc entraîne une inhibition de la maturation des cellules dendritiques [244] et joue un important rôle dans le changement des cytokines, lesquelles régulent à la baisse la fonction réticulo-endothéliale [245]. Les IgIV induisent la production d'IFN- γ , d'IL-6 et d'IL-1ra et régulent à la baisse la production d'IL-1 et d'IL-2 [246-248]. Elles peuvent interférer avec la cytotoxicité cellulaire anticorps

dépendante ou ADCC (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity) par compétition avec les anticorps dirigés contre les cibles cellulaires pour la liaison aux récepteurs Fc [236].

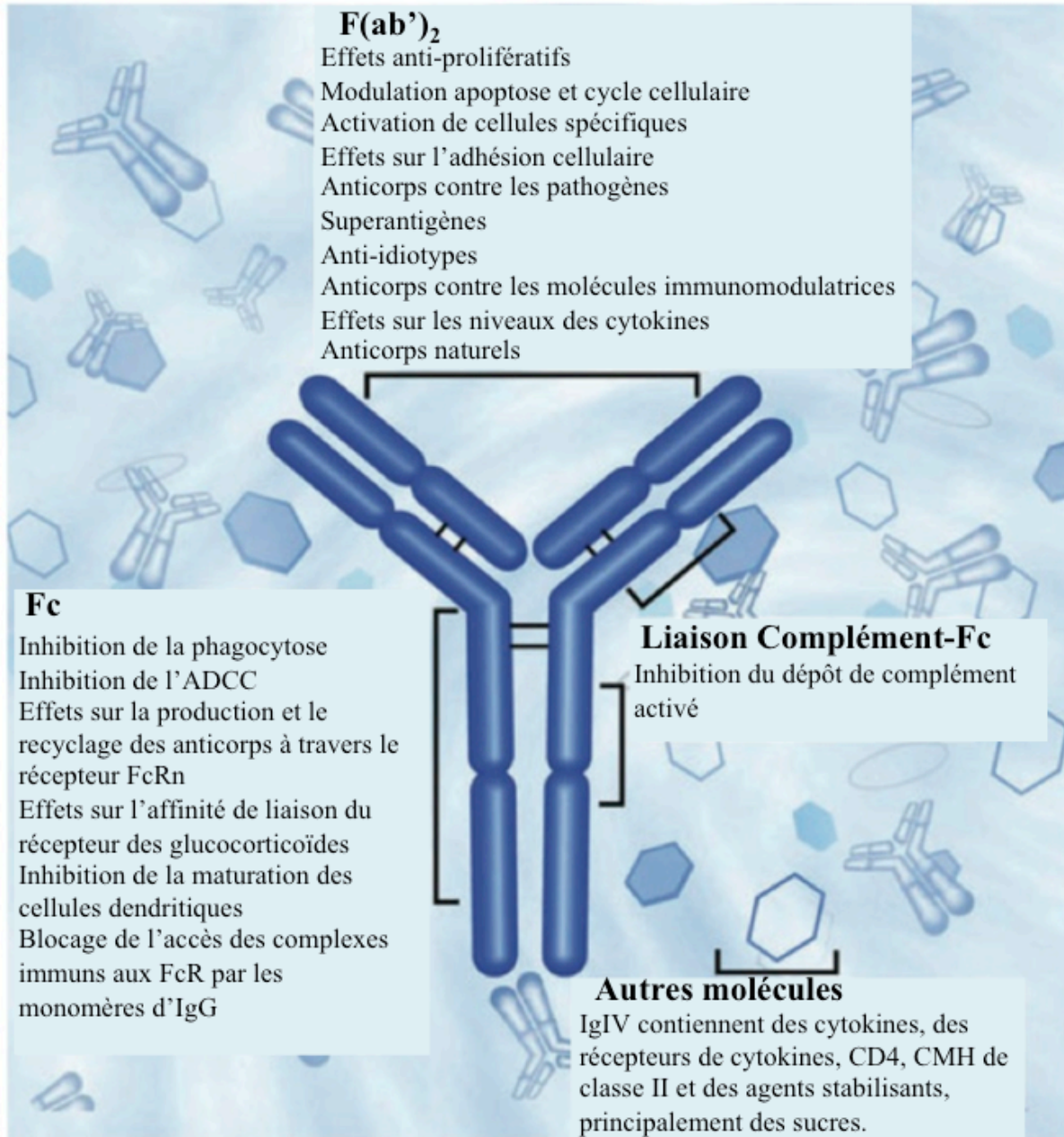


Figure 1.10 : Principales fonctions des immunoglobulines intraveineuses (adapté de Jolles et al. 2005) [236].

D'autres effets bénéfiques des IgIV sont notés grâce à la liaison de leur domaine Fc au complément (Figure 1.10). De petites doses d'IgIV produisent une activation mesurable des voies classique et alterne [249]. Les IgIV peuvent contenir des cytokines, des inhibiteurs de cytokines solubles, du CD4 soluble, des molécules du HLA de classe II [250] et des agents stabilisants. Parmi ces derniers se trouvent des sucres (maltose et sucrose) qui peuvent aussi exercer un effet. Par exemple, à certaines concentrations dans les IgIV, ces sucres peuvent inhiber la prolifération des cellules mononucléées induite par la phytohémagglutinine et le myristate-acétate de phorbol *in vitro* [251, 252].

Récemment, une revue publiée par l'équipe de Tjon [253] a attiré notre attention sur le fait que la plupart des mécanismes anti-inflammatoires des IgIV ont été démontré par des études utilisant des modèles murins. Parmi ces mécanismes, il s'agit de l'induction de l'expression du récepteur inhibiteur FcγRIIB et la stimulation des Tregs par les IgIV. Sachant que la souris et l'humain n'ont pas la même biologie, il est important de vérifier à quel point les composantes cellulaires et moléculaires impliquées dans ces mécanismes sont transposables chez l'humain [253]. Par exemple il a été démontré que le traitement avec les IgIV stimule l'expression de FcγRIIB sur les cellules myéloïdes chez la souris [243, 254]. Cependant, chez l'humain (patients avec maladies autoimmunes) les IgIV n'ont montré aucun effet sur l'expression de FcγRIIb [253, 255]. Elles induisent par contre une diminution de l'expression du récepteur activateur FcγRIIa sur les cellules myéloïdes en circulation [255]. Par ailleurs, le rôle anti-inflammatoire des IgIV à travers la stimulation de l'expansion des Tregs a aussi été élucidé dans des modèles murins expérimentaux [256, 257] et chez l'humain (patients traités avec des doses élevées d'IgIV) [258, 259]. L'IL-33 semble jouée un rôle dans

l'augmentation de l'expression de Fc γ RIIB (chez la souris), la diminution de l'expression de Fc γ RIIa (chez l'humain) (Figure 1.11) et dans l'expansion des cellules Tregs [253].

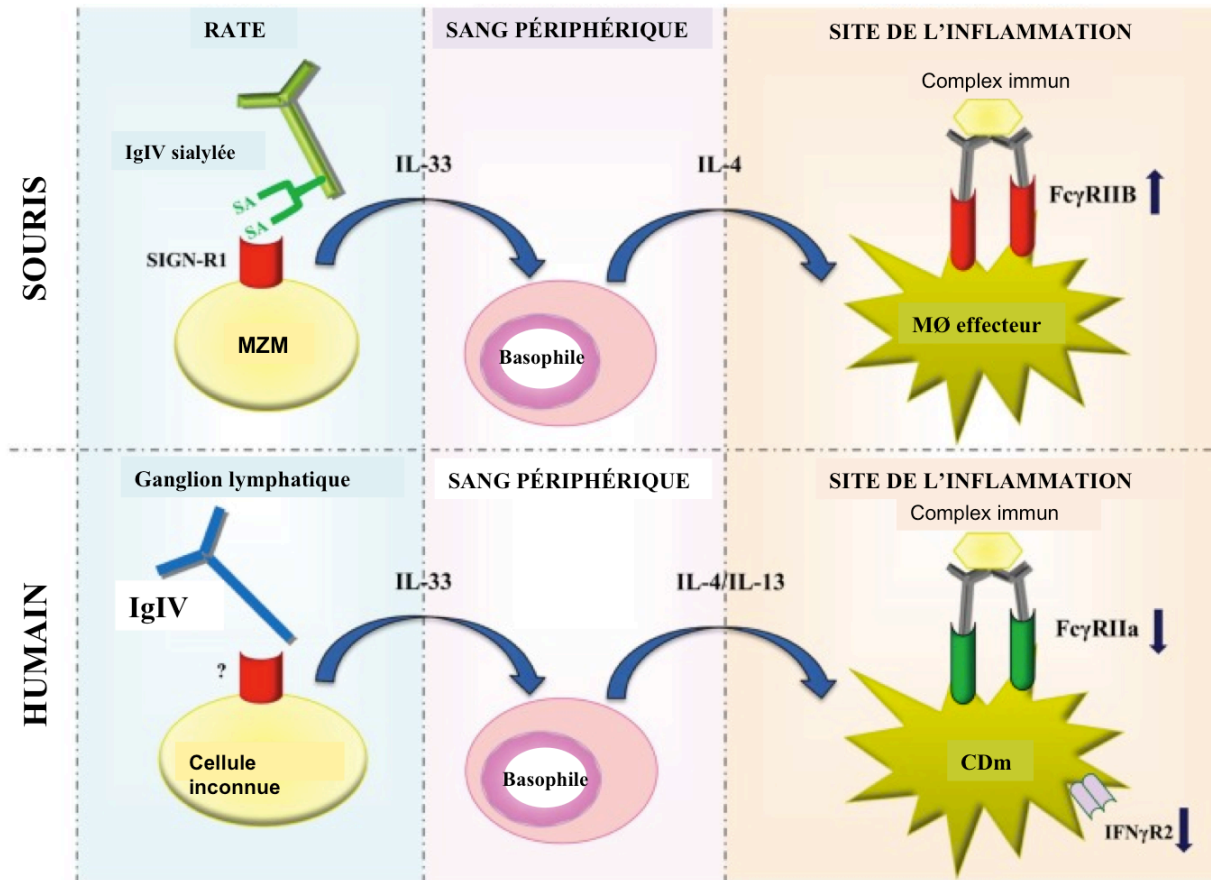


Figure 1.11 : Modèles de modulation de l'expression des récepteurs Fc γ R par les IgIV chez la souris et chez l'humain (adapté de Tjon et al. 2015 [253]).

1.12.1.6.3 Rôles des IgIV dans la prévention de l'infection par le virus Epstein-Barr et la maladie lymphoproliférative post-greffe

Les IgIV sont aussi administrées aux patients immunosupprimés receveurs de greffes qui sont très vulnérables au VEB. Cependant, leur efficacité pour prévenir l'infection par ce virus est controversée. Deux méta-analyses réalisées dans les années 1990 ont confirmé les bienfaits de l'utilisation des IgIV chez les receveurs d'une greffe de moelle osseuse [260, 261]. Des études

réalisées sur des modèles murins de la maladie lymphoproliférative B associée au VEB, ont aussi démontré que les IgIV sont capables de prévenir le développement de la MLP [262, 263]. Une étude plus récente a rapporté que les IgIV, en combinaison avec un antiviral, ont permis de contrôler le développement de la MLP chez un jeune greffé du foie [264]. Cependant, l'étude de Green et al. 2006 a montré le contraire [265]. Le traitement des enfants greffés du foie avec les IgIV-CMV (CytoGam) n'a pas d'effets significatifs sur le développement de la MLP [265]. De même, le traitement combinant les IgIV et un antiviral (ganciclovir) n'a pas affecté la charge virale chez les greffés d'organes dont les donneurs sont VEB seropositifs [266]. Une méta-analyse plus récente a montré que les IgIV et les IgIV-CMV n'ont pas d'effets contre l'infection par le CMV après une greffe de cellules souches hématopoïétiques. Par contre, elles ont augmenté le risque de la maladie veino-occlusive [267]. Un groupe d'études soutient que les IgIV réduiraient les complications suite aux infections telle que la pneumonie interstitielle [268-270] et d'autres soutiennent que les IgIV sont inefficaces [271].

1.12.2 Traitements en développement (la vaccination)

Le vaccin anti-VEB le plus populaire est basé sur la glycoprotéine de l'enveloppe virale à travers laquelle le virus se lie au récepteur cellulaire. C'est une glycoprotéine sous deux formes, une de 350 kDa et la deuxième de 220 kDa, qui sont codées par le même gène BLLF1. La gp350 est une protéine de 907 acides aminés contenant 37 sites N-glycosylés [272]. Quant à la gp220, elle est générée par épissage et résulte en une délétion de 196 acides aminés (entre les acides aminés 502 à 698) [273]. Les anticorps dirigés contre la gp350/220 sont capables d'inhiber l'immortalisation des cellules B par le VEB. Par exemple, en 1980, l'équipe de

Hoffman a généré une lignée cellulaire hybride à partir de la fusion des cellules de myélomes de souris avec des splénocytes qui provenaient d'une souris immunisée avec le VEB. Ils ont démontré que cette lignée hybride sécrète un anticorps monoclonal capable de neutraliser l'infection par le VEB, et que cette activité était spécifique contre la gp350 de l'enveloppe virale [274]. Plus tard, l'activité neutralisante de ce monoclonal murin a été confirmée par d'autres équipes [275, 276]. Vers la fin des années 80, l'équipe de Morgan a développé un vaccin en laboratoire (virus recombinant exprimant la gp350) capable de prévenir les lymphomes B causés par le VEB chez les petits primates [277]. En 2006, l'équipe de Haque a confirmé que l'anti-gp350 murin (ou 72A1) inhibe l'infection des lymphocytes B par le VEB *in vitro* [278]. Dans la même étude, l'équipe a aussi démontré l'activité neutralisante de l'anticorps *in vivo* dans un modèle murin de MLP. Cependant, lorsqu'ils l'ont injecté aux patients immunosupprimés, ceux-ci ont développé une forte réaction d'hypersensibilité, d'où la limite de son utilisation en clinique [278]. L'ensemble de ces études démontre que la gp350 de l'enveloppe virale est une cible importante dans la neutralisation de l'infection par le VEB. Ainsi, plusieurs études ont été conduites sur la molécule gp350, dont la cartographie de ses épitopes qui a permis d'identifier cinq (ou plus) sites antigéniques sur la protéine gp350 [274, 279-282]. L'inhibition d'un seul de ces sites, est capable de neutraliser l'infection par le VEB [273, 283, 284]. Ceci s'explique par le fait que les anticorps qui reconnaissent spécifiquement cet épitope bloquent l'attachement de la gp350 à son récepteur cellulaire CD21 [285]. La liaison des anticorps neutralisants sur la gp350 dépend de la conformation de ses épitopes [286].

1.13 Problématique, hypothèses et objectifs de l'étude

1.13.1 Problématique

Le VEB est un virus ubiquitaire qui infecte au-delà de 90% de la population mondiale. Il utilise plusieurs stratégies pour échapper au système immunitaire, lui permettant ainsi de persister à vie chez son hôte. L'infection primaire au VEB ou sa réactivation chez les enfants immunosupprimés (receveurs de greffe) est un facteur de risque important pour la MLP. Les traitements actuels sont plus ou moins efficaces et présentent des désavantages non négligeables. Par ailleurs, on ne dispose pas d'un outil précis pour le pronostic de la MLP.

1.13.1.1 Limites et désavantages des traitements contre le virus Epstein-Barr et la maladie lymphoproliférative post-greffe

Les études sur l'efficacité potentielle des antiviraux dans la prévention de l'infection par le VEB et la MLP ne sont pas convaincantes, car elles utilisent entre autre des contrôles non spécifiques [287, 288]. En outre, elles n'ont pas trouvé une association claire entre l'utilisation des antiviraux et la réduction de la MLP [266, 289-292]. Par ailleurs, le rituximab cible les cellules B matures incluant les lymphocytes B malins. Le taux de réponse des patients pour des lymphomes établis est de 63% [226]. Il est important de noter que le rituximab ne distingue pas entre les lymphocytes B sains et malins. De ce fait, son utilisation impose un risque important d'infections virales fatales durant les 6-9 mois nécessaires pour la régénération de la population de cellules B déplétées suite à ce traitement [293, 294]. Son utilisation à long terme pourrait altérer la réponse humorale normale [295]. En plus, le coût pour le traitement au rituximab s'avère prohibitif. La thérapie cellulaire expérimentale

adoptive a également des succès très faibles. Elle requiert de l'expertise, beaucoup de temps pour produire les cellules (plus de 2-3 mois) [230], et son exécution est rigoureuse et complexe.

1.13.1.2 Contradictions sur l'utilisation des IgIV contre l'infection par le virus Epstein-Barr

Au moment de la greffe, en plus des antiviraux, les patients reçoivent aussi des IgIV en guise de prévention contre les infections opportunistes incluant le VEB. Sachant que ces IgIV sont riches en anticorps spécifiques au VEB, leur efficacité *in vivo* contre le VEB ou la MLP chez les jeunes greffés n'a pas réellement été prouvée. Par exemple, des études ont démontré que les IgIV (incluant le CYTOGAM qui est préparé à partir de sérums sélectionnées pour leurs hauts titres anti-CMV), en administration unique, ou en combinaison avec des antiviraux, n'avaient pas d'effets significatifs sur la MLP, ni sur l'infection primaire au VEB chez des jeunes greffés du foie ou d'autres organes solides, respectivement [265, 266]. Cependant, une seule étude soutient que le traitement d'un jeune patient greffé du foie avec les IgIV combinées aux antiviraux, a permis de contrôler le développement de la MLP chez ce patient [264]. En notant que le VEB infecte les cellules B à travers la liaison de la gp350 de l'enveloppe virale au récepteur cellulaire CD21, il suscite la question à savoir quelle est la capacité des anticorps anti-VEB contenus dans les IgIV à bloquer cette infection suite à une réactivation du VEB?

1.13.1.3 Manque de marqueurs fiables pour le pronostic de la maladie lymphoproliférative post-greffe

On sait que 62% des cas de MLP (incluant des cas chez les enfants et chez les adultes) se développent durant la première année de greffe dont environ 47% des cas se manifestent dans les 6 mois suivant la greffe. Malgré la surveillance régulière de la charge virale du VEB chez ces patients par PCR quantitative, il est difficile de prédire avec certitude ceux qui vont développer une MLP. Face à l'absence d'un traitement préventif efficace contre l'infection par le VEB, il est important de pouvoir identifier les patients à risque de développer la MLP. Il a été démontré que la réponse des cellules T est nécessaire pour freiner l'infection lytique [296]. Leur activité cytotoxique inhibe la prolifération des cellules B transformées par le VEB. Cependant, les receveurs de greffe sont dépourvus de cette réponse due à leur régime de conditionnement immunosuppresseur. De ce fait, l'infection primaire par le VEB ou sa réactivation chez ces patients durant la première année de greffe peut se traduire par une charge virale élevée pouvant conduire au développement de la MLP. L'augmentation de la charge virale témoigne d'une intense réplication du VEB ou d'une prolifération des cellules B transformées par le VEB. De plus, les méthodes de quantification de la charge virale du VEB dans le sang périphérique n'informent pas sur le stade de l'infection (lytique ou latente), ce qui soulève la question à savoir si l'évaluation de la réponse spécifique des cellules T contre les antigènes lytiques ou latents du VEB chez les patients greffés permet d'identifier ceux à risque de développer la MLP. Pour répondre aux questions soulevées dans cette problématique, nous avons formulé deux hypothèses principales.

1.13.2 Hypothèses de recherche

Les phases précoces de l'infection par le VEB ou sa réactivation se caractérisent par une réplication lytique avec la production de virions infectieux [47, 297, 298]. Ces nouveaux virions infectent et immortalisent les cellules B naïves entraînant la lymphoprolifération. Cette dernière est freinée par la réponse spécifique des cellules T cytotoxiques chez l'hôte immunocompétent [95, 299]. Ce travail se base sur la prémisse voulant que tout agent capable de bloquer l'infection des cellules B par le VEB empêche aussi le développement de la MLP chez les individus immunosupprimés. Plusieurs études ont montré que les anticorps dirigés contre la glycoprotéine majeure de l'enveloppe virale (gp350) sont capables d'inhiber l'immortalisation des cellules B par le VEB [274, 276-278]. Sachant que les IgIV sont préparées à partir du plasma de milliers d'individus VEB séropositifs, nous émettons l'hypothèse que, si les préparations d'IgIV renferment des anticorps neutralisant le VEB, elles seraient capables de protéger les receveurs de greffe contre la MLP en bloquant l'infection secondaire des cellules B voisines. Par le même fait, nous postulons que la présence d'une réponse robuste des cellules T contre les antigènes lytiques du VEB constitue un marqueur de protection contre la MLP.

1.13.3 Objectifs de recherche

Dans cette section, nous présentons les objectifs qui serviront à vérifier nos hypothèses. Cette thèse comporte deux objectifs principaux qui sont divisés en deux sous objectifs chacun.

- Objectif 1

- a) Évaluer *in vivo* la capacité des IgIV à bloquer l'infection par le VEB chez une cohorte d'enfants greffés de cellules souches hématopoïétiques.
- b) Déterminer l'activité neutralisante du VEB dans les préparations commerciales d'IgIV.

- Objectif 2

- a) Étudier la réponse des cellules T contre les antigènes lytique et latent du VEB à l'aide d'un test ELISpot dans une cohorte d'enfants greffés de cellules souches hématopoïétiques.
- b) Faire une corrélation entre la réponse des cellules T (observée dans l'Objectif 2a) et la charge virale du VEB dans le sang périphérique des patients durant les 12 premiers mois après la greffe.

CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Évaluer *in vivo* la capacité des IgIV à bloquer l'infection par le virus Epstein-Barr chez les enfants greffés de cellules souches hématopoïétiques

2.1.1 La cohorte de patients

La cohorte de patients est formée de 49 enfants VEB séropositifs ayant reçu une greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (sang de cordon ou moelle osseuse) VEB séronégatives. Parmi eux, 37 patients (32 avec une greffe non apparentée et 5 avec une greffe apparentée) ont été traités avec les IgIV en guise de prophylaxie contre les infections opportunistes. Les données cliniques détaillées des patients sont présentées dans les Annexes I, II, III et IV. La dose administrée est de 500 mg/kg (milligramme par kilogramme) à partir du jour 3 avant la greffe, une fois par semaine jusqu'à 3 mois après la greffe. Ensuite, la fréquence est réduite à une fois par mois jusqu'à 9 mois après la greffe. Les autres traitements avec les IgIV incluent le RespiGam (Respiratory Syncytial Virus Immune Globulin Intravenous) [300] et le CytoGam (Cytomegalovirus Immune Globulin Intravenous) [301]. Ce dernier contient des titres élevés d'anticorps anti-CMV (Cytomégalovirus) et était administré aux patients lorsque ceux-ci étaient CMV positifs par PCR ou s'ils présentaient des signes cliniques évidents. Le RespiGam était donné aux patients pour les protéger contre l'infection par le virus respiratoire syncytial. Les 12 patients restants (10 avec une greffe apparentée et 2 avec une greffe non apparentée) n'ont pas été traités avec les IgIV. Les IgIV ont été administrées uniquement dans les cas d'une greffe non apparentée, d'une greffe apparentée

avec une hypogammaglobulinémie ou un déficit immunitaire, et aux enfants de 2 ans et moins. Tous les patients ont reçu un régime de conditionnement à des doses myéloablatives.

2.1.2 Charge virale du virus Epstein-Barr dans le sang périphérique

La charge virale du VEB dans le sang périphérique a été déterminée dans le sang total des patients par PCR quantitative (qPCR) au laboratoire de diagnostic moléculaire du CHU Sainte-Justine. Les cliniciens considèrent qu'à partir de 3000 copies par ml de sang, l'infection par le VEB peut rapidement évoluer vers la MLP. Ainsi, ils administrent aux patients le rituximab en guise de prévention. Les valeurs supérieures à 3000 copies par ml (millilitre) de sang ont été considérées cliniquement significatives pour la population étudiée.

2.1.3 Reconstitution des cellules immunitaires dans le sang périphérique

Le suivi de la reconstitution immunitaire des patients après la greffe a été réalisé par le service d'hémo-oncologie du CHU Sainte-Justine. Nous avons collecté les données sur le nombre absolu des lymphocytes B, des cellules T CD4, des cellules TCD8 et des cellules NK à partir des dossiers cliniques des patients. Pour notre analyse, nous nous sommes limités aux 12 premiers mois après la greffe. Nous avons réparti la cohorte de 49 patients en deux groupes. Le premier groupe comprend les patients qui ont montré une qPCR positive pour le VEB (VEB+) après la greffe (n = 21). Le second groupe contient les patients VEB négatifs (VEB-) par qPCR après la greffe (n = 28). Dans le groupe VEB+, quatre patients n'ont pas été inclus dans l'analyse car leurs données n'étaient pas disponibles. Pour comparer la cinétique de reconstitution des cellules immunitaires entre ces deux groupes (VEB+ versus VEB-) nous avons utilisé le test Mann-Whitney. C'est un test statistique non paramétrique qui permet de comparer les moyennes de deux groupes. En raison de l'absence de patients contrôles adéquats

au CHU Sainte-Justine, nous avons utilisé les données publiées par l'équipe de Valiathan (2014) en guise de valeurs de référence. Il s'agit du nombre absolu des cellules B, T CD4, T CD8 et NK, déterminé chez 50 adolescents (agés de 12 à 18 ans) du sud de la Floride [302]. Ce groupe d'âge correspond à la tranche d'âge d'une bonne proportion de notre cohorte d'étude dont l'âge des patients au moment de la greffe varie de 5 mois à 18 ans (la moyenne \pm l'écart type est de 8.83 ± 5.59).

2.2 Déterminer l'activité neutralisante des IgIV contre l'infection par le virus Epstein-Barr *in vitro*

2.2.1 Cellules

Les lignées cellulaires P3HR-1, B95-8, Bjab, Raji et CEM ont été maintenues dans le milieu de culture à 37°C avec 5% de CO₂. Le milieu de culture comprend les éléments suivants : RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 + glutamine (Invitrogen) contenant 10% de sérum foetal bovin (FBS, foetal bovine sérum) (Gibco Life Technologies) et 100 U/ml de pénicilline-streptomycine (Sigma).

Les cellules mononucléées de sang de cordon (CMSC) sont isolées à l'aide d'un gradient de Ficoll. Brièvement, le sang a été dilué dans le PBS (Phosphate Buffered Saline) stérile (Invitrogen) contenant du FBS-10% et rajouté doucement dans le tube contenant 15 ml de Ficoll-Paque (GE Healthcare Life Sciences). Le tout a été centrifugé 20 minutes à 3000 rpm (rotations par minute) à la température ambiante. L'anneau de cellules mononucléées a été récolté et centrifugé 10 minutes à 1200 rpm à la température ambiante. Le culot cellulaire a été ensuite lavé deux fois avec le PBS contenant du FBS-10%, à 1200 rpm durant 10 minutes.

2.2.2 Production de virus

Pour réaliser nos expériences, les souches virales VEB P3HR-1 et B95-8 ont été produites. Le virus P3HR-1 est une souche expérimentale de VEB dépourvue d'activité transformante. Il est produit par les lignées lymphoïdes B (P3HR-1) issues d'un lymphome de Burkitt [303]. Quant au virus B95-8, il représente la souche transformante du VEB. Il est produit par la lignée cellulaire B95-8 issue des cellules B de singe ouistiti infectées par le VEB provenant de la salive d'un cas de mononucléose infectieuse [304].

Le protocole de production des deux souches de VEB a été adapté du protocole préalablement décrit par Sairenji T et al. (1985) [305]. Les cellules P3HR-1 et B95-8 (en raison de 2×10^5 cellules/ml) ont été mises en suspension dans le milieu de culture (RPMI 1640 + glutamine avec 10% FBS et 100 U/ml de pénicilline-streptomycine) et incubées à 37°C avec 5% de CO₂. Après deux semaines d'incubation, le surnageant a été récolté par centrifugation. Le culot cellulaire a été congelé et décongelé deux fois afin de faire éclater les cellules vivantes et libérer les virus restants. Ensuite il a été remis en suspension avec quelques ml de surnageant et le tout a été centrifugé à 4000 rpm pendant 30 minutes. Le surnageant a été récolté et rajouté au précédent. L'ensemble des surnageants a été filtré avec le filtre 0.45 µm et centrifugé à 12,000 g pendant 2 heures à 4°C dans le rotor JA30.50. Le culot de virus qui en résulte, a été mis en suspension dans le milieu de culture (RPMI 1640 plus 10% FBS et 100 U/ml de pénicilline-streptomycine) de sorte que les virus récoltés soient concentrés à 200x. Ils ont ensuite été aliquotés dans un volume de 100 µl et conservés à -80°C. Les titres infectieux des virus P3HR-1 et B95-8 ont été déterminés en évaluant l'induction de l'expression des antigènes précoces (EA) dans les cellules Raji et des antigènes nucléaires

(EBNA) dans les cellules Bjab, respectivement. Ils ont été exprimés en unités induisant EA ou EBNA par ml (UI/ml) [305]: $EA \text{ ou } EBNA \text{ UI/ml} = ([\text{nombre de cellules Raji/ml ou BJAB/ml}] \times [\text{fraction de cellules EA+ ou EBNA+}]) / \text{dilution de la solution de virus P3HR-1 ou B95-8}$.

2.2.3 Tests de neutralisation

En premier, nous avons évalué la capacité des IgIV à bloquer l'infection cellulaire via des tests de neutralisation en culture cellulaire. Nous avons analysé l'inhibition de l'expression des antigènes précoces (EA) et latents (EBNA) dans les lignées cellulaires Raji et Bjab infectées par les souches virales P3HR-1 et B95-8 respectivement [306]. En second, nous avons mesuré le pouvoir des IgIV à neutraliser la transformation des lymphocytes B du sang de cordon par le VEB (souche B95-8).

Les cellules Raji constituent une lignée lymphomateuse B obtenue à partir d'un patient nigérian atteint de lymphome de Burkitt VEB positif [307]. C'est une lignée non productive qui, lorsque surinfectée par le VEB, exprime les antigènes précoces (EA) [308]. Les cellules Bjab, quant à elles, constituent une lignée lymphomateuse B provenant d'un lymphome de Burkitt VEB négatif [309].

2.2.4 Test de neutralisation pour examiner la capacité des IgIV à inhiber l'expression des antigènes précoces (EA) et latents (EBNA) dans les cellules Raji et Bjab infectées par le virus Epstein-Barr respectivement

Le virus P3HR-1 (1.08×10^5 UI/ml) ou le virus B95-8 (9.22×10^4 UI/ml) dans un volume de 50 μ l ont été incubés avec 10 μ l d'IgIV (dilutions 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160) et 10 μ l de milieu de culture (contrôle négatif) pendant 1 heure à 4°C. Ensuite 6×10^4 cellules Raji ou

Bjab ont été infectées avec le mélange IgIV : virus P3HR-1 ou IgIV : virus B95-8 respectivement incluant le contrôle négatif avec le mélange virus : milieu de culture correspondant (virus P3HR-1 ou virus B95-8), pendant 1 heure à 37°C. Nous avons inclus 6×10^4 cellules sans aucun traitement en guise de contrôle cellulaire. Les cellules ont ensuite été lavées une fois avec le PBS et le culot cellulaire a été remis en suspension dans le milieu de culture. Les cellules sont cultivées dans les plaques de 24 puits (Ultident, St. Laurent, Qc) en raison de 1 ml par puits pendant 2 jours (pour l'expression des EA dans les Raji) et 3 jours (pour l'induction des EBNA dans les Bjab) à 37°C avec 5% de CO₂. Les cellules ont ensuite été centrifugées et lavées une fois avec le PBS pour un marquage des EA et EBNA par immunofluorescence indirecte comme décrit par l'équipe de Sairenji (1988) [306]. Brièvement, les cellules ont été étalées sur lames (Multitest slide, MP Biomedicals, Santa Ana, California, USA) et fixées avec un mélange (1 : 1) d'acétone (Bioshop, life science products) et de méthanol (Bioshop, life science products) 3 minutes à -20°C pour la détection de l'expression des EBNA dans les cellules Bjab. Quant à l'expression des EA, les cellules Raji ont été fixées avec l'acétone pendant 10 minutes à -20°C. Après 1 heure de blocage avec le PBS contenant 5% de FBS, le sérum VEB positif a été ajouté pour 1 heure à la température ambiante. Après trois lavages (dans le PBS) de 5 minutes avec agitation (à 100 rpm), les cellules ont été incubées avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-IgG humain couplé au FITC (fluorescein isothiocyanate) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) pendant 1 heure à la température ambiante, suivi de trois lavages comme décrit précédemment. Puis, les cellules ont été recouvertes de glycérol (Sigma) dilué dans du PBS (1:1) et d'une lamelle pour observation au microscope à fluorescence (Zeiss, HAL 100, HBO

100W). Le pourcentage de neutralisation a été déterminé comme décrit par Sairenji et al. 1985 [305], soit :

$$\% \text{ neutralisation} = \frac{([\% \text{ de cellules } EA+ \text{ ou } EBNA+ \text{ (du mélange virus + milieu de culture)}] - [\% \text{ de cellules } EA+ \text{ ou } EBNA+ \text{ (du mélange IgIV + virus)}])}{([\% \text{ de cellules } EA+ \text{ ou } EBNA+ \text{ (du mélange virus + milieu de culture)}])} \times 100.$$
 Et les titres neutralisants à 50% ont été rapportés.

2.2.5 Test de neutralisation pour examiner la capacité des IgIV à inhiber la transformation des cellules mononucléées de sang de cordon par le virus Epstein-Barr

Pour effectuer le test de neutralisation afin d'examiner la capacité des IgIV à inhiber la transformation des cellules mononucléées de sang de cordon par le VEB, nous avons traité 1×10^6 cellules avec le mélange IgIV : virus B95-8 ou le virus B95-8 tout seul (comme décrit précédemment à la section 2.2.4). Le titre viral de B95-8 utilisé est de 3.15×10^5 UI/ml). Après 1 heure d'incubation à 37°C, les cellules ont été centrifugées à 10,000g pendant 5 minutes à la température ambiante et lavées une fois avec le PBS. Le culot cellulaire a été remis en suspension dans le milieu de culture et 10^5 cellules ont été déposées par puits dans un volume final de 200 µl dans des plaques de 96 puits (Ultident, St. Laurent, Qc). Les plaques ont été incubées à 37°C avec 5% de CO₂. Le milieu de culture a été remplacé à une fréquence de deux fois par semaine. Après 4 semaines de culture, les puits avec les cellules transformées ont été dénombrés en observant au microscope la formation d'amas cellulaires. Ces derniers sont caractéristiques d'une prolifération cellulaire active. Ensuite, le pourcentage de neutralisation a été déterminé comme suit :

*% neutralisation = (nombre de puits avec amas cellulaires / nombre total de puits) * facteur de dilution * 100.* Et les titres neutralisants à 50% ont été rapportés.

2.2.6 Source des IgIV

Dans le cadre de cette étude, 36 lots de cinq préparations commerciales d'IgIV ont été analysés. Ces préparations sont : IgIVnex, Gamunex (Talecris Biotherapeutics Ltd, Mississauga, Ontario, Canada), Gammagard liquide, Gammagard S/D (Baxter Healthcare Corporation, Mississauga, Ontario, Canada) et Privigen (CSL Behring Canada Inc., Ottawa). Ces préparations sont concentrées à 100 mg/ml et nous ont été fournies par Dr. Pierre Teira de la division d'hémo-oncologie de l'Hôpital Sainte-Justine.

2.2.7 Sérologie pour le virus Epstein-Barr dans les 36 préparations commerciales d'IgIV

Les anticorps contre la capsid virale (VCA) et la glycoprotéine majeure de l'enveloppe virale (gp350) ont été déterminés par immunofluorescence indirecte. Pour cela, environ 50,000 cellules par puits ont été étalées sur les lames. Les cellules CEM (lignées de cellules T humaines issues d'un cas de leucémie lymphoblastique aiguë) transfectées avec le gène codant la gp350 ont été utilisées pour la détection des anticorps anti-gp350 et la lignée B95-8 pour la détection des anticorps anti-VCA. Après avoir séché les cellules à l'air libre, elles ont été fixées au méthanol et à l'acétone respectivement pendant 10 minutes à - 20°C. Ceci a été suivi de 40 minutes de blocage à la température ambiante avec le PBS contenant 5% de FBS. Après un lavage (dans le PBS) de 5 minutes avec agitation (à 100 rpm) à la température ambiante, les cellules ont été incubées avec les IgIV diluées (1/20, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600 et

1/3200) dans le PBS ou le contrôle positif (sérum VEB positif) ou le contrôle négatif (sérum VEB négatif) pendant 40 minutes à la température ambiante. Les lames ont ensuite été lavées trois fois comme précédemment. L'anticorps secondaire de chèvre anti-IgG humain couplé au FITC a été ajouté pendant 40 minutes à la température ambiante et à l'abri de la lumière. Après trois autres lavages, les lames ont été recouvertes de glycérol dilué dans du PBS (1:1) et d'une lamelle pour l'observation au microscope à fluorescence.

2.2.8 Les titres anti-gp350 par ELISA dans les 36 préparations commerciales d'IgIV

Nous avons quantifié les titres des anticorps anti-gp350 contenus dans les IgIV à l'aide d'un test immuno-enzymatique ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay). Pour cela, 1×10^5 cellules CEM ou CEM exprimant la gp350 dans un volume de 40 μ l de PBS, ont été déposées par puits dans des plaques de 96 puits (Ultident, St. Laurent, Qc). Les puits ont été ensuite séchés sous vide et les cellules ont été fixées avec du méthanol froid. Après trois lavages avec du PBS, les puits ont été bloqués avec 1% de BSA (Sigma-Aldrich) et incubés 2 heures avec 100 μ l d'IgIV ou de 72A1 (anti-gp350, contrôle positif) [273, 274] ou de S12 (anti-LMP1, contrôle de réactivité non spécifique ou bruit de fond) [310]. Ensuite les puits ont été lavés 5 fois avec du PBS et les anticorps monoclonaux anti-gp350 contenus dans les IgIV ont été détectés en ajoutant l'anticorps de chèvre antihumain conjugué à la biotine (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) [311]. Les puits incubés avec les contrôles positif (72A1) et de réactivité non spécifique (S12) ont été détectés avec l'anticorps de chèvre anti-souris conjugué à la biotine (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA). Après 2 heures d'incubation, les puits ont été lavés 6 fois avec du PBS. Ils

ont ensuite été incubés avec la streptavidine conjuguée à la peroxydase (Jackson ImmunoResearch laboratories, West Grove, PA) et le substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (Bioshop, Burlington ON) jusqu'au développement de couleur (environ 5 à 10 minutes). La réaction enzymatique a été arrêtée en ajoutant du HCl (2N) et la lecture a été faite à 450 nm (nanomètres) avec une référence à 570 nm.

En ce qui concerne la courbe standard, elle a été produite à partir d'une série de dilution des préparations d'IgIV (0, 5, 10, 50, 100, 500 et 1000 pg/ml). Chacune de ces concentrations d'IgIV a été fixée en duplicata dans la plaque de 96 puits. Les anticorps IgG ont été détectés comme décrit dans le paragraphe précédent.

2.3 Le test ELISpot pour étudier la réponse des cellules T contre les antigènes lytique et latent du virus d'Epstein-Barr

Le test ELISpot (Enzyme-Linked ImmunoSpot) est une technique immuno-enzymatique qui permet d'étudier l'état d'activation des cellules immunitaires et de les quantifier à partir des cytokines qu'elles sécrètent suite à leur stimulation avec des antigènes spécifiques [312]. Pour répondre à cet objectif, nous avons évalué la production de l'IFN- γ par les lymphocytes T des patients greffés. Ainsi, une cohorte de patients a été recrutée par le service d'hémo-oncologie de l'hôpital Sainte-Justine. Et leurs cellules mononucléées du sang périphérique ont été isolées et mises en culture en présence des peptides lytique et latent du VEB pour déterminer le nombre de cellules T sécrétant l'IFN- γ .

2.3.1 Cohorte d'étude

Un nombre total de 20 enfants destinés à recevoir une greffe de moelle osseuse ou de sang de cordon, a été recruté de 2007 à 2012. Nous précisons que cette cohorte est différente de la cohorte précédente de 49 patients. Parmi ces 20 patients, neuf ont été exclus de l'étude : cinq ont fait une rechute, deux n'ont pas complété l'étude et deux sont décédés tôt après la greffe. Au final la cohorte se résume à 11 patients. Ils ont été sélectionnés en fonction de l'expression du HLA-A2, B7 ou B8 par le donneur. Car les peptides du VEB à analyser sont restreints à l'un de ces HLA. La sérologie VEB du donneur pour la greffe de moelle osseuse a été déterminée ainsi que celle du receveur de greffe. La sévérité du traitement immunosuppresseur varie selon le diagnostic du patient et le type de greffe. Par exemple, les patients qui sont sujets à une greffe non apparentée ont reçu, en plus du régime de conditionnement, de l'ATG (Anti-Thymocyte Globulin) en guise de traitement prophylactique contre la GvHD. Afin de prévenir les infections opportunistes, tous les patients ont été traités avec des antiviraux et/ou des IgIV (500 mg/kg/dose). Les IgIV ont été administrés à partir de 3 jours avant la greffe en raison d'une fois par semaine jusqu'à 3 mois après la greffe. Ensuite, la dose a été passée à une fois par mois jusqu'à 9 mois post-greffe. Ce protocole fait référence au traitement clinique approuvé par les médecins de la division d'hémo-oncologie du CHU Sainte-Justine.

2.3.2 Isolement des cellules mononucléées du sang périphérique

Le sang périphérique (6 à 12 ml) des patients a été prélevé dans des tubes héparinés à des périodes bien précises après la greffe. Ces périodes sont les suivantes : 2, 3, 6, 9 et 12 mois après la greffe. Le plasma a été séparé du sang total par centrifugation à 2500 rpm durant 10 minutes à la température ambiante et conservé à -80°C. Le reste de sang a été ensuite dilué

dans le milieu RPMI 1640 (Invitrogen) et mis sur Ficoll-Paque (GE Healthcare Life Sciences). Après 20 minutes de centrifugation à 3000 rpm à la température ambiante, l'anneau de cellules mononucléées formé par gradient de densité a été récolté dans un tube conique de 15 ml. Ceci a été suivi de trois lavages avec le RPMI 1640 à 1200 rpm pendant 10 minutes à la température ambiante. Le culot cellulaire qui en résulte a été remis en suspension dans 1 à 5 ml de milieu RPMI selon sa grosseur. Suite au décompte cellulaire, environ 5×10^6 cellules ont été concentrées dans 1 ml de milieu de congélation froid CryoStor CS10 (BioLife solutions) dans un tube à congélation stérile. Après 10 minutes d'incubation à 4°C, les cellules ont été congelées à -80°C.

2.3.3 Antigènes lytique et latent du virus Epstein-Barr

Nous avons utilisé des peptides qui sont bien caractérisés dans la littérature [313-315]. Il s'agit d'un peptide sur la protéine BMLF1 et de deux peptides sur la protéine nucléaire EBNA3A. Ils ont été fabriqués par la compagnie Sigma Aldrich (3050 Spruce St., St. Louis, MO 63103) et livrés sous la forme lyophilisée. Ils ont été solubilisés selon les recommandations de la compagnie à une concentration finale de 2mM. Chaque peptide a été aliquoté dans des tubes stériles en fonction du volume requis par expérience afin d'éviter la congélation et la décongélation répétées. L'ensemble des aliquots a été conservé à -20°C.

Le peptide BMLF1 (GLCTLVAML) est restreint au HLA-A2 [313]. Quant aux deux peptides EBNA3A, l'un (EBNA3A₃₂₅₋₃₃₃, FLRGRAYGL) est restreint au HLA-B8 [314] et le second (EBNA-3A₃₇₉₋₃₈₇, RPPIFIRRL) au HLA-B7 [315]. Sachant que tous les patients sont négatifs pour le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), on a choisi le peptide RIGPGRAFVTIG (restreint au HLA-A2) situé sur la protéine de l'enveloppe du VIH

(VIHenv) comme contrôle de la réponse non spécifique [314]. Celui-ci a aussi été dilué à une concentration de 2mM et conservé à -20°C.

2.3.4 Test ELISpot pour la production d'IFN- γ

Les cellules mononucléées ont d'abord été décongelées comme suit. Dans un bain-marie à 37°C les tubes de cellules ont été soumis à une légère agitation (mouvement circulaire) pendant environ 3 minutes pour les ramener autour de 4°C. Elles ont ensuite été transférées dans un tube conique de 15 ml où 5 ml de milieu de décongélation (RPMI 1640 contenant 20% de FBS plus 0.1% de benzonase nucléase) ont été rajoutés doucement (goutte à goutte) aux cellules afin de diluer la solution de congélation. La benzonase est une DNase qui dégrade toutes les formes d'ARN et d'ADN permettant ainsi de détruire les agrégats cellulaires qui sont une source de spots non spécifiques [312]. Le tout a été ensuite centrifugé à 1200 rpm 10 minutes à la température ambiante. Le culot cellulaire résultant a été lavé deux fois avec 10 ml de milieu de décongélation à 1200 rpm 10 minutes à la température ambiante. Les cellules ont été remises en suspension dans 2 ml de milieu de culture (RPMI + glutamine, 10% de FBS et 100 U/ml de pénicilline-streptomycine) et transférées dans un flacon T-25. Elles ont ensuite été incubées à 37°C avec 5% de CO₂ jusqu'au lendemain. Ceci permet de se débarrasser des cellules fragiles qui sont en apoptose et d'avoir une bonne estimation de la viabilité cellulaire suite au décompte avant de mettre les cellules dans les puits de la plaque pour ELISpot [312].

Au jour 2, tous les milieux (de culture et de lavage) ainsi que la plaque à ELISpot (fournie dans le kit ELISpot, Mabtech) ont été ramenés à la température ambiante. Les cellules ont été transférées dans un tube conique de 15 ml et centrifugées à 1200 rpm 10 minutes à la température ambiante. Le culot cellulaire a été lavé une fois avec 10 ml de milieu de lavage

comme décrit précédemment. Selon la grosseur du culot, les cellules ont été diluées dans 1 à 5 ml de milieu de culture (Marrow Max contenant 100 U/ml de pénicilline-streptomycine). Le milieu Marrow Max (Gibco Invitrogen Corporation) est un milieu enrichi destiné entre autre à la culture à court terme de cellules hématopoïétiques.

Le décompte cellulaire a été fait en raison de 10 μ l de cellules dans 90 μ l de bleu de trypan. La concentration finale de cellules a été ajustée à 2×10^5 cellules par 100 μ l de suspension cellulaire. Avant de répartir les cellules dans les puits, la plaque de 96 puits a été lavée cinq fois avec 200 μ l de PBS et bloquée pendant 30 à 60 minutes avec 200 μ l de milieu de blocage (milieu Marrow Max contenant 10% de FBS). Après avoir vidé le milieu de blocage, 100 μ l de suspension cellulaire (soient 2×10^5 cellules) ont été déposés dans chaque puits, sauf dans les deux derniers (destinés au milieu de culture uniquement en guise de contrôle pour le bruit de fond). Ensuite 50 μ l de chaque peptide dilué dans du PBS ont été ajoutés dans le puits correspondant en duplicata pour une concentration finale de 0.5 μ M (pour les peptides BMLF-1, EBNA3A₃₇₉₋₃₈₇ et VIHenv) et 1 μ M (pour le peptide EBNA3A₃₂₅₋₃₃₃). Quant aux contrôles négatif et positif, 50 μ l de PBS et 50 μ l d'anti-CD3 (fourni dans le kit ELISpot, Mabtech) ont été ajoutés aussi en duplicata respectivement dans les puits correspondants. La plaque a été refermée et enrobée dans du papier aluminium. Le tout a été incubé à 37°C avec 5% de CO₂ pendant 24 heures.

Au jour 3, les cellules ont été jetées et les puits ont été lavés cinq fois avec 200 μ l de PBS par puits. Ensuite 100 μ l d'anticorps secondaire conjugué à la phosphatase alcaline (fourni dans le kit ELISpot, Mabtech) ont été ajoutés à chaque puits. Après 2 heures d'incubation à la température ambiante, les puits ont été vidés et lavés cinq fois comme précédemment. Après le dernier lavage, le substrat BCIP/NBT-plus (fourni dans le

kit ELISpot, Mabtech) a été filtré avec un filtre de 0.45 µm et ajouté à chaque puits en raison de 100 µl chacun. La plaque a ensuite été incubée à l'abri de la lumière jusqu'à développement des spots pour un maximum de 15 minutes. Pour finir, la plaque a été abondamment lavée à l'eau du robinet et séchée toute la nuit à l'air libre à l'abri de la lumière. Les spots ont été comptés à l'aide d'un lecteur automatique (immunospot C.T.L analyser, version 5.0, Cellular Technology Ltd). Les résultats ont été exprimés en nombre de cellules formant des spots (ou SFC, spot forming cells) par million de cellules (SFC/10⁶ cellules). L'analyse de la réponse spécifique anti-BMLF1 et anti-EBNA3A a été effectuée avec le "Wilcoxon signed-rank test".

2.4 Charge virale du VEB dans le sang périphérique des patients

La charge virale a été déterminée dans le sang total par le laboratoire de diagnostic du CHU Sainte-Justine. Les cliniciens considèrent qu'à partir de 3000 copies par ml de sang, l'infection par le VEB peut rapidement évoluer vers la MLP. Ainsi, ils administrent aux patients le rituximab en guise de prévention. Ceci fait référence au traitement clinique approuvé par les médecins de la division d'hémo-oncologie du CHU Sainte-Justine. Les études de corrélation ont été faites à l'aide de la corrélation de Spearman où le r est significatif quand le $P < 0.05$.

2.5 Outils d'analyses des données

Les calculs sur l'ensemble des résultats ont été effectués à partir du logiciel Excel. Les analyses statistiques et les figures ont été réalisées à l'aide de GraphPad prism 5. L'analyse par régression logistique a été réalisée avec l'aide du Dre. Helen Trottier à partir du logiciel STATA. Cette analyse permet d'écarter les facteurs confondants sur l'efficacité des IgIV chez les greffés de sang de cordon ou de moelle osseuse dans la prévention de l'infection par le

VEB. Ainsi, pour contrôler les facteurs de confusion, nous avons utilisé 10% de changement dans la méthode d'estimation pour les variables suivantes : l'âge des patients au moment de la greffe (linéaire) et le traitement avec l'ATG (traité, non traité). L'infection par le VEB (oui ou non) est définie comme variable dépendante et le traitement avec les IgIV (oui ou non), est défini comme variable indépendante. L'infection par le VEB fait référence à toute charge virale détectable.

CHAPITRE III : RÉSULTATS

3.1 Les IgIV ne protègent pas efficacement les enfants greffés de cellules souches hématopoïétiques contre l'infection par le virus Epstein-Barr

Dans cette étude, nous avons voulu savoir si les enfants greffés de cellules souches hématopoïétiques qui sont traités avec les IgIV sont protégés contre la réactivation du VEB ou son infection. Ainsi, nous avons analysé les dossiers cliniques de 49 patients pédiatriques qui furent VEB séropositifs avant la greffe. Ces enfants ont tous reçu une greffe de sang de cordon ou de moelle osseuse séronégative pour le VEB. Parmi les patients (n = 37) traités avec les IgIV, 32 patients ont reçu une greffe non apparentée (dont 31 sangs de cordon et une moelle) et les cinq autres ont reçu une greffe de moelle osseuse apparentée. Ces 32 greffés, plus deux des cinq patients ayant reçu une greffe de moelle osseuse apparentée (n = 34), ont été traités avec de l'ATG (anti-thymocyte globuline) en guise de prophylaxie contre la GvHD. Parmi le groupe non traité avec les IgIV (n = 12), 10 patients ont eu une greffe de moelle osseuse apparentée. Seulement deux patients non traités avec les IgIV (ayant reçu une greffe de sang de cordon non apparentée) ont eu de l'ATG. Ces patients ont tous reçu des antiviraux pendant et après la greffe. Les détails concernant leurs données ont été investigués à partir de leurs dossiers cliniques et sont résumés dans le tableau III ci-après.

Tableau III : Caractéristiques cliniques des 49 patients VEB séropositifs avant la greffe avec un donneur VEB séronégatif. VP16 = étoposide, ICT = irradiation corporelle totale, GvHD = graft versus host disease, ATG = anti-thymocyte globuline, M = masculin, F = féminin; IgIV+ = patients traités avec les IgIV; IgIV- = patients non traités avec les IgIV; IgIV = immunoglobulines intraveineuses; S.O = sans objet.

Caractéristiques	IgIV+	IgIV-
Âge (ans), Moyenne ± Écart type	8.67 ± 5.47	9.98 ± 5.51
Sexe	21 M et 16 F	5 M et 7 F
Types de greffe, n (%)		
Cordon non apparenté	31 (83.78)	2 (16.67)
Moelle non apparentée	1 (2.70)	S.O
Moelle apparentée	5 (13.51)	10 (83.33)
Conditionnement, n (%)		
ICT, VP16 et cyclophosphamide	14 (37.84)	8 (66.67)
busulfan et cyclophosphamide	14 (37.84)	4 (33.33)
ICT et cyclophosphamide	5 (13.51)	S.O
busulfan, VP16 et cyclophosphamide	3 (8.11)	S.O
busulfan et melfalan	1 (2.70)	S.O
Prophylaxie GvHD, n (%)		
ATG, cyclosporine et corticoïdes	23 (62.16)	2 (16.67)
ATG, cyclosporine, corticoïdes et tacrolimus	2 (5.41)	S.O
ATG et cyclosporine	4 (10.81)	S.O

ATG, cyclosporine et méthotrexate	3 (8.11)	S.O
ATG, cyclosporine, méthotrexate et stéroïdes	1 (2.70)	S.O
Cyclosporine et méthotrexate	2 (5.41)	5 (41.67)
Cyclosporine et tacrolimus	1 (2.70)	S.O
ATG et méthotrexate	1(2.70)	S.O
Cyclosporine	S.O	3 (25)
Cyclosporine, méthotrexate et corticoïdes	S.O	1 (8.33)
rien reçu	S.O	1 (8.33)
Infection CMV, n (%)		
Positive	9 (24.32)	1 (8.33)
Negative	27 (72.97)	9 (75)
pas d'infos	1(2.70)	2 (16.67)
Traitement avec les antiviraux, n (%)		
Acyclovir	34 (91.89)	10 (83.33)
Ganciclovir	8 (21.62)	1 (8.33)
Foscarnet	9 (24.32)	S.O
pas d'infos	S.O	1 (8.33)
Traitement préemptif contre la MLP		
Rituximab	4 (10.81)	S.O
Survie		
Vivants	28 (75.66)	10 (83.33)
Décédés	9 (24.32)	2 (16.67)

Les analyses par rapport au traitement avec les IgIV montrent que dans le groupe traité avec les IgIV, 18 patients (48.65%) ont une qPCR positive pour le VEB après la greffe. Parmi ces derniers, quatre patients (10.81%) ont fait une MLP (Figure 3.1). Chez les greffés non traités avec les IgIV, trois patients (25%) ont une qPCR VEB positive post-greffe sans MLP (Figure 3.1). Ces données indiquent que l'infection par le VEB ne semble pas être associée au traitement avec les IgIV.

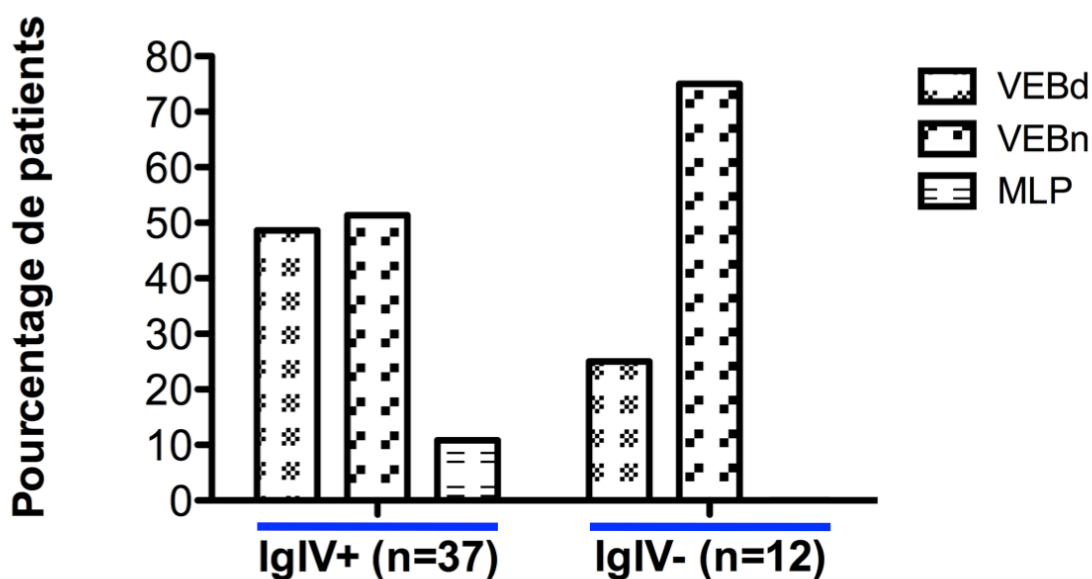


Figure 3.1: Effets des IgIV sur l'infection par le VEB dans une cohorte de 49 enfants greffés de sang de cordon ou de moelle osseuse. Tous les patients sont VEB séropositifs avant la greffe et le donneur est VEB séronégatif. Ils ont tous eu un conditionnement myéloablatif. La cohorte comprend un groupe traité avec les IgIV (n = 37) et un groupe non traité (n = 12). VEBd = VEB détectable dans le sang par PCR quantitative, VEBn = VEB non-détectable dans le sang par PCR quantitative.

Par ailleurs, on sait que l'ATG et l'âge sont des facteurs à haut risque pour l'infection au VEB. Ainsi, nous avons effectué une analyse de régression logistique afin d'écartier la confusion apportée par ces variables sur l'infection par le VEB. Dans notre cas, lorsque le rapport des cotes ou OR (odds ratio) calculé est changé de $\pm 10\%$ par les variables, ATG (traité, non traité) ou l'âge des patients au moment de la greffe, elles sont confondantes. Dans ce cas, nous considérons la valeur ajustée du OR. Car cette dernière est déterminée en contrôlant les variables de confusion. Ainsi, si cette valeur est supérieure à 1, cela indique que les IgIV ne protègent pas contre l'infection par le VEB. Mais, si elle est inférieure à 1, cela signifie que les IgIV ont un effet protecteur contre le VEB. Comme représenté dans le tableau IV ci-dessous, après avoir contrôlé des variables confondantes (l'ATG et l'âge), la valeur ajustée du OR est égale à 1.23 avec un intervalle de confiance à 95% de 0.14-10.66. Ces résultats confirment que les IgIV n'ont aucun effet protecteur contre l'infection par le VEB chez les greffés de sang de cordon ou de moelle osseuse.

Tableau IV: Détermination des rapports de cotes ou ORs (odds ratios) pour l'association entre l'infection par le VEB et le traitement avec les IgIV.

Infection VEB	OR brute IC 95%	OR ajusté IC 95%
Traitement IgIV	2.84 (0.66-12.20)	1.23 (0.14-10.66)

Sachant que les cliniciens administrent aux patients le rituximab en guise de traitement préemptif contre la MLP lorsque la charge virale atteint 3000 copies/ml, nous avons utilisé cette valeur comme référence pour évaluer la charge virale chez les patients VEB positifs

après la greffe. Parmi les 18 patients traités avec les IgIV et présentant une charge virale, cinq (13.51%) font l'évidence d'une charge virale élevée (≥ 3000 copies/ml) durant les 12 premiers mois post-greffe (Tableau V). Quant aux trois patients non traités avec les IgIV et qui ont une qPCR positive pour le VEB après la greffe, seulement un parmi eux (8.33%) montre une charge virale élevée (≥ 3000 copies/ml).

Tableau V : Charge virale du VEB dans le sang périphérique des patients traités (18/37) et non traités (3/12) avec les IgIV.

Charge virale VEB	IgIV+	IgIV-
≥ 3000 copies/ml (persistant durant 1 an post-greffe), n (%)	5 (13.51)	1 (8.33)
< 3000 copies/ml (persistant durant 1 an post-greffe), n (%)	3 (8.10)	N/A
Détectable (non persistante), n (%)	10 (27.02)	2 (16.67)

On sait que les IgIV sont administrées avant (jour moins 3) et après la greffe (jusqu'à 9 mois). De ce fait, nous avons voulu déterminer à partir de quelle période après la greffe le VEB devient détectable par PCR quantitative chez les patients virémiques. Nous observons que la plupart des patients sont VEB positifs dès les premiers mois post-greffe (0 à 6 mois) dont 33% des greffés sont déjà VEB positifs à 1 mois post-greffe (Figure 3.2). De plus, les quatre cas de MLP enregistrés chez les patients traités avec les IgIV ont été diagnostiqués à 1 mois post-greffe (les patients A8 et A11), à 5 mois post-greffe (le patient A5) et à 6 mois post-greffe (le patient A9) (Figure 3.2).

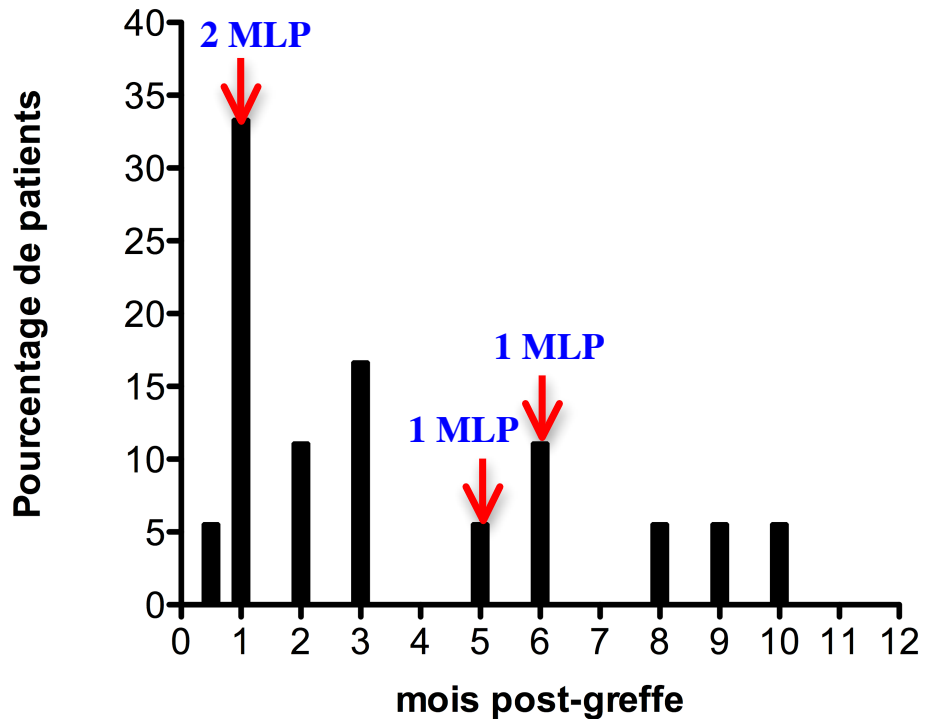


Figure 3.2: Début de détection du VEB par qPCR dans le sang périphérique des patients traités avec les IgIV ainsi que la période de diagnostic de la MLP. Les patients (n =18) sont VEB virémiques après la greffe malgré le fait qu'ils aient reçu les IgIV en guise de traitement prophylactique général contre les infections. 2MLP à 1 mois post-greffe (patients A8 et A11), 1 MLP à 5 mois post-greffe (patient A3) et 1 MLP à 6 mois post-greffe (patient A9). Voir la description des patients en annexes.

Le rapport d'anatomo-pathologie montre que chez le patient A3, l'analyse d'une biopsie hépatique (post-greffe) a permis de confirmer le syndrome lymphoprolifératif post-transplantation (ou MLP) en partie polymorphe et en partie monomorphe (aspect de lymphome diffus à grandes cellules B) associé à la présence du VEB. Chez le patient A11, l'examen histologique des nodules pulmonaires a révélé une infiltration tumorale composée de

lymphocytes de taille variable et des cellules de plus grande taille parmi lesquelles des cellules positives au marquage avec l'anticorps anti-VEB ont été identifiées. Le patient A8 a fait une MLP de type polymorphe qui a été diagnostiqué à l'autopsie (à 1 mois post-greffe). Pour le patient A9, l'information n'était pas disponible. Cependant leurs rapports d'anatomopathologie n'étaient pas disponibles. On remarque que les 4 patients qui ont développé la MLP sont féminins. Ce qui suscite la question à savoir si le sexe pourrait être un facteur de prédisposition à développer la MLP suite à la réactivation du VEB ? Il serait intéressant d'adresser cette question dans une cohorte d'étude plus large. Par ailleurs, les patients A8 et A11 font une MLP précoce (1 mois post-greffe) comparativement aux patients A3 et A9 qui ont développé la MLP moyen précocement (5 et 6 mois post-greffe). On sait que les patients A8 et A11 (3 et 8 ans respectivement) sont plus jeunes que les patients A3 et A9 (9 et 10 ans respectivement). De plus, ces derniers ont reçu dans leur régime de conditionnement du busulfan avec de la cyclophosphamide contrairement aux patients A8 et A11 qui, en plus de la cyclophosphamide ont reçu une irradiation corporelle totale et du VP16 (voir la description des patients dans les annexes). Ces facteurs pourraient expliquer leur MLP précoce à 1 mois post-greffe.

L'ensemble de ces résultats démontre que le traitement avec les IgIV ne protège pas adéquatement les patients contre l'infection par le VEB suite à sa réactivation. Nous précisons aussi que les trois patients non traités avec les IgIV sont VEB positifs à 1 et 2 mois post-greffe. Nous avons par ailleurs voulu évaluer la capacité des IgIV à neutraliser l'infection par le VEB *in vitro*, tel démontré dans les données suivantes.

3.2 Les IgIV sont capables de neutraliser l'infection par le VEB *in vitro*

Dans le but de mieux comprendre pourquoi les IgIV ne protègent pas efficacement les patients contre le VEB, nous avons mesuré leur teneur en anticorps anti-gp350 et anti-VCA à partir de 36 différents lots d'IgIV. Ce sont des préparations commerciales d'immunoglobuline humaine intraveineuse à 10% et proviennent de trois compagnies différentes (Baxter, Talecris et CSL Behring) (Tableau VI). Les IgIV (IGIVnex et gamunex) fournies par Talecris sont préparées à partir d'un procédé utilisant le caprylate et la chromatographie. L'IgIV (Gammagard) produite par Baxter est traitée par solvant-détergent et stabilisée avec 22.5 mg/ml de glycine, 20 mg/ml de glucose et 3 mg/ml d'albumine humaine. Quant à l'IgIV (Privigen) générée par CSL Behring, elle contient 10g d'immunoglobuline humaine intraveineuse et 250 mmol/L de L-Proline.

Tableau VI : Les 36 différents lots d'IgIV produits par les 3 compagnies (Talecris, Baxter et CSL Behring).

No	Lots	Date d'expiration	Concentration d'Ig	IgIV (Source)
1	26NJHV1	16 janvier 2014	10 g dans 100 ml	IGIVnex (Talecris)
2	26NJRC1	18 mars 2014	20 g dans 200 ml	
3	26NKX21	23 juin 2014	20 g dans 020 ml	
4	26NJTH1	5 avril 2014	10 g dans 100 ml	
5	26NJKC1	5 février 2014	5 g dans 50 ml	

6	26NHHR2	19 avril 2013	2.5 g dans 25 ml	Gamunex (Talecris)	
7	26NHHR3	19 avril 2013	2.5 g dans 25 ml		
8	26NKX61	26 juin 2014	5 g dans 50 ml		
9	26NJNO2	26 février 2014	5 g dans 50 ml		
10	26NK3R2	13 août 2014	5 g dans 50 ml		
11	26NHHR6	19 avril 2013	2.5 g dans 25 ml		
12	26NK3G1	22 octobre 2014	5 g dans 50 ml		
13	26NKGR1	12 novembre 2014	20 g dans 200 ml		
14	LE12K205AE	13 août 2013	5 g dans 50 ml		Gammagard (Baxter)
15	LE12L147AB	28 septembre 2011	20 g dans 200 ml		
16	LE12L083AB	11 mars 2014	5 g dans 50 ml		
17	LE08L029AC	13 octobre 2013	5 g dans 50 ml		
18	LE08L012AD	29 mars 2013	5 g dans 50 ml		
19	LE12L116AB	1 avril 2014	20 g dans 200ml		
20	LE12L250AB	9 juillet 2014	5 g dans 50 ml		
21	LE12K200AB	8 juillet 2013	10 g dans 100 ml		
22	LE12K177AB	24 juin 2013	10 g dans 100 ml		
23	LE12L149AD	26 avril 2014	5 g dans 50 ml		

24	LE12L187AB	30 mai 2014	10 g dans 100 ml	Privigen (CSL Behring)
25	LE12L311AD	17 septembre 2014	20 g dans 200 ml	
26	LE12L322AB	26 septembre 2014	5 g dans 50 ml	
27	LE12L254AB	11 juillet 2014	20 g dans 200 ml	
28	4336400012	Novembre 2013	10 g dans 100 ml	
29	4336300008	Décembre 2013	5 g dans 50 ml	
30	4353100019	Janvier 2014	20 g dans 200 ml	
31	4353100023	Avril 2014	20 g dans 200 ml	
32	4353100024	Juin 2014	20 g dans 200 ml	
33	4353100021	Janvier 2014	20 g dans 200 ml	
34	4336300009	Mai 2014	5 g dans 50 ml	
35	4353100026	Août 2014	20 g dans 200 ml	
36	4353100028	Septembre 2014	20 g dans 200 ml	

Pour déterminer les titres des anticorps, nous avons établi une série de dilution des différents lots d'IgIV. La valeur du titre rapporté correspond au dénominateur de la dilution. Les résultats montrent que les titres anti-gp350 contenus dans les lots d'IgIV des trois compagnies ont une médiane de 200 (Tableau VII). Les titres d'anticorps contre la capsid virale (VCA), normalement vus comme indice de la puissance de la réponse humorale anti-

VEB, ont une médiane de 1600 dans les lots provenant de Baxter et Talecris et une médiane de 800 dans les lots fournis par CSL Behring (Tableau VIII).

Tableau VII : Les titres anti-gp350 dans 36 différents lots d'IgIV déterminés par immunofluorescence à partir des lignées CEM transfectées avec le gène viral codant la gp350.

IgIV	Source (n)	Moyenne	SD_{moyenne}	Médiane	25^{ème} percentile	75^{ème} percentile
Gammagard	Baxter (14)	171	83	200	100	200
Gamunex, Talecris	Talecris (13)	200	123	200	100	300
Privigen	CSL Behring (9)	178	44	200	150	200

Tableau VIII : Les titres anti-VCA dans 36 différents lots d'IgIV déterminés par immunofluorescence à partir de la lignée cellulaire B95-8.

IgIV	Source (n)	Moyenne	SD_{moyenne}	Médiane	25^{ème} percentile	75^{ème} percentile
Gammagard	Baxter (14)	1314	398	1600	800	1600
Gamunex, Talecris	Talecris (13)	1215	532	1600	800	1600
Privigen	CSL Behring (9)	911	558	800	400	1600

Puisque les titres anti-VEB rapportés dans la littérature font référence aux titres anti-VCA, nous avons comparé nos résultats à ceux déjà publiés. Nous avons remarqué une élévation des titres anti-VCA et leur similarité avec ceux rapportés par d'autres études [263, 316]. Cependant, la corrélation de ces titres à l'activité neutralisante n'avait pas été effectuée. Sachant que la neutralisation du VEB est associée à la protéine de son enveloppe virale (gp350), nous avons déterminé les titres anti-gp350 neutralisants afin d'évaluer le pouvoir neutralisant des préparations d'IgIV (Figure 3.3).

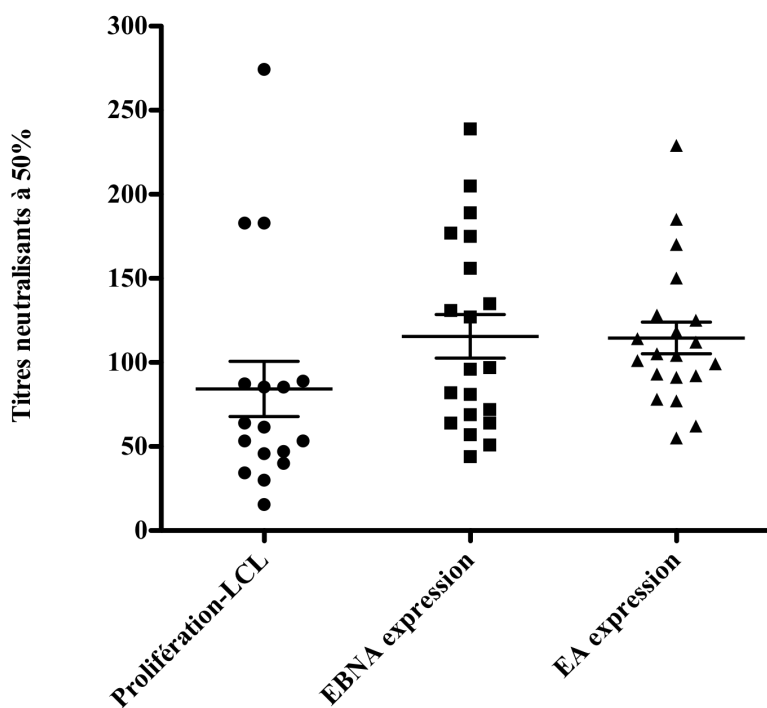


Figure 3.3 : Les titres anti-VEB neutralisants à 50% (TN 50%) contenus dans les préparations commerciales d'IgIV. Le long trait central indique la moyenne. Les deux petits traits (parallèles à la moyenne) indiquent les limites supérieure et inférieure de l'erreur type sur la moyenne ou SEM (Standard Error of the Mean). Les expériences sur l'induction des EA et EBNA ont été testées dans 20 lots d'IgIV

versus 17 lots pour les expériences sur la transformation cellulaire (prolifération-LCL, Lignées Cellulaires Lymphoblastoïdes formées).

Les titres neutralisant à 50% l'induction des EA et des EBNA dans les lignées Raji et Bjab infectées par le VEB ont une moyenne de 114 et 116 ainsi qu'une médiane de 105 et 97 respectivement. Quant aux titres neutralisant à 50% la transformation des cellules mononucléées de sang de cordon par le VEB, leur moyenne est de 84 et leur médiane de 62. Les titres neutralisants obtenus à partir de ces trois modèles d'infection indiquent que les IgIV sont capables d'inhiber l'infection par le VEB *in vitro*.

Par ailleurs, les lots commerciaux d'IgIV sont préparés avec une concentration standard exprimée en quantité d'immunoglobuline par ml (soit 100 mg/ml). Nous avons déterminé par ELISA la concentration (pg/ml) en anticorps anti-gp350 qui sont contenus dans les IgIV. Nos résultats montrent que les niveaux d'anti-gp350 sont relativement faibles, soit une médiane de 0.730 pg/ml (Tableau IX). Ces titres sont corrélés positivement ($P = 0.0014$) avec les titres neutralisant l'expression des EBNA (Figure 3.4), soit $R^2 = 0.462$.

Tableau IX : Concentrations en pg/ml d'anti-gp350 contenus dans les 36 préparations commerciales d'IgIV.

Moyenne	SD_{moyenne}	Médiane	25^{ème} percentile	75^{ème} percentile
0.673	0.276	0.730	0.510	0.890

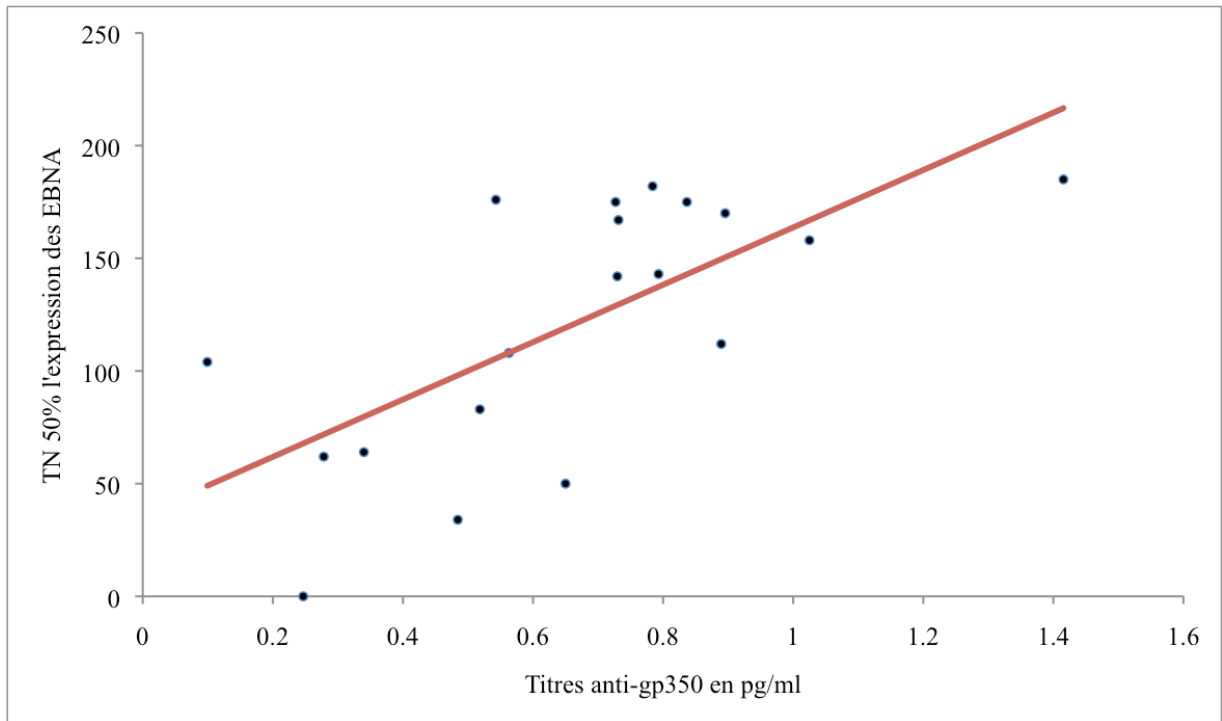


Figure 3.4 : La corrélation entre les titres neutralisant à 50% l'induction des EBNA et les titres anti-gp350 (pg/ml) déterminés par ELISA est positive.

Nos résultats montrent clairement que les IgIV sont capables de neutraliser l'infection par le VEB *in vitro*, contrairement à *in vivo*. Ainsi, nous avons voulu vérifier s'il y a une différence dans la cinétique de recouvrement des cellules immunitaires, entre les patients qui sont VEB positifs après greffe et ceux qui sont VEB négatifs.

3.3 Cinétique de reconstitution du système immunitaire des patients durant les 12 mois après la greffe de cellules souches hématopoïétiques

Il est connu que le VEB infecte principalement les lymphocytes B. L'activité cytotoxique des cellules NK et des cellules T est importante dans les réponses immunes innée et adaptative contre le VEB. Après une greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques, le recouvrement des cellules NK est rapide (1 à 2 mois après la greffe) contrairement aux lymphocytes T, dont le recouvrement débute à partir de 9 mois après la greffe. Quant aux cellules B, leur recouvrement se produit à 6 mois post-greffe. Sachant que les 49 patients de notre cohorte ont reçu une greffe de sang de cordon ou de moelle osseuse, nous avons voulu vérifier s'il y a une différence dans le recouvrement de leurs cellules immunitaires. Ainsi, nous avons réparti les patients en deux groupes : **1-** les patients ayant réactivé l'infection au VEB (n = 21) tel que démontré par une analyse qPCR positive après la greffe, et **2-** ceux qui n'ont pas réactivé l'infection (n = 28). Pour les patients inclus dans ces groupes, le nombre de cellules **NK** (Figure 3.5), de cellules **B** (Figure 3.6), de cellules **T CD4** (Figure 3.7) et de cellules **T CD8** (Figure 3.8) dans le sang périphérique a été déterminé à différentes périodes durant les 12 mois après la greffe.

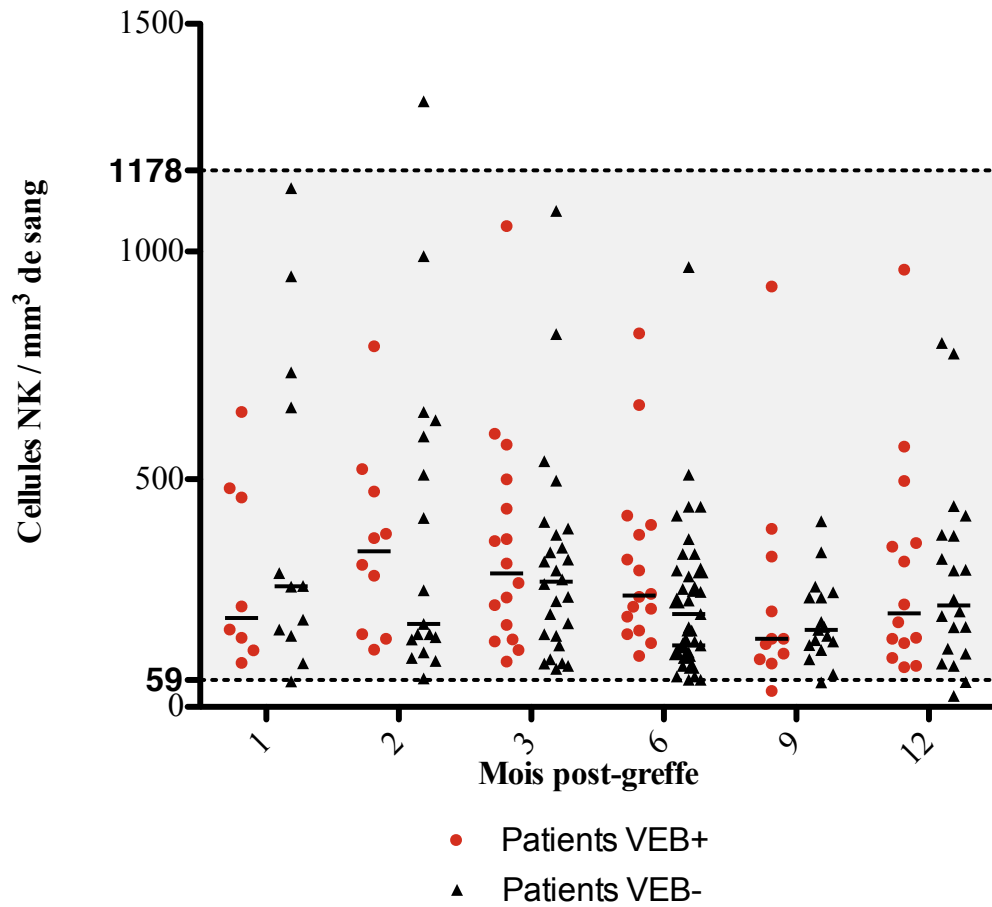


Figure 3.5 : Nombre absolu de cellules NK dans le sang périphérique des enfants greffés de cellules souches hématopoïétiques. VEB+ = VEB positif par PCR quantitative après la greffe; VEB- = VEB négatif par PCR quantitative après la greffe. La zone grise délimitée par les lignes en pointillés représente les valeurs normales chez les enfants sains [302].

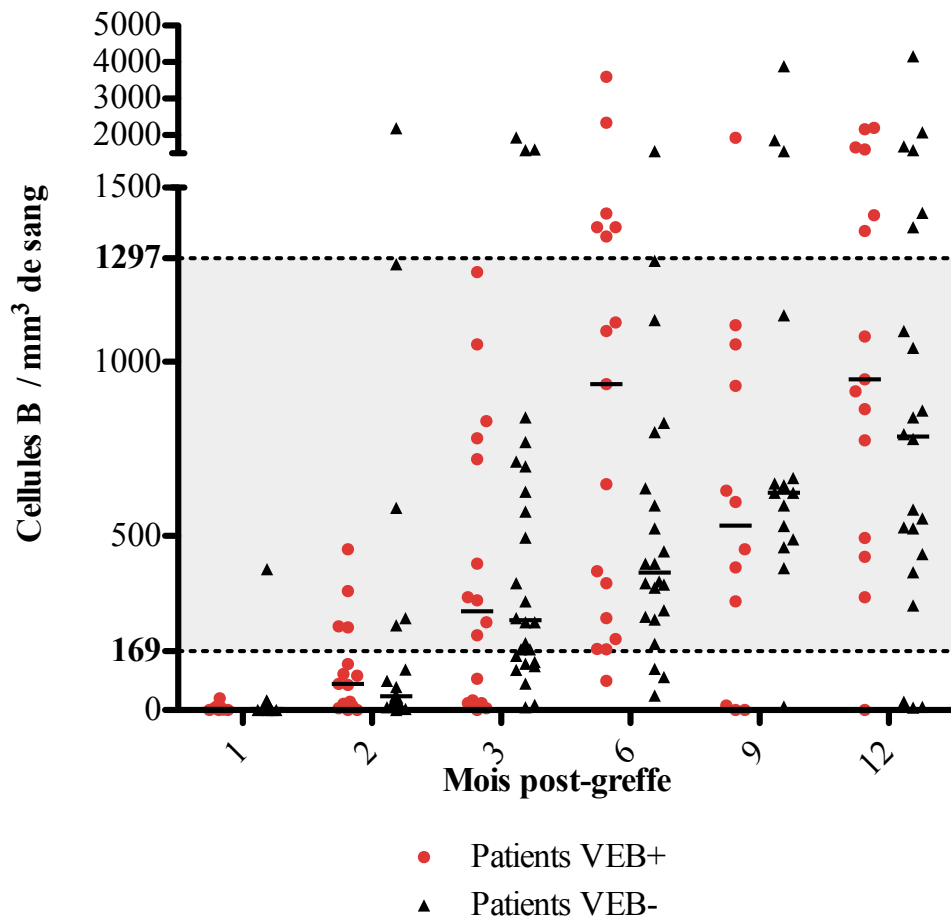


Figure 3.6 : Nombre absolu de cellules B dans le sang périphérique des enfants greffés de cellules souches hématopoïétiques. VEB+ = VEB positif par PCR quantitative après la greffe; VEB- = VEB négatif par PCR quantitative après la greffe. La zone grise délimitée par les lignes en pointillés représente les valeurs normales chez les enfants sains [302].

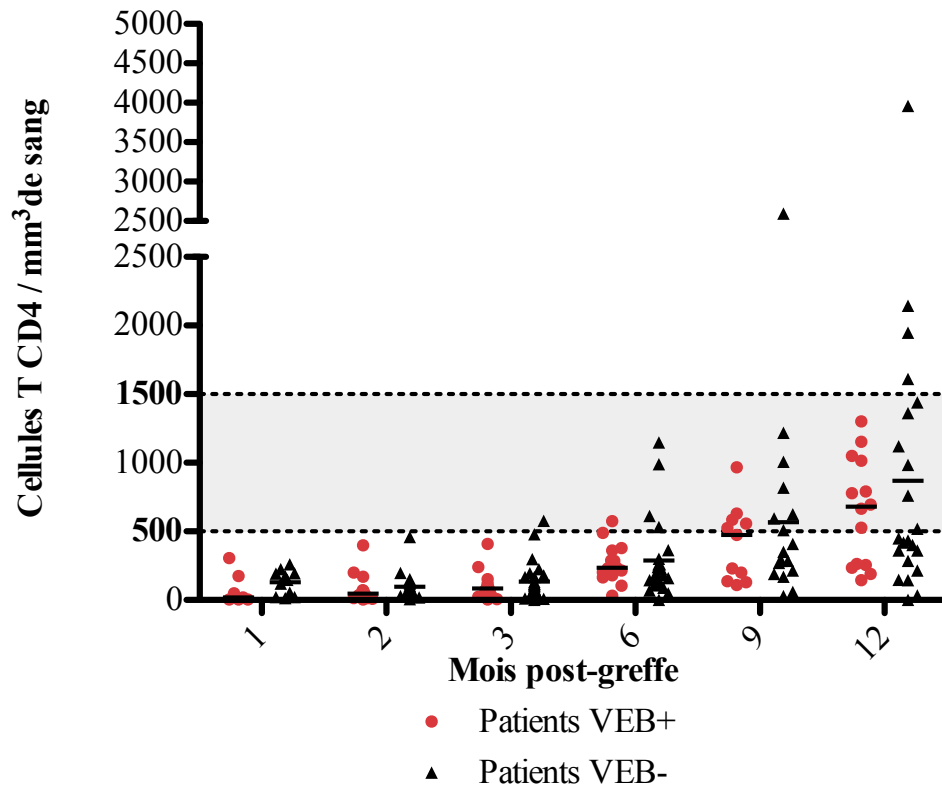


Figure 3.7: Nombre absolu de cellules T CD4 dans le sang périphérique des enfants greffés de cellules souches hématopoïétiques. VEB+ = VEB positif par PCR quantitative après la greffe; VEB- = VEB négatif par PCR quantitative après la greffe. La zone grise délimitée par les lignes en pointillés représente les valeurs normales chez les enfants sains [302].

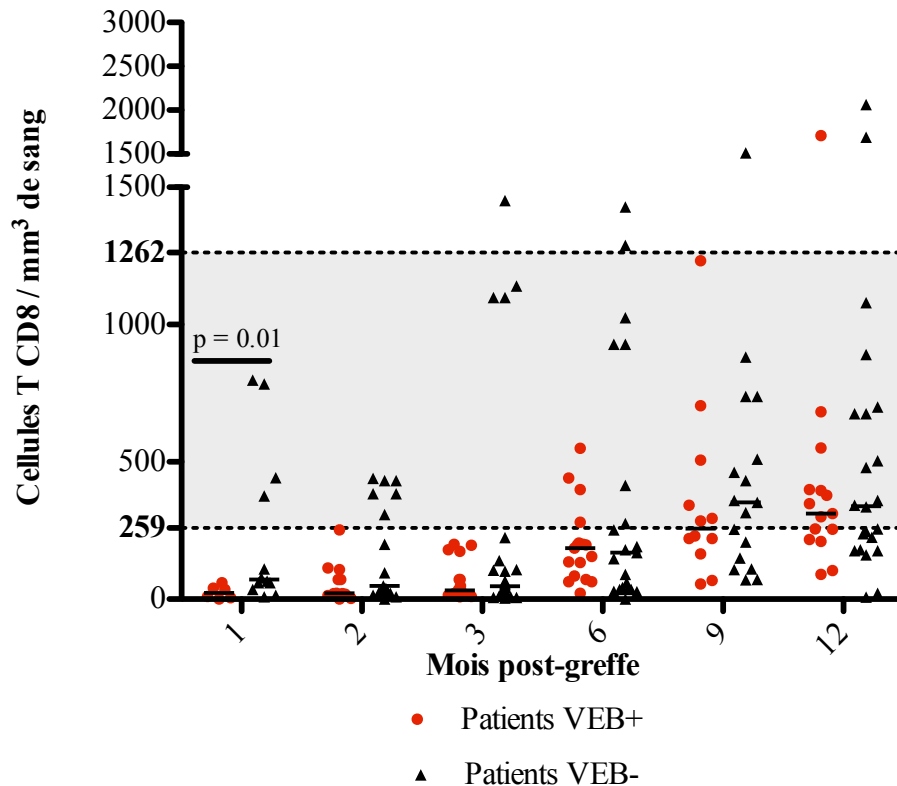


Figure 3.8 : Nombre absolu de cellules T CD8 dans le sang périphérique des enfants greffés de cellules souches hématopoïétiques. VEB+ = VEB positif par PCR quantitative après la greffe; VEB- = VEB négatif par PCR quantitative après la greffe. La zone grise délimitée par les lignes discontinues représente les valeurs normales chez les enfants sains [302].

Ces résultats montrent qu'il n'y a pas de différences entre les deux groupes concernant le nombre de cellules NK, B et T CD4 et leur cinétique de recouvrement est similaire à ce qui est publié dans la littérature. Cependant, nous remarquons que chez certains patients VEB négatifs post-greffe, les niveaux de cellules T CD8 durant les 3 premiers mois de greffe sont comparables aux contrôles normaux et sont plus élevés que ceux des patients qui sont VEB

positifs après la greffe. Cette différence est significative à 1 mois post-greffe ($P = 0.01$). Nous notons que durant cette période, ces patients VEB négatifs post-greffe ont fait des infections parmi les suivantes : CMV, HSV-1 et picornavirus. Mais, aucun d'eux n'a développé une GvHD. Dès 6 mois post-greffe, le recouvrement des cellules T CD8 chez certains patients (dans les deux groupes) est identique à la cinétique publiée dans les études antérieures.

L'ensemble de ces résultats démontre que les receveurs de greffes allogéniques de cellules souches hématopoïétiques ne sont pas protégés efficacement contre l'infection primaire par le VEB ou sa réactivation. Ces patients sont très vulnérables au VEB durant les six premiers mois après la greffe, période durant laquelle ils sont appauvris en cellules T. Or, la réponse spécifique des cellules T est indispensable pour freiner l'infection par le VEB. Ainsi, nous avons tenté de répondre à la question à savoir si l'absence d'une réponse robuste spécifique des cellules T contre le VEB permet de prédire le développement de la MLP chez ces patients.

3.4 La réponse des cellules T contre les antigènes lytique et latent du virus Epstein-Barr chez les enfants greffés de sang de cordon ou de moelle osseuse

Pour étudier la réponse des cellules T contre les antigènes lytique et latent du VEB chez les enfants greffés de sang de cordon ou de moelle osseuse, nous avons analysé les caractéristiques cliniques de 11 patients résumées dans le tableau X ci-dessous.

Tableau X: Caractéristiques cliniques de 11 patients greffés de cellules souches hématopoïétiques. SCN = sang de cordon non apparenté, MO = moelle osseuse apparentée, MON = moelle osseuse non apparentée, ATG = anti-thymocyte globulin, VP16 = étoposide, ICT = irradiation corporelle totale, MMF = mycophénolate mofétil, IgIV = immunoglobulines intraveineuses, GvHD = graft versus host disease, S.O = sans objet et p = patient.

Caractéristiques cliniques	Patients greffés		
Diagnostic	SCN	MO	MON
Leucémie aigue lymphoblastique	p1, p2, p3 et p5	S.O	
Maladie de Farber	p4	S.O	
Leucémie aigue myéloïde	S.O	p8	
Anémie falciforme	S.O	p7	
Maladie chronique granulomateuse	S.O	p6	p10 et p11
Diskératose congénitale	S.O	S.O	p9
Age au moment de la greffe			
9 mois	p4	S.O	S.O
5 ans	p1	S.O	S.O
10 à 16 ans	p2, p3 et p5	p6, p7 et p8	p9 et p11
20 ans	S.O	S.O	p10

Sexe	SCN	MO	MON
M	p1, p2, p3, p4 et p5	p6 et p7	p10 et p11
F	S.O	p8	p9
Conditionnement			
Myéloablatif	p1, p2, p3, p4 et p5	p7 et p8	S.O
Non-myéloablatif	S.O	p6	p9, p10 et p11
ICT, VP16, ATG and Cyclophosphamide	p1, p2 et p5	S.O	S.O
ICT, fludarabine et Cyclophosphamide	p3	S.O	p9
Busulfan et Cyclophosphamide	p4	p8	S.O
Busulfan, ATG et Fludarabine (faible intensité)	S.O	p6	S.O
Bulfan, ATG et Cyclophosphamide	S.O	p7	S.O
Busulfan et fludarabine	S.O	S.O	p10 et p11

Prophylaxie anti-GvHD	SCN	MO	MON
ATG, corticoïdes et cyclosporine	p1, p2, p4 et p5	S.O	S.O
MMF et cyclosporine	p3	p6	p9 et p11
Methotrexate et Cyclosporine	S.O	p7 et p8	S.O
Cyclosporine, MMF et Methotrexate	S.O	S.O	p10
GvHD			
Grade 1	p2	S.O	S.O
Grade 2	p3	S.O	S.O
Grade 3	S.O	p8	p9
Sérologie VEB pré-greffe			
*receveur négatif	p2 et p4	S.O	S.O
*receveur positif	p1, p3 et p5	S.O	S.O
donneur positif/receveur négatif	S.O	p6	S.O
donneur positif/receveur positif	S.O	p7 et p8	p9, p10 et p11
Traitements avec les antiviraux			
Aciclovir et famciclovir	p1, p2, p3 et p5	p6 et p7	p9, p10 et p11
Aucun	p4	S.O	S.O

	SCN	MO	MON
Ganciclovir, cidofovir, valganciclovir et acyclovir	S.O	p8	S.O
Traitement préemptif contre la MLP			
Rituximab	S.O	p7	S.O
Traitement avec les IgIV			
Oui	p1, p2, p3, p4 et p5	p6 et p7	p9, p10 et p11
Non	S.O	p8	S.O
HLA**			
A2	p1, p2 et p3,	p6, p7 et p8	p9 et p10
B8	S.O	S.O	p9
B7	p1, p2, p4 et p5	S.O	p11

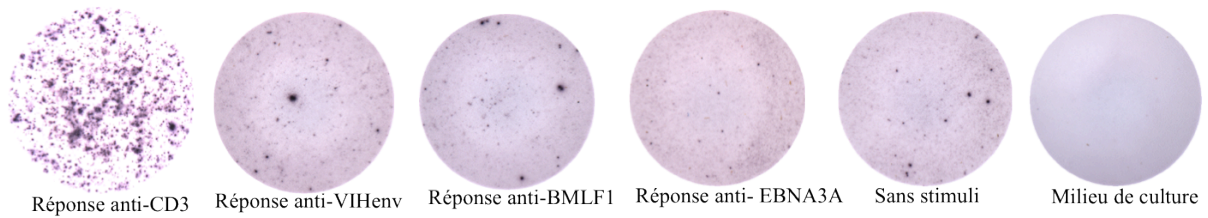
* Ces patients ont reçu une greffe de sang de cordon. On sait que le sang de cordon est VEB négatif.

**HLA (donneur et receveur) auxquels les peptides du VEB sont restreints.

Pour évaluer la réponse des cellules T contre les peptides BMLF1 et EBNA3A, les patients ont été répartis en deux groupes selon la sérologie VEB du donneur avant la greffe. Car après la greffe, ce sont les cellules du donneur (apportées par la greffe) qui reconstituent le système immunitaire du receveur. Ainsi, le groupe de patients avec la greffe VEB négative (sang de cordon) est formé de cinq patients. Le second groupe (greffés de moelle osseuse) avec le donneur VEB séropositif est constitué de six patients. Pour vérifier que la réponse T

contre les peptides du VEB correspond à une réponse spécifique, elle a été comparée à la réponse des cellules T des patients contre le peptide de l'enveloppe du VIH. Notons que les patients sont séronégatifs pour le VIH. Le contrôle positif d'activation des cellules T est l'anti-CD3 inclus dans le kit d'ELISpot. La formation de spots suite à ces stimulations incluant le contrôle négatif sans stimulation (cellules plus milieu de culture) est représentée par la Figure 3.9 ci-après.

A.



B.

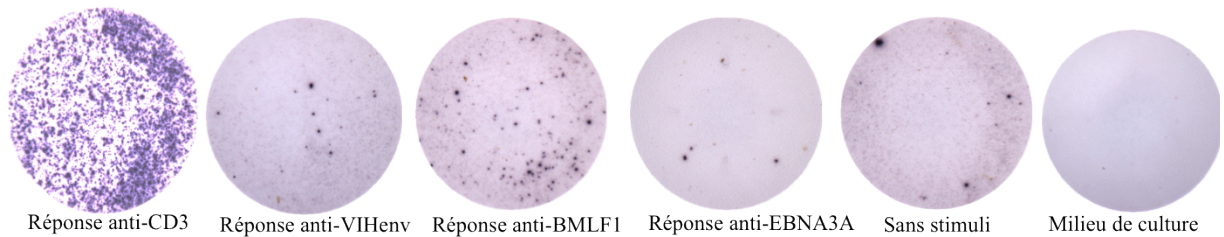


Figure 3.9 : Test ELISpot sur la production d'IFN- γ par les PBMC des greffés. **A.** Exemple de la réponse observée à 12 mois post-greffe chez le patient avec une greffe VEB négative. **B.** Exemple de réponse observée à 9 mois post-greffe chez le patient avec une greffe VEB séropositive.

L'analyse des spots formés (exprimés en spot-forming cells (SFC)/million) montrent que les réponses contre les peptides BMLF1 et EBNA3A chez les patients avec une greffe VEB négative (Figure 3.10) ne sont pas spécifiques ($P = 0.0625$ et 0.6250 respectivement).

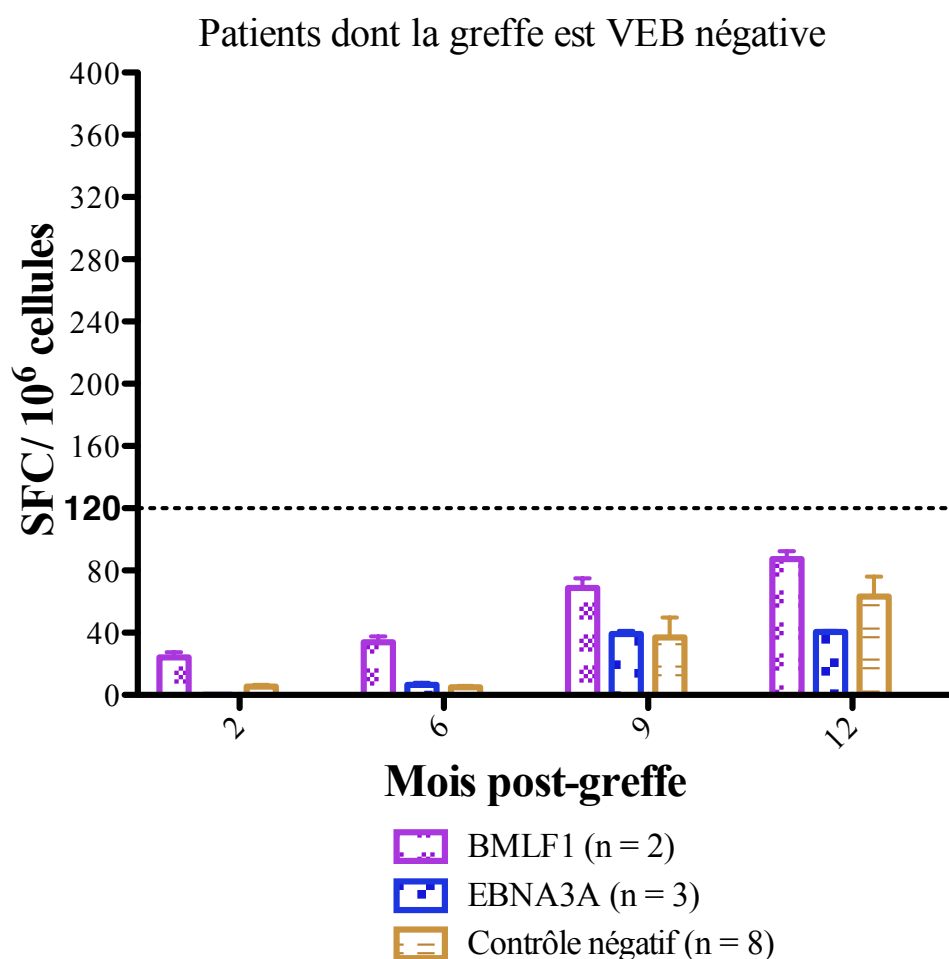


Figure 3.10: Étude par ELISpot de la réponse spécifique des cellules T des greffés de sang de cordon contre les peptides lytique et latent (BMLF1 et EBNA3A). Pour chaque patient, la greffe est VEB négative. Le contrôle négatif (peptide de l'enveloppe du VIH) correspond au contrôle de la réponse non spécifique. SFC = spot-forming cells (cellules formant des spots). Les barres d'erreurs représentent

l'erreur type de la moyenne ou SEM (Standard Error of the Mean). La ligne en pointillé représente le seuil minimum de la réponse T spécifique anti-BMLF1 et anti-EBNA3A observée chez les individus sains VEB séropositifs [317].

En ce qui concerne les patients ayant reçu une greffe VEB séropositive (Figure 3.11), ils montrent une réponse spécifique contre le peptide lytique BMLF1 ($P = 0.0313$) contrairement au peptide latent EBNA3A ($P = 0.3125$). À 3 et 6 mois après la greffe, la réponse spécifique anti-BMLF1 est inférieure au seuil minimum de la réponse positive observée chez les porteurs sains de VEB [317]. Dès 9 mois post greffe, elle est comparable à celle observée chez les individus sains et elle reste supérieure au seuil minimum.

Patients dont la greffe est VEB séropositive

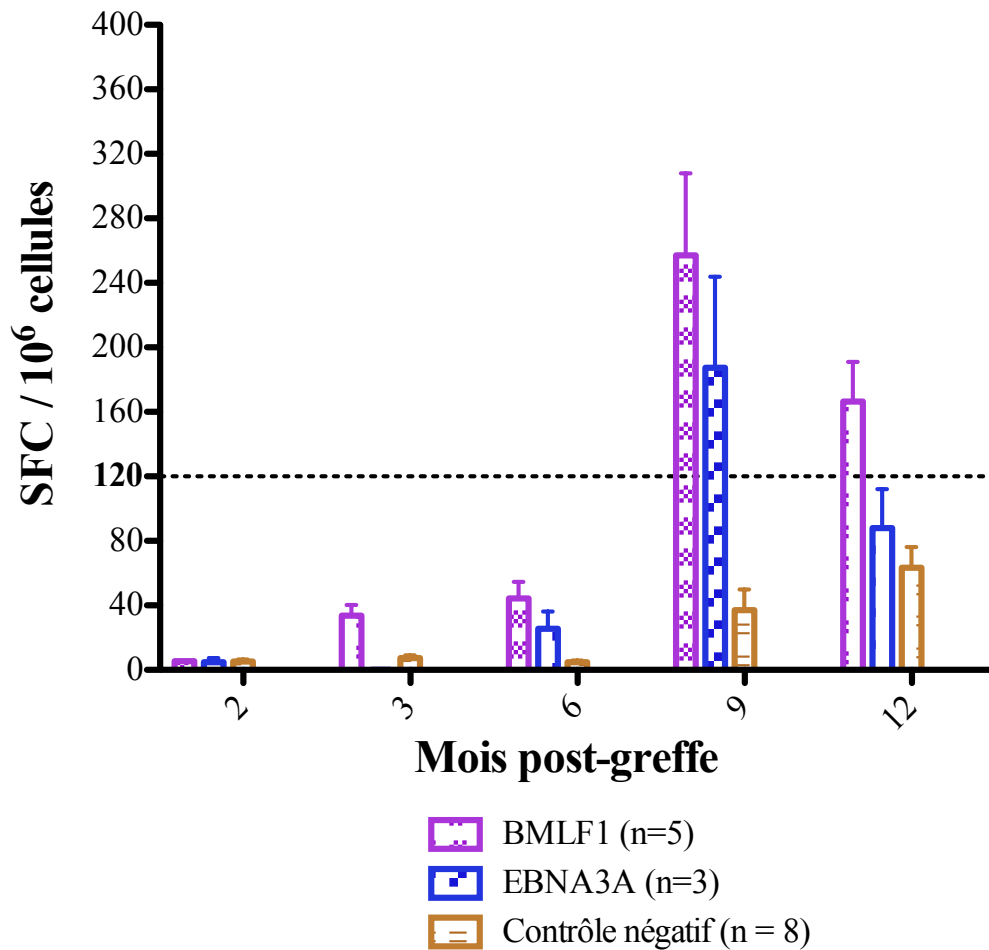


Figure 3.11 : Étude par ELISpot de la réponse spécifique des cellules T des greffés de moelle osseuse, contre les peptides lytique et latent (BMLF1 et EBNA3A). Pour chaque patient, le donneur est VEB séropositif avant la greffe. Le contrôle négatif (peptide de l'enveloppe du VIH) correspond au contrôle de la réponse non spécifique. La ligne en pointillé représente le seuil minimum de la réponse T spécifique anti-BMLF1 et anti-EBNA3A observée chez les individus sains VEB séropositifs [317]. SFC = spot-forming cells (cellules formant des spots).

Les barres d'erreurs représentent l'erreur type de la moyenne ou SEM (Standard Error of the Mean).

L'analyse de la réponse spécifique anti-BMLF1 durant les 6 premiers mois après la greffe (période vulnérable à l'infection par le VEB) révèle que cette réponse est inférieure au seuil minimum de la réponse observée chez les porteurs sains de VEB. Cela indique une faiblesse de la réponse spécifique anti-BMLF1 durant les 6 premiers mois après la greffe. Cette réponse peut être attribuée en partie aux cellules NK. Celles-ci sont recouvrées dès 1 mois après la greffe. Elles ne sont pas suffisantes pour induire une réponse efficace contre le VEB. Par conséquent, ceci nous a conduit à vérifier si la réponse anti-BMLF1 observée est efficace contre le VEB chez les enfants greffés de cellules souches.

3.5 Corrélation entre la charge virale et la réponse contre les antigènes lytique et latent chez les greffés de cellules souches hématopoïétiques

Parmi les cinq patients qui ont montré une réponse spécifique contre le peptide BMLF1, trois patients ont fait une réactivation du virus après la greffe (Figure 3.12). Il s'agit des patients p6, p7 et p8.

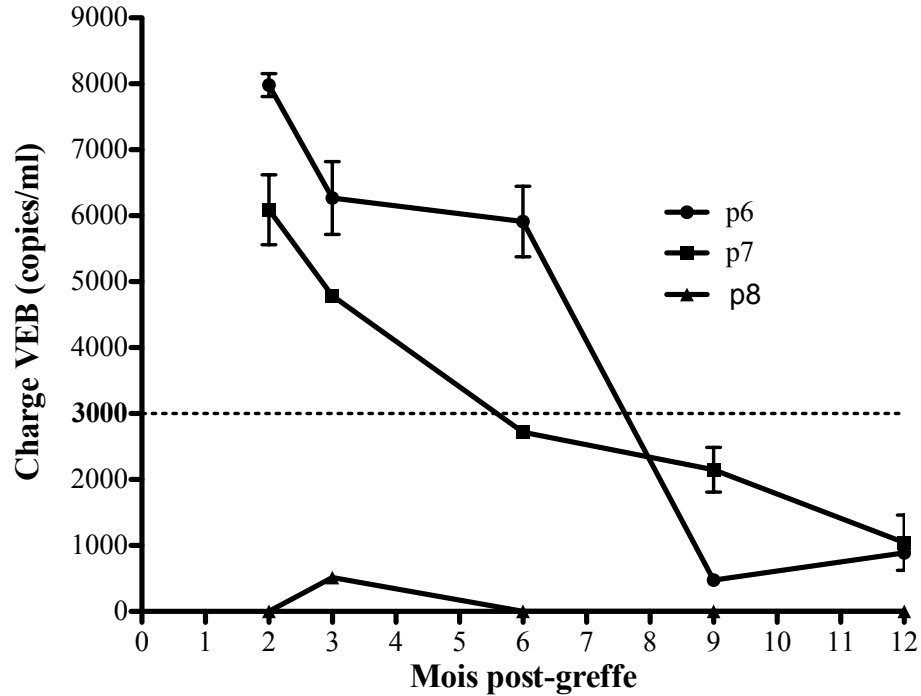


Figure 3.12 : Cinétique de la charge virale du VEB dans le sang périphérique des patients p6, p7 et p8 durant les 12 premiers mois après la greffe. Ces patients ont reçu une greffe de moelle osseuse dont le donneur était VEB séropositif avant la greffe. L'ADN viral a été détecté par PCR quantitative dans le sang total. La ligne en pointillés (3000 copies/ml) représente le seuil pour introduire le traitement avec l'anti-CD20 (rituximab).

À 2 et 3 mois post-greffe, les patients p6 et p7 montrent une charge virale du VEB élevée (> 3000 copies/ml). À partir de 6 mois post-greffe la charge virale du patient p7 est inférieure à 3000 copies/ml. Le patient p6 maintient une charge virale supérieure à 3000 copies/ml durant les 6 premiers mois après la greffe, et elle diminue considérablement (< 3000 copies/ml) à 9 et 12 mois post-greffe. Le patient p8, contrairement aux deux précédents, a montré une charge VEB faible et presque négligeable (< 1000 copies/ml) à 3 mois post-greffe

uniquement. Sachant que les patients p6 et p7 ont une charge virale élevée durant les premiers mois après la greffe, nous avons vérifié si cela pourrait être associé à la faible réponse spécifique des cellules T contre l'antigène lytique BMLF1 du VEB. La comparaison de la charge virale du VEB et de la réponse spécifique des cellules T contre le peptide BMLF1 des patients p6 et p7 (Figures 3.13 et 3.14 respectivement), montre que la réponse anti-BMLF1 des patients p6 et p7 est inversement corrélée à leur charge virale ($P = 0.0265$ et $P = 0.0491$ respectivement) durant les 12 mois post-greffe. La corrélation de Spearman donne un coefficient $r = -0.9$ et $r = -0.88$ pour p6 et p7 respectivement. Ceci veut dire que, lorsque la réponse anti-BMLF1 des cellules T est absente ou faible, la charge virale du VEB est élevée. Cette dernière diminue (< 3000 copies / ml) en présence d'une forte réponse anti-BMLF1. Pour ce qui est du patient p8, la corrélation entre la charge virale et la réponse anti-BMLF1 des cellules T montre un r de Spearman égale à -0.258 avec un $P = 0.375$ (Figure 3.15).

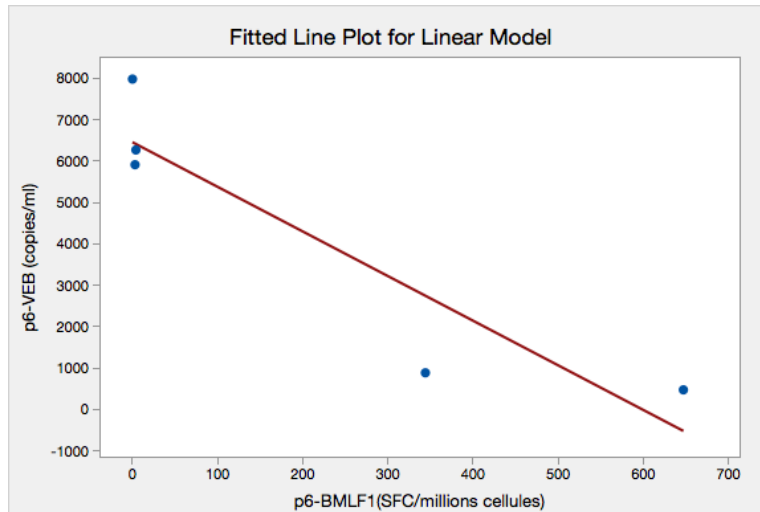
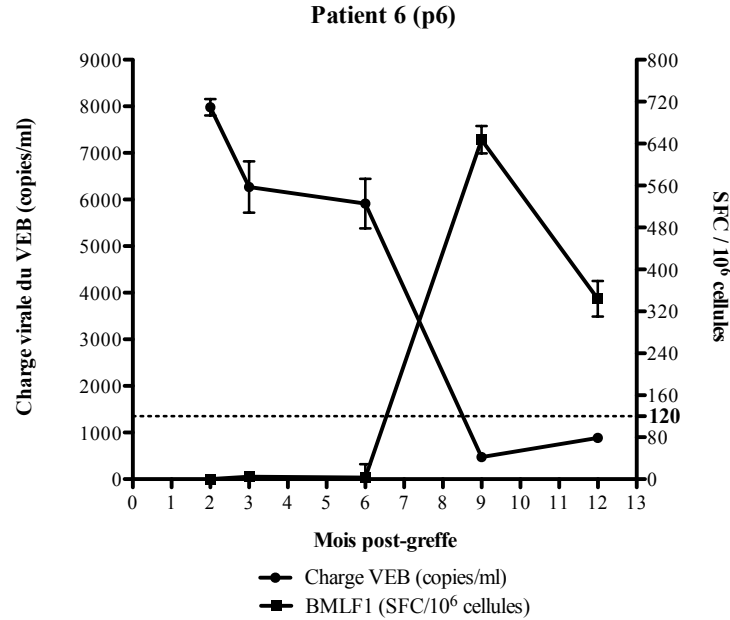


Figure 3.13 : Corrélation entre la charge virale du VEB dans le sang périphérique du patient p6 et la réponse spécifique des cellules T du sang périphérique contre le peptide lytique BMLF1. La ligne en pointillé représente le seuil minimum de la réponse T spécifique anti-BMLF1 observée chez les individus sains VEB séropositifs [317]. *SFC* = *spot-forming cells* (*cellules formant des spots*).

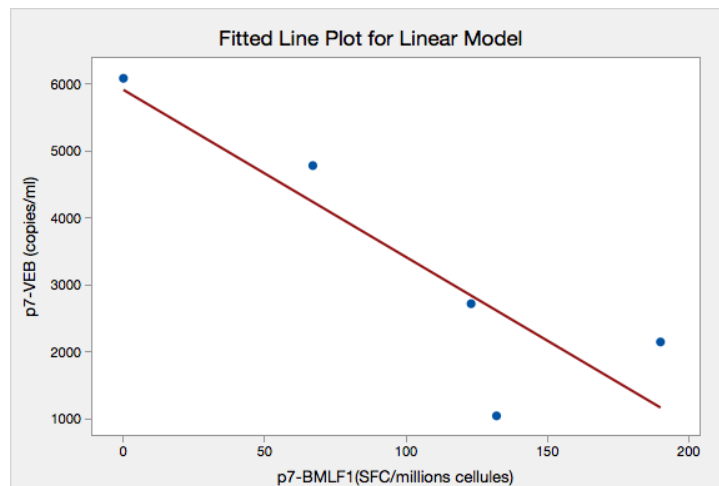
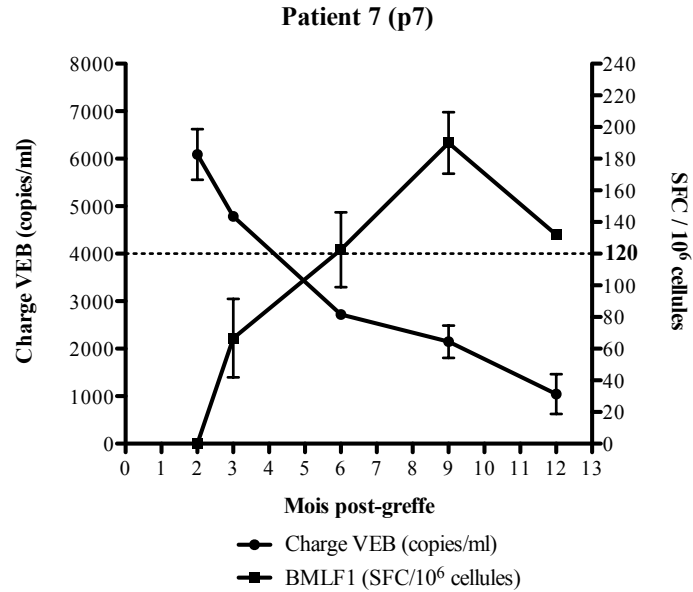


Figure 3.14 : Corrélation entre la charge virale du VEB dans le sang périphérique du patient p7 et la réponse spécifique des cellules T du sang périphérique contre le peptide lytique BMLF1. La ligne en pointillé représente le seuil minimum de la réponse T spécifique anti-BMLF1 observée chez les individus sains VEB séropositifs [317]. *SFC* = *spot-forming cells* (*cellules formant des spots*).

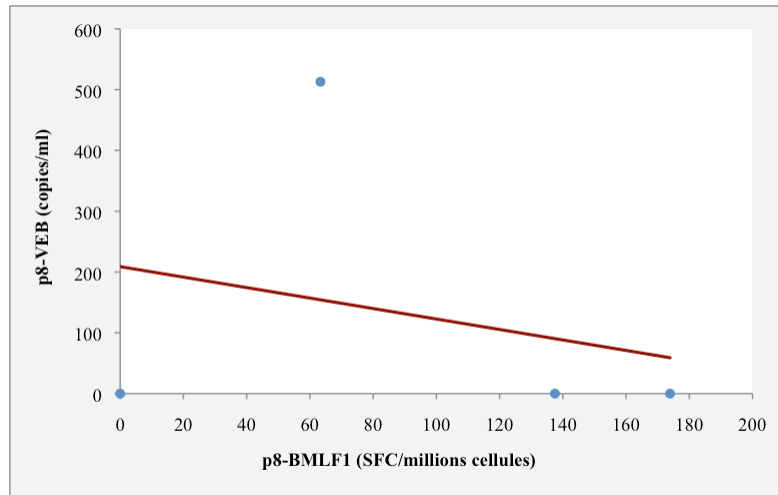
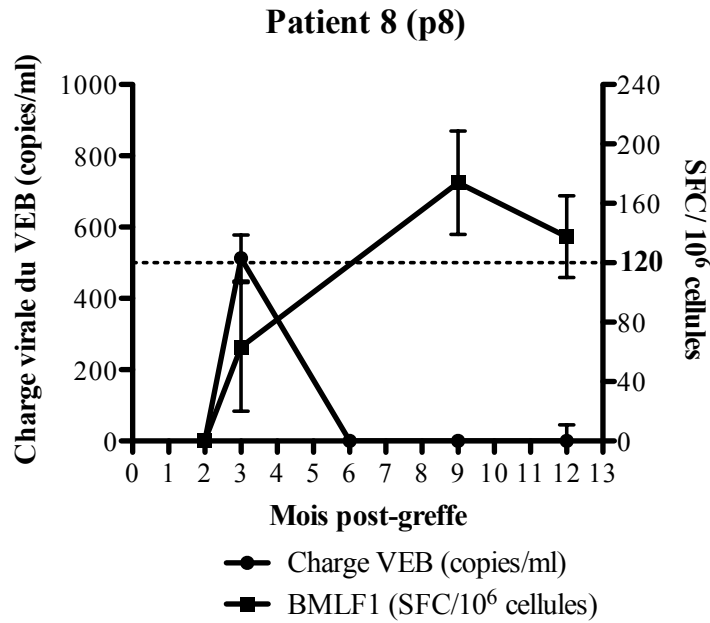


Figure 3.15 : Corrélation entre la charge virale du VEB dans le sang périphérique du patient p8 et la réponse spécifique des cellules T du sang périphérique contre le peptide lytique BMLF1. La ligne en pointillé représente le seuil minimum de la réponse T spécifique anti-BMLF1 observée chez les individus sains VEB séropositifs [317]. *SFC* = *spot-forming cells* (*cellules formant des spots*).

Ces travaux démontrent premièrement que les enfants receveurs de greffes allogéniques de cellules souches hématopoïétiques ne sont pas efficacement protégés par les IgIV contre l'infection par le VEB malgré leur contenu en anticorps neutralisants anti-VEB. Deuxièmement, ils montrent que les patients greffés de cellules souches hématopoïétiques dont le donneur est VEB séropositif avant la greffe, sont capables de générer une réponse spécifique contre l'antigène lytique du VEB. Cependant, cette dernière n'est pas assez robuste durant les 6 premiers mois après la greffe. Ces observations suscitent de nombreuses questions qui seront abordées dans le chapitre suivant.

CHAPITRE IV : DISCUSSION

4.1 Les IgIV ne protègent pas les greffés de cellules souches hématopoïétiques contre la réactivation du virus Epstein-Barr

Les greffés immunosupprimés reçoivent, en guise de traitement prophylactique contre les infections opportunistes, des préparations commerciales d'IgIV. En ce qui concerne l'infection par le VEB associée au développement de la MLP [265, 266], l'efficacité de ces IgIV n'est pas encore claire. De nombreuses équipes se sont penchées sur cette question, mais leurs conclusions restent contradictoires. En 2006, il a été démontré que les IgIV incluant le CytoGam, n'ont pas d'effet neutralisant contre l'infection primaire par le VEB ou sa réactivation dans des cohortes de greffés d'organes solides [265, 266]. Par la suite, Opelz et al. (2007) [318] ont publié que le traitement prophylactique anti-CMV avec les IgIV (CytoGam) protège les enfants greffés du rein contre l'infection par le VEB et le développement de la MLP (lymphome non-Hodgkinien). À ceci, s'ajoutent les résultats obtenus durant cette thèse qui démontrent que les IgIV ne protègent pas efficacement les enfants greffés de cellules souches hématopoïétiques contre l'infection par le VEB et la MLP (Figure 3.1 et Tableau IV). La charge virale du VEB dans le sang périphérique était détectable tôt (1 mois) après la greffe et elle est restée élevée (≥ 3000 copies) chez certains greffés durant les 12 premiers mois post-greffe (Figure 3.2 et Tableau V). Chez ces mêmes patients, deux MLP ont été enregistrées à 1 mois post-greffe et deux autres à 5 et 6 mois post-greffe (Figure 3.2). Nous précisons que la détection de l'ADN du VEB par qPCR dans le sang périphérique des patients, traduit une infection lytique (une réplication du virus) ou une multiplication des cellules B immortalisées par le VEB (latence III). Les cellules souches greffées proviennent du sang de cordon ombilical qui est considéré négatif pour le VEB. Sachant que les patients sont traités avec les

IgIV avant la greffe (jour moins 3) et après la greffe (jusqu'à 9 mois), ces résultats signifient que les IgIV ne bloquent pas l'infection *in vivo*. Par ailleurs, nous avons démontré que ces IgIV contiennent des anticorps anti-gp350 et anti-VCA (voir Tableaux VII et VIII) dont les titres anti-VCA se situent dans le même ordre de grandeur que ceux rapportés par d'autres équipes [263, 316]. Cependant, ils ne sont pas déterminants pour l'activité protectrice des IgIV contre l'infection par le VEB. Sachant que la neutralisation du VEB est associée à un épitope spécifique de la protéine majeure de son enveloppe virale (gp350), les titres neutralisants obtenus (moyennes de 114, 116 et 84) (Figure 3.3) démontrent que les IgIV ont la capacité d'inhiber l'infection par le VEB *in vitro*. L'ensemble de ces résultats suscite la question suivante : pourquoi les IgIV ne neutralisent pas l'infection par le VEB chez les patients greffés? Pour répondre à cette question, nous avons abordé plusieurs points dont les niveaux d'anticorps neutralisants dans la dose d'IgIV administrée aux patients, le site d'infection ou de réactivation (réplication lytique) du VEB et la sévérité de l'immunosuppression.

4.1.1 Détermination des niveaux d'anticorps neutralisants dans la dose d'IgIV administrée aux patients

Nos résultats déterminent pour la première fois les titres neutralisant l'infection par le VEB *in vitro* dans les préparations commerciales d'IgIV (Figure 3.3). Par ailleurs, l'étude de Haque et al. (2006) [278] portant sur l'anticorps monoclonal murin 72A1 (anti-gp350) a démontré un titre neutralisant 100 fois plus élevé que ceux trouvés dans les IgIV. Cette même équipe a documenté l'activité protectrice du 72A1 à une dose de 1mg par kg de poids corporel contre l'infection par le VEB *in vivo*, chez les enfants VEB séropositifs qui reçoivent une greffe du foie d'un donneur VEB séropositif [278]. Lorsque nous comparons cette dose à la

concentration d'anti-gp350 présente dans les IgIV (Tableau IX), nous en déduisons que les anticorps neutralisants anti-VEB contenus dans les IgIV ont un faible index de protection. La dose d'IgIV administrée aux patients est probablement insuffisante pour inhiber l'infection des cellules greffées par le VEB. C'est vrai dans le sens où les IgIV à une dose protectrice suffisante, neutraliseraient le virus infectieux lorsque celui-ci est relargué dans le sang périphérique des patients tôt après la greffe, une hypothèse qui n'a pas encore été prouvée. Cependant, il est connu que les génomes latents (circulaires) et lytiques (linéaires) du VEB ont été détectés dans l'ADN extrait des biopsies de lésions de MLP [319]. Des niveaux élevés de l'ADN du VEB ont également été détectés dans le plasma de patients avec des maladies associées au VEB [320]. Mais aucune étude n'a démontré de façon claire que le VEB détecté dans le plasma des patients provient de virus infectieux et non de l'ADN viral relargué suite à l'apoptose des cellules infectées de façon latente par le VEB. Également, il faudra élucider le site de réplication lytique du VEB chez les patients greffés qui réactivent le virus ainsi que chez ceux qui subissent une primo-infection suite à la greffe.

4.1.2 Infection primaire et réactivation du virus Epstein-Barr

Le modèle le plus accepté suggère que l'infection primaire chez l'hôte immunocompétent se produit au niveau de l'oropharynx où le VEB infecte les cellules épithéliales et/ou les cellules B différenciées (plasmocytes) à travers l'interaction entre la gp350 de l'enveloppe virale et le récepteur cellulaire CD21 [321]. Suite à une première étape d'infection lytique (réplication et production de virions), le virus infecte les cellules B matures. En absence d'une réponse T cytotoxique robuste (le cas chez les receveurs de greffe immunosupprimés), ces cellules B prolifèrent de façon incontrôlée conduisant au développement de la MLP [321, 322]. Le VEB

établit une infection lytique des cellules B naïves des amygdales dans le manteau folliculaire, lequel servirait aussi de site de production de particules virales infectieuses [321]. Dans une étude portant sur la mise en évidence de l'infection par le VEB dans les amygdales de greffés du foie, il a été démontré que les amygdales des patients greffés avaient un nombre plus élevé de cellules infectées par le VEB que les contrôles [323]. Cependant aucun de ces patients n'a développé une MLP [323]. D'autres travaux ont démontré que la charge du VEB est plus élevée dans les cellules B mémoires IgD-CD27+ (provenant du centre germinal) des amygdales de patients avec la mononucléose infectieuse [324]. L'équipe de Shapiro (2011) a aussi démontré la présence d'une infection au VEB active dans les amygdales d'enfants greffés d'organes VEB séropositifs avant la greffe [325]. Il est postulé que les greffés sont particulièrement sujets à réactiver le VEB à cause du contexte immunosuppresseur [326], et suite à l'effet des agents chimiothérapeutiques qui induisent à la fois l'apoptose et la réplication des virus herpès incluant le VEB [327]. Sachant que notre cohorte de 49 patients était VEB séropositif avant la greffe, nous pouvons spéculer que la réactivation du VEB a probablement eu lieu au niveau des amygdales et la réplication lytique a engendré de nouveaux virions qui ont infecté les cellules B voisines lesquelles exprimeraient le profil génique viral caractéristique de la latence III typique des lésions de MLP. Ces cellules B se retrouvent dans le tissu de MLP et peuvent atteindre le sang périphérique où elles sont responsables de la charge virale sanguine du VEB chez ces patients. Selon ce modèle, si l'infection par le VEB se réactive principalement au niveau de la muqueuse de l'oropharynx, il serait peu probable, vu le contenu presque exclusif en IgG des préparations d'IgIV combiné à leur faible index neutralisant, que ces dernières soient efficaces lorsqu'administrées aux patients. Par contre, l'administration d'IgIV pourrait être avantageuse pour prévenir l'infection

primaire chez les greffés à risque d'acquérir le VEB du donneur de greffe [328], ou de produits sanguins transfusés [329, 330]. Récemment une méta-analyse sur les effets anti-infectieux des IgIV dans une cohorte de 4223 patients greffés de moelle osseuse a démontré que les IgIV n'ont pas d'effets sur les infections virales [267]. En effet, le traitement prophylactique des IgIV contre l'infection par le VEB chez les patients VEB séropositifs receveurs de greffes de sang de cordon ou de moelle osseuse serait à reconsidérer. La vaccination à l'aide d'un vaccin peptidique utilisant l'épitope neutralisant de la gp350 et inoculé par voie oropharyngée pourrait s'avérer utile pour l'induction des IgA (principales immunoglobulines des sécrétions salivaires et des voies trachéo-bronchiques) protectrices. Ces IgA anti-gp350 pourraient bloquer l'infection par le VEB des cellules B du donneur au site de l'oropharynx suite à la réactivation du virus. Une étude explorant les réponses humorales spécifiques à la gp350 a démontré des titres élevés d'IgA spécifiques à la gp350 chez les individus souffrants d'une infection chronique par le VEB. Cette même étude a montré que les titres d'IgA spécifiques à la gp350 représentaient une valeur pronostique chez les patients avec un carcinome nasopharyngé [331].

4.1.3 La sévérité de l'immunosuppression

De nombreuses études ont associé le risque de l'infection par le VEB chez les greffés avec la sévérité de l'immunosuppression, dont le traitement avec l'ATG [220, 221]. Cependant, nous n'avons pas trouvé une différence significative entre les patients VEB positifs (soient 16/21 des patients) versus patients VEB négatifs (soient 18/28 des patients), après la greffe en termes de traitement avec l'ATG. Nous rappelons que les deux groupes de patients ont reçu les IgIV.

Ceci revient à dire que l'immunosuppression n'explique pas l'inefficacité des IgIV dans la protection contre le VEB chez les patients.

De même, nous n'avons pas trouvé de différences entre ces deux groupes de patients concernant le nombre de cellules NK, B et T CD4 durant les 12 mois post-greffe (Figures 3.5 à 3.7). Et leur recouvrement suit la même cinétique que ce qui est publié dans la littérature. Cependant on remarque que chez certains patients VEB négatifs post-greffe, les niveaux de cellules T CD8 (Figure 3.8) durant les 3 premiers mois de greffe sont comparables aux contrôles et sont plus élevés que ceux des patients qui sont VEB positifs après la greffe. Cette différence pourrait s'expliquer en partie par une activation de la réponse immunitaire suite aux infections à CMV, HSV-1 et picornavirus. Cependant, il serait pertinent d'étudier les sous types de cellules T CD8 afin de mieux caractériser cette reconstitution. Les deux groupes de patients ont montré le recouvrement normal des cellules T CD4 et CD8 à partir de 6 mois post-greffe. Toutefois, avant 6 mois post-greffe, les patients ont très peu de cellules T CD4 et CD8.

4.2 Réponse des cellules T contre les antigènes lytique et latent chez les greffés de sang de cordon et de moelle osseuse

4.2.1 Développement d'une réponse spécifique à l'antigène lytique BMLF1 chez les greffés de moelle osseuse dont le donneur est VEB séropositif

L'infection par le VEB chez les greffés de cellules souches est une complication majeure qui se produit tôt après la greffe, pouvant conduire au développement de la MLP. Elle se produit durant les six premiers mois après la greffe, période durant laquelle le recouvrement des

cellules T n'est pas complété. Cependant, la réponse spécifique des cellules T contre le VEB est indispensable pour freiner la propagation du virus et pour éliminer les cellules B immortalisées par le VEB. À cet effet, il a été rapporté que les lymphocytes T CD8 issus d'individus sains faisant une infection primaire par le VEB ont, *in vitro*, une grande réactivité spécifique contre les antigènes lytiques, notamment les peptides pré-précoces (BZLF1 et BRLF1), précoces (BMLF1, BMRf1 et BALF2) et tardif (gp350) [91, 92]. Il a aussi été montré que les cellules T CD4 réagissent contre les antigènes BZLF-1, BMLF-1 et EBNA-1 [98]. Partant de la prémisse que l'absence de cellules T chez les greffés favorise le développement de la MLP, nous avons évalué la réponse spécifique anti-VEB dans une cohorte de 11 patients greffés de sang de cordon ou de moelle osseuse. Nos résultats montrent que les patients dont le donneur est VEB séropositif avant la greffe, sont capables de produire une réponse spécifique contre l'antigène lytique BMLF1 du VEB (Figure 3.11) contrairement aux patients qui ont reçu une greffe VEB séronégative (Figure 3.10). Cela s'explique par le fait que les cellules T spécifiques au VEB provenant du donneur ont été transférées au receveur à travers la greffe. Ainsi, ces cellules T sont potentiellement responsables de la réponse spécifique anti-BMLF1 observée chez nos patients. En effet, à l'aide de tétramères générés avec les peptides lytiques (incluant BMLF1) et latents (incluant EBNA3A) du VEB, *Clave et al. (2004)* ont détecté l'apparition des cellules T spécifiques au VEB chez les greffés de moelle osseuse non apparentée VEB séropositive durant les 3 mois post-greffe [332]. Dans une autre étude portant sur le traitement de la MLP avec le transfert adoptif de cellules T spécifiques aux antigènes du VEB (incluant le BMLF1 et l'EBNA3A), les auteurs ont observé une expansion rapide des cellules T CD8 spécifiques aux antigènes précoces du VEB après le transfert adoptif. Ce traitement fut efficace chez les patients qui étaient à un stade précoce de

la MLP [333]. Par ailleurs, chez 20 patients ayant reçu une greffe de moelle osseuse CMV-séropositive, la moitié d'entre eux avait des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques au CMV à 3 mois post-greffe. Parmi ceux-ci, aucun n'a développé une pneumonie associée au CMV. Cependant, les patients chez lesquels les réponses de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques au CMV étaient indétectables, la plupart d'entre eux sont décédés de pneumonie à CMV [334]. De plus, en 2006, Chalandon et collaborateurs ont montré que les greffés de cellules souches peuvent développer une immunité spécifique anti-CMV après la greffe, à partir des cellules T spécifiques au CMV provenant de la greffe (donneur CMV séropositif) ou du receveur (receveur CMV séropositif) [335]. L'ensemble de ces études viennent appuyer nos résultats, suggérant que les lymphocytes T spécifiques aux antigènes viraux (incluant le VEB) contenus dans la greffe sont capables de se multiplier chez le receveur pour lui conférer une immunité spécifique tôt après la greffe, avant le recouvrement thymique.

Par ailleurs, nos résultats ont montré une réponse anti-VEB détectable chez les patients greffés de sang de cordon (donneur VEB séronégatif) (Figure 3.10), mais cette réponse est faible et non spécifique aux antigènes lytique ou latent du VEB. Cette observation signale qu'après greffe de sang de cordon, les cellules T sont capables de répondre à une stimulation quelconque. Par contre, l'équipe de Cohen (2006) [206] soutient que les lymphocytes T naïfs contenus dans la greffe de sang de cordon peuvent générer une réponse spécifique à l'antigène. Ils ont détecté des lymphocytes T spécifiques au HSV-1, au CMV et au VZV aux jours 29, 44 et 94 respectivement après greffe de sang de cordon chez les patients qui sont séronégatifs ou séropositifs pour ces virus avant la greffe [206]. Cependant, nous n'avons pas observé une réponse spécifique au VEB chez nos patients séronégatifs ou séropositifs pour le VEB avant la

greffe et qui ont reçu une greffe de sang de cordon. Nos résultats nous conduisent à conclure que la réponse spécifique au VEB observée durant les 6 premiers mois post-greffe chez les greffés de moelle osseuse dont le donneur est VEB séropositif avant la greffe provient des cellules T du donneur infusées au moment de la greffe.

Toutefois, cette immunité spécifique au VEB n'est pas totalement efficace et requiert une période de restauration qui peut être plus longue chez certains patients. En absence d'un contrôle positif pour la réponse anti-BMLF1 chez les individus sains dans notre étude, nous avons utilisé les données publiées par l'équipe de Macedo (2005) [317] en guise de référence. Ainsi, il en résulte que la réponse spécifique anti-BMLF1 produite par les cellules des patients avec un donneur VEB séropositif, durant les 6 premiers mois après la greffe, n'est pas assez forte. À 9 mois post greffe, elle augmente et est comparable à la réponse observée chez les individus sains. Cela s'explique par le fait que le recouvrement complet des cellules T n'est observé qu'à partir de 9 mois post-greffe.

4.2.2 Absence de réponse spécifique à l'antigène latent EBNA3A après greffe de sang de cordon ou de moelle osseuse

En ce qui concerne la réponse des cellules T contre l'antigène latent EBNA3A, aucune réponse spécifique n'a été détectée après greffe de sang de cordon ou de moelle osseuse, durant les 12 mois de suivi. Cependant, chez les patients greffés de moelle osseuse avec un donneur VEB séropositif, les cellules T des patients sont capables de produire une réponse suite à leur stimulation avec l'antigène. Cette réponse est détectable à partir de 6 mois post-greffe et reste élevée par rapport au contrôle négatif. Cependant, cette différence n'est pas significative, probablement due à la taille de l'échantillon de patients testés (n =3). Par

conséquent, selon ces résultats, la réponse anti-EBNA3A observée chez les patients greffés de moelle osseuse avec un donneur VEB séropositif n'est pas spécifique durant les 12 mois post-greffe. Pareillement, chez les greffés de sang de cordon dont le donneur est VEB séronégatif, aucune différence significative par rapport au contrôle négatif n'a été détectée dans la réponse anti-EBNA3A. Bien que la taille de l'échantillon soit petite, les résultats d'ELISpot avec les peptides lytique et latent reflètent en partie ceux obtenus chez les personnes immunologiquement saines suite à l'infection primaire au VEB. C'est-à-dire que la réponse aux antigènes lytiques apparaît relativement tôt après l'infection, et la réponse aux antigènes latents n'est évidente que beaucoup plus tard durant la phase de convalescence [89, 98]. Selon cette logique, nous nous attendons que chez les patients immunosupprimés, la réponse aux antigènes latents survienne encore plus tardivement, suite au rétablissement complet de leur système immunitaire.

4.3 Relation entre la réactivation du virus Epstein-Barr et la réponse spécifique anti-BMLF1

Lors de l'infection primaire par le VEB ou sa réactivation, la réplication lytique du virus entraîne l'infection des nouvelles cellules B naïves chez lesquelles le virus exprime la latence III conduisant à la transformation et à l'immortalisation des cellules B. Ainsi, la charge virale élevée du VEB dans le sang périphérique peut provenir de la réplication lytique du virus et/ou de la prolifération des cellules B immortalisées par le VEB en latence III. Par conséquent, la détection d'une charge virale élevée du VEB dans le sang est généralement associée à la MLP. Sachant que l'infection par le VEB est fréquente chez les receveurs de greffe de cellules

souches, plusieurs facteurs de risques lui sont reliés, tels que : l'âge du patient, la disparité HLA, la GvHD de grades II-IV ainsi que la sérologie VEB positive du donneur [336]. D'où la nécessité d'un outil efficace de surveillance des patients à risque de développer la MLP.

4.3.1 La détection de la charge virale dans le sang périphérique après greffe de sang de cordon ou de moelle osseuse

Plusieurs équipes se sont penchées sur les méthodes de détection du génome du VEB dans le sang périphérique des patients après leur greffe. En 2000, Lei et collaborateurs ont montré par PCR en temps réel que l'ADN du VEB est détectable dans le plasma des patients diagnostiqués de lymphomes auxquels le VEB est associé (incluant la MLP), et les niveaux plasmatiques de VEB étaient réduits chez les patients qui répondent bien au traitement [320]. Ainsi, la détection du VEB dans le plasma semble être un outil fiable pour surveiller la progression clinique des patients à risque de développer la MLP. D'autres équipes ont aussi obtenu une conclusion semblable en montrant la corrélation entre la charge virale élevée du VEB dans le sang périphérique et le risque de développer la MLP [337-339]. Cependant, les méthodes quantitatives utilisées dans ces études ne donnent aucune précision sur le stade de l'infection (lytique ou latente) auquel la charge virale du VEB est associée. Sachant qu'il y a un manque de marqueurs précis pour le pronostic/diagnostic de la MLP, l'équipe de Hopwood (2002) [340] a comparé la charge virale du VEB et l'expression de l'ARNm des gènes viraux (lytiques et latents) dans les cellules mononucléées du sang périphérique des adultes greffés du cœur. Elle a abouti à une conclusion contraire aux études précédentes. Elle démontre que la charge virale élevée du VEB et/ou l'expression de l'ARNm des gènes viraux ne sont pas des marqueurs de développement de la MLP. En effet, les greffés sains avec une charge virale du

VEB équivalente à celle observée chez les patients avec la MLP, ont aussi à l'occasion montré l'expression des gènes de latence III et une réplication lytique du VEB de façon similaire aux cas de MLP [340]. Ceci a conduit les chercheurs à conclure que le résultat d'une analyse isolée ne peut pas être utilisé pour fin de pronostic/diagnostic de la MLP. Plus récemment, en 2008, Zawilinska et collègues [341] ont confirmé la présence d'une infection au VEB productive, chez les greffés de moelle osseuse en détectant l'ARNm des gènes lytiques BZLF1 et BALF2. Ils ont aussi noté une corrélation entre la charge virale élevée du VEB et l'expression de transcripts spécifiques à la latence III (EBNA2 et LMP1) [341]. Ceci confirme que la charge virale du VEB et la détection des transcripts lytiques ou latents sont insuffisantes pour surveiller les patients à risque de développer la MLP. Dans notre cohorte de 11 patients, les greffés de sang de cordon (donneur VEB séronégatif) n'ont pas fait une infection au VEB. Par contre chez les greffés de moelle osseuse (donneur VEB séropositif), trois patients ont montré une réactivation du VEB (Figure 3.12), dont deux d'entre eux ont maintenu une charge virale élevée (> 3000 copies/ml) durant les premiers mois après la greffe. À partir de 6 mois post-greffe, cette charge virale du VEB diminue considérablement à une valeur inférieure à 3000 copies/ml. Cependant aucun des patients n'a développé la MLP. Sachant que les patients sont traités avec le rituximab dès que leur charge virale est supérieure ou égale à 3000 copies/ml, on pourrait penser que le rituximab est à l'origine de la diminution de la charge virale du VEB. Cependant, parmi les trois patients qui ont réactivé le VEB, un seul (p7) a reçu le rituximab contrairement aux patients p6 et p8 (Tableau X). Ainsi, la diminution de la charge VEB ne peut être attribuée uniquement au traitement avec le rituximab. D'ailleurs, *Clave et al.* (2004) ont montré que les greffés de cellules souches sont capables de contrôler la réactivation du VEB en développant une réponse spécifique aux antigènes viraux tôt après la greffe [332].

Nos résultats montrent que nos patients sont capables de développer une immunité spécifique contre l'antigène lytique BMLF1. Ils suggèrent que la charge virale élevée du VEB n'est pas suffisante pour prédire le risque de développer la MLP.

4.3.2 Corrélation entre la charge virale du virus Epstein-Barr et la réponse spécifique anti-BMLF1 après greffe de moelle osseuse

Nos résultats montrent que les patients greffés de moelle osseuse provenant d'un individu VEB séropositif, sont plus à risque de faire une réactivation du VEB sans nécessairement développer la MLP. La charge virale du VEB détectée chez ces patients est inversement corrélée à la réponse des cellules T contre l'antigène lytique BMLF1 (Figures 3.13 et 3.14). Ceci va dans le même sens que les résultats obtenus en 2003 par notre laboratoire chez les enfants greffés d'organes [342]. Parmi ces patients, ceux qui avaient une charge virale élevée sans développer la MLP, avaient aussi des niveaux élevés d'anticorps IgG anti-EA. À l'inverse, les patients qui ont développé la MLP avaient une charge virale élevée avec des niveaux faibles ou non détectables d'IgG anti-EA [342]. Cependant nos observations chez les patients greffés de cellules souches hématopoïétiques sont différentes. Chez ces derniers, les niveaux anti-EA étaient faiblement détectables aussi bien dans les cas de MLP que chez les patients sans MLP. Ceci rend ainsi difficile l'utilisation des IgG anti-EA comme un marqueur de risque pour le développement de la MLP chez les greffés de cellules souches hématopoïétiques. Les résultats présentés dans cette thèse suggèrent qu'on peut utiliser conjointement la détection de la charge virale du VEB dans le sang périphérique, avec la détermination de la réponse immune spécifique aux antigènes lytiques du VEB, pour prédire les greffés de cellules souches à risque de développer la MLP durant les 3 premiers mois post-

greffe. Par ailleurs, les travaux de *Smets et al.* (2002) [343] chez les enfants greffés du foie, ont aussi associé la charge virale élevée du VEB dans le sang périphérique des patients avec une faible réponse immune cellulaire comme un outil pour prédire les patients à risque de faire une MLP. Ceci s'explique par le fait que les patients qui ont développé une MLP suite à une infection primaire par le VEB avaient un faible niveau de lymphocytes T spécifiques au VEB, et ceci était associé à une charge virale très élevée du VEB [343]. De plus, en 2004, Clave et collaborateurs ont rapporté que les patients (incluant des enfants) greffés de moelle osseuse VEB séropositive sont capables de développer une réponse immune spécifique au VEB tôt après la greffe leur permettant de contrôler le virus suite à sa réactivation [332].

Nos résultats suggèrent que la détermination de la réponse des cellules T contre l'antigène lytique BMLF1 (par ELISpot) conjointement avec la charge virale du VEB (par PCR en temps réel) pourraient s'avérer de bons marqueurs pour prédire plus précisément les patients à risque de développer la MLP après greffe de sang de cordon ou de moelle osseuse.

4.3.3 L'influence du traitement avec le rituximab et les antiviraux sur la charge virale

Le rituximab est administré aux patients dans le but de détruire les cellules B immortalisées par le VEB sans discernement des autres cellules B normales. En effet, il est important d'introduire ce traitement uniquement lorsqu'il n'y a pas d'autres choix de traitement. Par exemple, les patients à haut risque de développer la MLP qui sont incapables de produire une réponse spécifique au VEB après greffe (suite à une infection primaire ou sa réactivation), possédant une charge virale élevée, nécessitent l'utilisation du rituximab [336].

Les patients à haut risque pour la MLP incluent les receveurs de greffe dont le donneur est VEB séropositif ainsi que les greffés soumis à un sévère régime de conditionnement.

Les antiviraux anti-herpétiques sont généralement administrés en guise de traitement préventif contre les infections virales incluant le VEB. Leur mode d'action consiste à inhiber la réplication lytique du virus. Cependant, dans le cas de l'infection par le VEB ou de sa réactivation, la charge virale élevée ne traduit pas uniquement une réplication lytique du virus. Elle peut aussi être une conséquence de la prolifération des cellules B transformées par le VEB. Donc, le traitement avec les antiviraux ne peut être introduit chez les patients en fonction de l'augmentation de la charge virale. Sachant que la réplication lytique du VEB survient tôt après sa réactivation ou son infection, il serait logique d'administrer les antiviraux aux patients à risque de développer la MLP. Ainsi, pour avoir un effet protecteur des antiviraux contre la MLP, ils doivent être administrés aux patients tôt durant l'infection lytique. Dans le cas de notre cohorte d'étude comportant 11 patients, ils ont tous reçu les antiviraux en guise de prophylaxie avant et après la greffe. Cependant, nous ne pouvons pas évaluer l'effet des antiviraux sur l'infection au VEB en raison de la petite taille de notre cohorte. Toutefois, deux patients ont montré des charges virales élevées du VEB (Figure 3.12), malgré le traitement avec les antiviraux. Dans une revue publiée en 2009, Styczynski et collègues ont rapporté que les antiviraux ne sont pas actifs dans le traitement de la MLP, car ils sont généralement combinés à d'autres thérapies (telles que l'infusion des lymphocytes du donneur ou le rituximab) [226].

En somme, nos travaux démontrent que les doses auxquelles les IgIV sont administrées aux enfants greffés de sang de cordon ou de moelle osseuse ne les protègent pas contre

l'infection par le VEB ou sa réactivation. De plus, les patients ayant reçu une greffe VEB séropositive sont capables de produire une réponse spécifique contre l'antigène lytique du VEB. Et, cette réponse est corrélée négativement avec la charge virale du VEB dans le sang périphérique des patients. Ce qui permet de suggérer que la détermination de la réponse spécifique anti-BMLF1 par ELISpot combinée à la surveillance de la charge virale pourrait être un meilleur outil pour prédire avec plus de précision les patients à risque de développer la MLP.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La MLP associée à l'infection par le VEB est l'une des complications majeures pouvant survenir après une greffe de sang de cordon ou de moelle osseuse. Lorsque l'infection primaire par le VEB ou sa réactivation survient très tôt après la greffe (< 3 mois post-greffe), elle prend l'avantage de la déficience immunitaire des patients due à leur régime de conditionnement immunosuppresseur pour entraîner le développement de la MLP. En guise de prévention, les receveurs de greffes reçoivent, en plus des antiviraux, les IgIV comme traitement. À travers ce projet, nous avons réussi à rapporter pour la première fois les titres d'anticorps anti-VEB neutralisants contenus dans les préparations commerciales d'IgIV. Nous avons aussi démontré que ces IgIV ne protègent pas efficacement les greffés de cellules souches contre l'infection primaire par le VEB ou sa réactivation. Cela est associé au faible index neutralisant des anticorps anti-VEB qu'elles renferment ainsi qu'au site de réactivation (réplication lytique) du virus.

Cependant il est pertinent de confirmer ces résultats avec une cohorte d'étude plus grande, incluant un groupe contrôle (non traité avec les IgIV) comparable au groupe traité avec les IgIV. Afin de mieux prévenir le développement de la MLP chez les greffés de cellules souches, l'inhibition de l'infection lytique par le VEB ou sa réactivation est nécessaire. Pour cela, il est possible de développer des anticorps neutralisants la gp350 de l'enveloppe virale ou de préparer un pool de peptides localisés sur la séquence neutralisante de la gp350, qui pourront être administrés aux patients sous forme de vaccin. Par ailleurs, des études ont démontré qu'*in vitro* les petits ARN interférents (pARNi) (dirigés contre des cibles cellulaires ou virales) sont capables de bloquer la réplication lytique du VEB [344, 345]. Ainsi, il serait

intéressant de développer des pARNi (dirigés contre la gp350 par exemple) pour traiter les maladies associées à l'infection par le VEB suite à sa réactivation ou à son infection primaire.

À défaut d'une robuste réponse cytotoxique contre le VEB et d'un traitement préventif efficace, le risque de développer la MLP après greffe lors d'une infection est significatif. De ce fait, il est important de pouvoir identifier les patients à risque afin de leur administrer un traitement conséquent ou un meilleur suivi. Pour satisfaire cette problématique, la réponse au second objectif de cette thèse démontre que la détermination par ELISpot de la réponse des cellules T des greffés contre l'antigène lytique BMLF1 combinée à la surveillance de la charge VEB après la greffe seraient de bons marqueurs. Ces travaux confirment que les greffés de cellules souches provenant d'un donneur séropositif pour le VEB, sont capables de développer une réponse T spécifique à l'antigène lytique du VEB (BMLF1) à partir de 3 mois post-greffe. Il serait important de confirmer ces observations dans une plus grande cohorte de patients. De plus, il serait intéressant de quantifier les cellules T CD4 et CD8 spécifiques à l'antigène BMLF1 chez les patients après la greffe de cellules souches et de les corrélérer avec la réponse anti-BMLF1 déterminée par ELISpot chez les greffés.

Sur le plan fondamental, l'observation d'une charge virale en post-greffe chez la cohorte de 49 patients VEB-séropositifs qui ont reçu des greffes de sang de cordon VEB-négatifs, démontre qu'il y a eu réactivation du virus à partir du receveur. Cette observation valide la prémisse de l'étude, voulant que le cycle lytique du VEB soit central dans la pathogénèse de l'infection par le VEB en début de greffe. Elle valide aussi le choix de la gp350 comme molécule cible pour neutraliser l'infection. Le manque d'un modèle animal

pour simuler l'infection par le VEB empêche de réaliser des expériences qui pourraient mieux cerner le rôle de l'infection lytique au niveau des amygdales dans la genèse de la MLP.

En somme, nos résultats démontrent que l'infection lytique par le VEB est importante dans le développement de la MLP. D'une part, ils amènent les cliniciens à reconsidérer l'utilisation des IgIV en guise de prophylaxie contre le VEB dans le contexte de la greffe de cellules souches hématopoïétiques. D'autre part, ils contribuent à leur fournir un outil pour prédire avec plus de précision les patients à risque de développer la MLP.

Bibliographie

1. Burkitt D. A sarcoma involving the jaws in African children. The British journal of surgery **1958**; 46:218-23.
2. Burkitt D. A children's cancer dependent on climatic factors. Nature **1962**; 194:232-4.
3. Epstein MA, Barr YM. Cultivation in Vitro of Human Lymphoblasts from Burkitt's Malignant Lymphoma. Lancet **1964**; 1:252-3.
4. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. Lancet **1964**; 1:702-3.
5. Epstein MA. Recent studies with EB virus. The Yale journal of biology and medicine **1975**; 48:431-7.
6. Henle G, Henle W, Diehl V. Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-ypete virus to infectious mononucleosis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **1968**; 59:94-101.
7. zur Hausen H, Schulte-Holthausen H, Klein G, et al. EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. Nature **1970**; 228:1056-8.
8. Doll DC, List AF. Burkitt's lymphoma in a homosexual. Lancet **1982**; 1:1026-7.
9. List AF, Greco FA, Vogler LB. Lymphoproliferative diseases in immunocompromised hosts: the role of Epstein-Barr virus. Journal of clinical oncology **1987**; 5:1673-89.
10. Hanto DW, Gajl-Peczalska KJ, Frizzera G, et al. Epstein-Barr virus (EBV) induced polyclonal and monoclonal B-cell lymphoproliferative diseases occurring after renal transplantation. Clinical, pathologic, and virologic findings and implications for therapy. Annals of surgery **1983**; 198:356-69.
11. Su IJ, Hsieh HJ, Lee CY. Histiocytic medullary reticulosis: a lethal form of primary EBV infection in young children in Taiwan. Lancet **1989**; 1:389.
12. Pellett PE, Roizman B. Herpesviridae. Chapter 59, Fields Virology. 6th Edition. Knipe and Howley edition **2013**; 2: 1804-1808.

13. Longnecker RM, Kieff E, Cohen JI. Epstein-Barr Virus. Chapter 61, Fields Virology. 6th edition. Knipe and Howley edition **2013**; 2: 1898-1933.
14. Johannsen E, Luftig M, Chase MR, et al. Proteins of purified Epstein-Barr virus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **2004**; 101:16286-91.
15. Baer R, Bankier AT, Biggin MD, et al. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. Nature **1984**; 310:207-11.
16. Given D, Yee D, Griem K, Kieff E. DNA of Epstein-Barr virus. V. Direct repeats of the ends of Epstein-Barr virus DNA. Journal of virology **1979**; 30:852-62.
17. Hayward SD, Lazarowitz SG, Hayward GS. Organization of the Epstein-Barr virus DNA molecule. II. Fine mapping of the boundaries of the internal repeat cluster of B95-8 and identification of additional small tandem repeats adjacent to the HR-1 deletion. Journal of virology **1982**; 43:201-12.
18. Cheung A, Kieff E. Long internal direct repeat in Epstein-Barr virus DNA. Journal of virology **1982**; 44:286-94.
19. Middeldorp JM, Brink AA, van den Brule AJ, Meijer CJ. Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders. Critical reviews in oncology/hematology **2003**; 45:1-36.
20. Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus: 40 years on. Nature reviews Cancer **2004**; 4:757-68.
21. Rezk SA, Weiss LM. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders. Human pathology **2007**; 38:1293-304.
22. Tsurumi T, Fujita M, Kudoh A. Latent and lytic Epstein-Barr virus replication strategies. Reviews in medical virology **2005**; 15:3-15.
23. Chang YN, Dong DL, Hayward GS, Hayward SD. The Epstein-Barr virus Zta transactivator: a member of the bZIP family with unique DNA-binding specificity and a dimerization domain that lacks the characteristic heptad leucine zipper motif. Journal of virology **1990**; 64:3358-69.

24. Zhang Q, Gutsch D, Kenney S. Functional and physical interaction between p53 and BZLF1: implications for Epstein-Barr virus latency. *Molecular and cellular biology* **1994**; 14:1929-38.
25. Morrison TE, Mauser A, Wong A, Ting JP, Kenney SC. Inhibition of IFN-gamma signaling by an Epstein-Barr virus immediate-early protein. *Immunity* **2001**; 15:787-99.
26. Pearson GR, Luka J, Petti L, et al. Identification of an Epstein-Barr virus early gene encoding a second component of the restricted early antigen complex. *Virology* **1987**; 160:151-61.
27. Austin PJ, Flemington E, Yandava CN, Strominger JL, Speck SH. Complex transcription of the Epstein-Barr virus BamHI fragment H rightward open reading frame 1 (BHRF1) in latently and lytically infected B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1988**; 85:3678-82.
28. Alfieri C, Birkenbach M, Kieff E. Early events in Epstein-Barr virus infection of human B lymphocytes. *Virology* **1991**; 181:595-608.
29. Henderson S, Huen D, Rowe M, Dawson C, Johnson G, Rickinson A. Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1993**; 90:8479-83.
30. Williams T, Sale D, Hazlewood SA. BHRF1 is highly conserved in primate virus analogues of Epstein-Barr virus. *Intervirology* **2001**; 44:55-8.
31. Takayama S, Cazals-Hatem DL, Kitada S, et al. Evolutionary conservation of function among mammalian, avian, and viral homologs of the Bcl-2 oncoprotein. *DNA and cell biology* **1994**; 13:679-92.
32. Young LS, Dawson CW, Eliopoulos AG. Epstein-Barr virus and apoptosis: viral mimicry of cellular pathways. *Biochemical Society transactions* **1999**; 27:807-12.
33. Li JH, Huang D, Sun BF, et al. Efficacy of ionizing radiation combined with adenoviral p53 therapy in EBV-positive nasopharyngeal carcinoma. *International journal of cancer* **2000**; 87:606-10.

34. Faller DV, Mentzer SJ, Perrine SP. Induction of the Epstein-Barr virus thymidine kinase gene with concomitant nucleoside antivirals as a therapeutic strategy for Epstein-Barr virus-associated malignancies. *Current opinion in oncology* **2001**; 13:360-7.
35. Bar-Ner M, Thibault A, Tsokos M, Magrath IT, Samid D. Phenylbutyrate induces cell differentiation and modulates Epstein-Barr virus gene expression in Burkitt's lymphoma cells. *Clinical cancer research* **1999**; 5:1509-16.
36. van Grunsven WM, Spaan WJ, Middeldorp JM. Localization and diagnostic application of immunodominant domains of the BFRF3-encoded Epstein-Barr virus capsid protein. *The Journal of infectious diseases* **1994**; 170:13-9.
37. van Grunsven WM, Nabbe A, Middeldorp JM. Identification and molecular characterization of two diagnostically relevant marker proteins of the Epstein-Barr virus capsid antigen complex. *Journal of medical virology* **1993**; 40:161-9.
38. Biggin M, Farrell PJ, Barrell BG. Transcription and DNA sequence of the BamHI L fragment of B95-8 Epstein-Barr virus. *The EMBO journal* **1984**; 3:1083-90.
39. Thorley-Lawson DA, Poodry CA. Identification and isolation of the main component (gp350-gp220) of Epstein-Barr virus responsible for generating neutralizing antibodies in vivo. *Journal of virology* **1982**; 43:730-6.
40. Muller A, Schmitt L, Raftery M, Schonrich G. Paralysis of B7 co-stimulation through the effect of viral IL-10 on T cells as a mechanism of local tolerance induction. *European journal of immunology* **1998**; 28:3488-98.
41. Moore KW, Vieira P, Fiorentino DF, Trounstein ML, Khan TA, Mosmann TR. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science* **1990**; 248:1230-4.
42. Moore KW, Rousset F, Banchereau J. Evolving principles in immunopathology: interleukin 10 and its relationship to Epstein-Barr virus protein BCRF1. *Springer seminars in immunopathology* **1991**; 13:157-66.
43. Zeidler R, Eissner G, Meissner P, et al. Downregulation of TAP1 in B lymphocytes by cellular and Epstein-Barr virus-encoded interleukin-10. *Blood* **1997**; 90:2390-7.

44. Taga K, Tosato G. IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *Journal of immunology* **1992**; 148:1143-8.
45. Salazar-Onfray F. Interleukin-10: a cytokine used by tumors to escape immunosurveillance. *Medical oncology* **1999**; 16:86-94.
46. de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, et al. 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. *The Journal of experimental medicine* **1991**; 174:915-24.
47. Kimura H, Ito Y, Suzuki R, Nishiyama Y. Measuring Epstein-Barr virus (EBV) load: the significance and application for each EBV-associated disease. *Reviews in medical virology* **2008**; 18:305-19.
48. 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**; 306:480-3.
49. Babcock GJ, Decker LL, Volk M, Thorley-Lawson DA. EBV Persistence in Memory B Cells In Vivo. *Immunity* **1998**; 9:395-404.
50. Molesworth SJ, Lake CM, Borza CM, Turk SM, Hutt-Fletcher LM. Epstein-Barr virus gH is essential for penetration of B cells but also plays a role in attachment of virus to epithelial cells. *Journal of virology* **2000**; 74:6324-32.
51. Haddad RS, Hutt-Fletcher LM. Depletion of glycoprotein gp85 from virosomes made with Epstein-Barr virus proteins abolishes their ability to fuse with virus receptor-bearing cells. *Journal of virology* **1989**; 63:4998-5005.
52. Borza CM, Morgan AJ, Turk SM, Hutt-Fletcher LM. Use of gHgL for Attachment of Epstein-Barr Virus to Epithelial Cells Compromises Infection. *Journal of virology* **2004**; 78:5007-14.
53. Wang X, Kenyon WJ, Li Q, Mullberg J, Hutt-Fletcher LM. Epstein-Barr virus uses different complexes of glycoproteins gH and gL to infect B lymphocytes and epithelial cells. *Journal of virology* **1998**; 72:5552-8.

54. Xiao J, Palefsky JM, Herrera R, Tugizov SM. Characterization of the Epstein-Barr virus glycoprotein BMRF-2. *Virology* **2007**; 359:382-96.
55. Tugizov SM, Berline JW, Palefsky JM. Epstein-Barr virus infection of polarized tongue and nasopharyngeal epithelial cells. *Nature medicine* **2003**; 9:307-14.
56. Lake CM, Molesworth SJ, Hutt-Fletcher LM. The Epstein-Barr virus (EBV) gN homolog BLRF1 encodes a 15-kilodalton glycoprotein that cannot be authentically processed unless it is coexpressed with the EBV gM homolog BBRF3. *Journal of virology* **1998**; 72:5559-64.
57. Lake CM, Hutt-Fletcher LM. Epstein-Barr virus that lacks glycoprotein gN is impaired in assembly and infection. *Journal of virology* **2000**; 74:11162-72.
58. Fixman ED, Hayward GS, Hayward SD. Replication of Epstein-Barr virus oriLyt: lack of a dedicated virally encoded origin-binding protein and dependence on Zta in cotransfection assays. *Journal of virology* **1995**; 69:2998-3006.
59. Fixman ED, Hayward GS, Hayward SD. trans-acting requirements for replication of Epstein-Barr virus ori-Lyt. *Journal of virology* **1992**; 66:5030-9.
60. Baumann M, Feederle R, Kremmer E, Hammerschmidt W. Cellular transcription factors recruit viral replication proteins to activate the Epstein-Barr virus origin of lytic DNA replication, oriLyt. *The EMBO journal* **1999**; 18:6095-105.
61. Gao Z, Krithivas A, Finan JE, et al. The Epstein-Barr virus lytic transactivator Zta interacts with the helicase-primase replication proteins. *Journal of virology* **1998**; 72:8559-67.
62. Zhang Q, Hong Y, Dorsky D, et al. Functional and physical interactions between the Epstein-Barr virus (EBV) proteins BZLF1 and BMRF1: Effects on EBV transcription and lytic replication. *Journal of virology* **1996**; 70:5131-42.
63. Fujii K, Yokoyama N, Kiyono T, et al. The Epstein-Barr virus pol catalytic subunit physically interacts with the BBLF4-BSLF1-BBLF2/3 complex. *Journal of virology* **2000**; 74:2550-7.
64. Dyson PJ, Farrell PJ. Chromatin structure of Epstein-Barr virus. *The Journal of general virology* **1985**; 66 (Pt 9):1931-40.

65. Adams A. Replication of latent Epstein-Barr virus genomes in Raji cells. *Journal of virology* **1987**; 61:1743-6.
66. Kirchmaier AL, Sugden B. Plasmid maintenance of derivatives of oriP of Epstein-Barr virus. *Journal of virology* **1995**; 69:1280-3.
67. Yates JL, Warren N, Sugden B. Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature* **1985**; 313:812-5.
68. Yates J, Warren N, Reisman D, Sugden B. A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1984**; 81:3806-10.
69. Miller G, El-Guindy A, Countryman J, Ye J, Gradoville L. Lytic cycle switches of oncogenic human gammaherpesviruses. *Advances in cancer research* **2007**; 97:81-109.
70. Sun CC, Thorley-Lawson DA. Plasma cell-specific transcription factor XBP-1s binds to and transactivates the Epstein-Barr virus BZLF1 promoter. *Journal of virology* **2007**; 81:13566-77.
71. Fu Z, Cannon MJ. Functional analysis of the CD4(+) T-cell response to Epstein-Barr virus: T-cell-mediated activation of resting B cells and induction of viral BZLF1 expression. *Journal of virology* **2000**; 74:6675-9.
72. Balfour HH, Jr., Odumade OA, Schmeling DO, et al. Behavioral, virologic, and immunologic factors associated with acquisition and severity of primary Epstein-Barr virus infection in university students. *The Journal of infectious diseases* **2013**; 207:80-8.
73. Iwakiri D, Zhou L, Samanta M, et al. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA is released from EBV-infected cells and activates signaling from Toll-like receptor 3. *The Journal of experimental medicine* **2009**; 206:2091-9.
74. Reizis B, Bunin A, Ghosh HS, Lewis KL, Sisirak V. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annual review of immunology* **2011**; 29:163-83.

75. Severa M, Giacomini E, Gafa V, et al. EBV stimulates TLR- and autophagy-dependent pathways and impairs maturation in plasmacytoid dendritic cells: implications for viral immune escape. *European journal of immunology* **2013**; 43:147-58.
76. Lim WH, Kireta S, Russ GR, Coates PT. Human plasmacytoid dendritic cells regulate immune responses to Epstein-Barr virus (EBV) infection and delay EBV-related mortality in humanized NOD-SCID mice. *Blood* **2007**; 109:1043-50.
77. Fiola S, Gosselin D, Takada K, Gosselin J. TLR9 contributes to the recognition of EBV by primary monocytes and plasmacytoid dendritic cells. *Journal of immunology* **2010**; 185:3620-31.
78. Subklewe M, Paludan C, Tsang ML, Mahnke K, Steinman RM, Munz C. Dendritic cells cross-present latency gene products from Epstein-Barr virus-transformed B cells and expand tumor-reactive CD8(+) killer T cells. *The Journal of experimental medicine* **2001**; 193:405-11.
79. Bickham K, Goodman K, Paludan C, et al. Dendritic cells initiate immune control of Epstein-Barr virus transformation of B lymphocytes in vitro. *The Journal of experimental medicine* **2003**; 198:1653-63.
80. Gaudreault E, Fiola S, Olivier M, Gosselin J. Epstein-Barr virus induces MCP-1 secretion by human monocytes via TLR2. *Journal of virology* **2007**; 81:8016-24.
81. Williams H, McAulay K, Macsween KF, et al. The immune response to primary EBV infection: a role for natural killer cells. *British journal of haematology* **2005**; 129:266-74.
82. Parolini S, Bottino C, Falco M, et al. X-linked lymphoproliferative disease. 2B4 molecules displaying inhibitory rather than activating function are responsible for the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected cells. *The Journal of experimental medicine* **2000**; 192:337-46.
83. Eidenschenk C, Dunne J, Jouanguy E, et al. A novel primary immunodeficiency with specific natural-killer cell deficiency maps to the centromeric region of chromosome 8. *American journal of human genetics* **2006**; 78:721-7.
84. Bottino C, Falco M, Parolini S, et al. NTB-A [correction of GNTB-A], a novel SH2D1A-associated surface molecule contributing to the inability of natural killer cells to kill Epstein-

Barr virus-infected B cells in X-linked lymphoproliferative disease. *The Journal of experimental medicine* **2001**; 194:235-46.

85. Pappworth IY, Wang EC, Rowe M. The switch from latent to productive infection in epstein-barr virus-infected B cells is associated with sensitization to NK cell killing. *Journal of virology* **2007**; 81:474-82.

86. Pende D, Rivera P, Marcenaro S, et al. Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity. *Cancer research* **2002**; 62:6178-86.

87. De Paschale M, Clerici P. Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection: Problems and solutions. *World journal of virology* **2012**; 1:31-43.

88. Desai N, Rodrigues C. Serology of Herpes viruses. *Pediatric infectious diseases* **2013**; 5:35-7.

89. Vetsika EK, Callan M. Infectious mononucleosis and Epstein-Barr virus. *Expert reviews in molecular medicine* **2004**; 6:1-16.

90. Callan MF, Tan L, Annels N, et al. Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus In vivo. *The Journal of experimental medicine* **1998**; 187:1395-402.

91. 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. *The Journal of experimental medicine* **1997**; 185:1605-17.

92. Khanna R, Sherritt M, Burrows SR. EBV structural antigens, gp350 and gp85, as targets for ex vivo virus-specific CTL during acute infectious mononucleosis: potential use of gp350/gp85 CTL epitopes for vaccine design. *Journal of immunology* **1999**; 162:3063-9.

93. Kuzushima K, Hoshino Y, Fujii K, et al. Rapid determination of Epstein-Barr virus-specific CD8(+) T-cell frequencies by flow cytometry. *Blood* **1999**; 94:3094-100.

94. Crucian BE, Stowe RP, Pierson DL, Sams CF. Routine detection of Epstein-Barr virus specific T-cells in the peripheral blood by flow cytometry. *Journal of immunological methods* **2001**; 247:35-47.
95. Hislop AD, Taylor GS, Sauce D, Rickinson AB. Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annual review of immunology* **2007**; 25:587-617.
96. Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, et al. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *The Journal of experimental medicine* **1998**; 188:2205-13.
97. Amyes E, Hatton C, Montamat-Sicotte D, et al. Characterization of the CD4+ T cell response to Epstein-Barr virus during primary and persistent infection. *The Journal of experimental medicine* **2003**; 198:903-11.
98. Precopio ML, Sullivan JL, Willard C, Somasundaran M, Luzuriaga K. Differential Kinetics and Specificity of EBV-Specific CD4+ and CD8+ T Cells During Primary Infection. *The Journal of Immunology* **2003**; 170:2590-8.
99. Steigerwald-Mullen P, Kurilla MG, Braciale TJ. Type 2 Cytokines Predominate in the Human CD4 +T-Lymphocyte Response to Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1. *Journal of virology* **2000**; 74: 6748–59.
100. Linde A, Andersson B, Svenson SB, et al. Serum levels of lymphokines and soluble cellular receptors in primary Epstein-Barr virus infection and in patients with chronic fatigue syndrome. *The Journal of infectious diseases* **1992**; 165:994-1000.
101. Spender LC, Cornish GH, Rowland B, Kempkes B, Farrell PJ. Direct and indirect regulation of cytokine and cell cycle proteins by EBNA-2 during Epstein-Barr virus infection. *Journal of virology* **2001**; 75:3537-46.
102. Lotz M, Tsoukas CD, Fong S, Dinarello CA, Carson DA, Vaughan JH. Release of lymphokines after Epstein Barr virus infection in vitro. I. Sources of and kinetics of production of interferons and interleukins in normal humans. *Journal of immunology* **1986**; 136:3636-42.

103. Roberge CJ, McColl SR, Larochelle B, Gosselin J. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances EBV-induced synthesis of chemotactic factors in human neutrophils. *Journal of immunology* **1998**; 160:2442-8.
104. Li Q, Spriggs MK, Kovats S, et al. Epstein-Barr virus uses HLA class II as a cofactor for infection of B lymphocytes. *Journal of virology* **1997**; 71:4657-62.
105. Zuo J, Currin A, Griffin BD, et al. The Epstein-Barr virus G-protein-coupled receptor contributes to immune evasion by targeting MHC class I molecules for degradation. *PLoS pathogens* **2009**; 5:e1000255.
106. Rensing ME, Horst D, Griffin BD, et al. Epstein-Barr virus evasion of CD8(+) and CD4(+) T cell immunity via concerted actions of multiple gene products. *Seminars in cancer biology* **2008**; 18:397-408.
107. Fathallah I, Parroche P, Gruffat H, et al. EBV latent membrane protein 1 is a negative regulator of TLR9. *Journal of immunology* **2010**; 185:6439-47.
108. van Gent M, Griffin BD, Berkhoff EG, et al. EBV lytic-phase protein BGLF5 contributes to TLR9 downregulation during productive infection. *Journal of immunology* **2011**; 186:1694-702.
109. Yin Y, Manoury B, Fahraeus R. Self-inhibition of synthesis and antigen presentation by Epstein-Barr virus-encoded EBNA1. *Science* **2003**; 301:1371-4.
110. Lee SP, Brooks JM, Al-Jarrah H, et al. CD8 T cell recognition of endogenously expressed Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *The Journal of experimental medicine* **2004**; 199:1409-20.
111. Kawanishi M. Epstein-Barr virus BHRF1 protein protects intestine 407 epithelial cells from apoptosis induced by tumor necrosis factor alpha and anti-Fas antibody. *Journal of virology* **1997**; 71:3319-22.
112. Henderson S, Rowe M, Gregory C, et al. Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell* **1991**; 65:1107-15.

113. Strockbine LD, Cohen JI, Farrah T, et al. The Epstein-Barr virus BARF1 gene encodes a novel, soluble colony-stimulating factor-1 receptor. *Journal of virology* **1998**; 72:4015-21.
114. Cohen JI, Lekstrom K. Epstein-Barr Virus BARF1 Protein Is Dispensable for B-Cell Transformation and Inhibits Alpha Interferon Secretion from Mononuclear Cells. *Journal of virology* **1999**; 73:7627-32.
115. de Campos-Lima PO, Levitsky V, Brooks J, et al. T cell responses and virus evolution: loss of HLA A11-restricted CTL epitopes in Epstein-Barr virus isolates from highly A11-positive populations by selective mutation of anchor residues. *The Journal of experimental medicine* **1994**; 179:1297-305.
116. Kingma DW, Weiss WB, Jaffe ES, Kumar S, Frekko K, Raffeld M. Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 oncogene deletions: correlations with malignancy in Epstein-Barr virus--associated lymphoproliferative disorders and malignant lymphomas. *Blood* **1996**; 88:242-51.
117. Khanna R, Slade RW, Poulsen L, et al. Evolutionary dynamics of genetic variation in Epstein-Barr virus isolates of diverse geographical origins: evidence for immune pressure-independent genetic drift. *Journal of virology* **1997**; 71:8340-6.
118. Arvin AM. *Human herpesviruses : biology, therapy, and immunoprophylaxis*. Cambridge New York: Cambridge University Press, **2007**.
119. Soots ML. Specificity of the Paul-Bunnell test. *British medical journal* **1969**; 3:415.
120. Garzelli C, Taub FE, Scharff JE, Prabhakar BS, Ginsberg-Fellner F, Notkins AL. Epstein-Barr virus-transformed lymphocytes produce monoclonal autoantibodies that react with antigens in multiple organs. *Journal of virology* **1984**; 52:722-5.
121. Brink AA, Vervoort MB, Middeldorp JM, Meijer CJ, van den Brule AJ. Nucleic acid sequence-based amplification, a new method for analysis of spliced and unspliced Epstein-Barr virus latent transcripts, and its comparison with reverse transcriptase PCR. *Journal of clinical microbiology* **1998**; 36:3164-9.
122. Gulley ML, Tang W. Laboratory assays for Epstein-Barr virus-related disease. *The Journal of molecular diagnostics* **2008**; 10:279-92.

123. Heim A, Grumbach IM, Zeuke S, Top B. Highly sensitive detection of gene expression of an intronless gene: amplification of mRNA, but not genomic DNA by nucleic acid sequence based amplification (NASBA). *Nucleic acids research* **1998**; 26:2250-1.
124. Gulley ML. Molecular diagnosis of Epstein-Barr virus-related diseases. *The Journal of molecular diagnostics* **2001**; 3:1-10.
125. Yao QY, Croom-Carter DS, Tierney RJ, et al. Epidemiology of infection with Epstein-Barr virus types 1 and 2: lessons from the study of a T-cell-immunocompromised hemophilic cohort. *Journal of virology* **1998**; 72:4352-63.
126. Jeng KC, Hsu CY, Liu MT, Chung TT, Liu ST. Prevalence of Taiwan variant of Epstein-Barr virus in throat washings from patients with head and neck tumors in Taiwan. *Journal of clinical microbiology* **1994**; 32:28-31.
127. Burrows JM, Bromham L, Woolfit M, et al. Selection pressure-driven evolution of the Epstein-Barr virus-encoded oncogene LMP1 in virus isolates from Southeast Asia. *Journal of virology* **2004**; 78:7131-7.
128. Cohen JI. Epstein-Barr virus infection. *The New England journal of medicine* **2000**; 343:481-92.
129. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *The New England journal of medicine* **1989**; 321:1174-8.
130. Szabolcs P, Niedzwiecki D. Immune reconstitution in children after unrelated cord blood transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation* **2008**; 14:66-72.
131. Brown JA, Boussiotis VA. Umbilical cord blood transplantation: basic biology and clinical challenges to immune reconstitution. *Clinical immunology* **2008**; 127:286-97.
132. Sugita J, Tanaka J, Hashimoto A, et al. Influence of conditioning regimens and stem cell sources on donor-type chimerism early after stem cell transplantation. *Annals of hematology* **2008**; 87:1003-8.
133. Geddes M, Storek J. Immune reconstitution following hematopoietic stem-cell transplantation. *Best practice & research Clinical haematology* **2007**; 20:329-48.

134. Maris M, Boeckh M, Storer B, et al. Immunologic recovery after hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning. *Experimental hematology* **2003**; 31:941-52.
135. Khoury HJ, Loberiza FR, Jr., Ringden O, et al. Impact of posttransplantation G-CSF on outcomes of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **2006**; 107:1712-6.
136. Volpi I, Perruccio K, Tosti A, et al. Postgrafting administration of granulocyte colony-stimulating factor impairs functional immune recovery in recipients of human leukocyte antigen haplotype-mismatched hematopoietic transplants. *Blood* **2001**; 97:2514-21.
137. Franzke A, Piao W, Lauber J, et al. G-CSF as immune regulator in T cells expressing the G-CSF receptor: implications for transplantation and autoimmune diseases. *Blood* **2003**; 102:734-9.
138. Westerhuis G, Maas WG, Willemze R, Toes RE, Fibbe WE. Long-term mixed chimerism after immunologic conditioning and MHC-mismatched stem-cell transplantation is dependent on NK-cell tolerance. *Blood* **2005**; 106:2215-20.
139. Savani BN, Rezvani K, Mielke S, et al. Factors associated with early molecular remission after T cell-depleted allogeneic stem cell transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Blood* **2006**; 107:1688-95.
140. Ishaqi MK, Afzal S, Dupuis A, Doyle J, Gassas A. Early lymphocyte recovery post-allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is associated with significant graft-versus-leukemia effect without increase in graft-versus-host disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Bone marrow transplantation* **2008**; 41:245-52.
141. Bjorkstrom NK, Riese P, Heuts F, et al. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood* **2010**; 116:3853-64.
142. Beziat V, Nguyen S, Lapusan S, et al. Fully functional NK cells after unrelated cord blood transplantation. *Leukemia* **2009**; 23:721-8.
143. Moretta A, Maccario R, Fagioli F, et al. Analysis of immune reconstitution in children undergoing cord blood transplantation. *Experimental hematology* **2001**; 29:371-9.

144. Brahmi Z, Hommel-Berrey G, Smith F, Thomson B. NK cells recover early and mediate cytotoxicity via perforin/granzyme and Fas/FasL pathways in umbilical cord blood recipients. *Human immunology* **2001**; 62:782-90.
145. Klanginsirikul P, Carter GI, Byrne JL, Hale G, Russell NH. Campath-1G causes rapid depletion of circulating host dendritic cells (DCs) before allogeneic transplantation but does not delay donor DC reconstitution. *Blood* **2002**; 99:2586-91.
146. Fearnley DB, Whyte LF, Carnoutsos SA, Cook AH, Hart DN. Monitoring human blood dendritic cell numbers in normal individuals and in stem cell transplantation. *Blood* **1999**; 93:728-36.
147. Sale GE, Alavaikko M, Schaeffers KM, Mahan CT. Abnormal CD4:CD8 ratios and delayed germinal center reconstitution in lymph nodes of human graft recipients with graft-versus-host disease (GVHD): an immunohistological study. *Experimental hematology* **1992**; 20:1017-21.
148. Storek J, Dawson MA, Storer B, et al. Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood* **2001**; 97:3380-9.
149. Winston DJ, Territo MC, Ho WG, Miller MJ, Gale RP, Golde DW. Alveolar macrophage dysfunction in human bone marrow transplant recipients. *The American journal of medicine* **1982**; 73:859-66.
150. Tsoi MS, Dobbs S, Brkic S, Ramberg R, Thomas ED, Storb R. Cellular interactions in marrow-grafted patients. II. Normal monocyte antigen-presenting and defective T-cell-proliferative functions early after grafting and during chronic graft-versus-host disease. *Transplantation* **1984**; 37:556-61.
151. Pechumer H, Leinisch E, Bender-Gotze C, Ziegler-Heitbrock HW. Recovery of monocytes after bone marrow transplantation--rapid reappearance of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 production. *Transplantation* **1991**; 52:698-704.
152. Castenskiold EC, Kelsey SM, Collins PW, et al. Functional hyperactivity of monocytes after bone marrow transplantation: possible relevance for the development of post-transplant complications or relapse. *Bone marrow transplantation* **1995**; 15:879-84.

153. Barlogis V, Glasman L, Brunet C, et al. Impact of viable CD45 cells infused on lymphocyte subset recovery after unrelated cord blood transplantation in children. *Biology of blood and marrow transplantation* **2011**; 17:109-16.
154. Merindol N, Grenier AJ, Caty M, et al. Umbilical cord blood T cells respond against the Melan-A/MART-1 tumor antigen and exhibit reduced alloreactivity as compared with adult blood-derived T cells. *Journal of immunology* **2010**; 185:856-66.
155. Garderet L, Dulphy N, Douay C, et al. The umbilical cord blood alphabeta T-cell repertoire: characteristics of a polyclonal and naive but completely formed repertoire. *Blood* **1998**; 91:340-6.
156. Mackall CL, Bare CV, Granger LA, Sharrow SO, Titus JA, Gress RE. Thymic-independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing. *Journal of immunology* **1996**; 156:4609-16.
157. Klein AK, Patel DD, Gooding ME, et al. T-Cell recovery in adults and children following umbilical cord blood transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation* **2001**; 7:454-66.
158. de Vries E, van Tol MJ, van den Bergh RL, et al. Reconstitution of lymphocyte subpopulations after paediatric bone marrow transplantation. *Bone marrow transplantation* **2000**; 25:267-75.
159. Bartelink IH, Belitser SV, Knibbe CA, et al. Immune reconstitution kinetics as an early predictor for mortality using various hematopoietic stem cell sources in children. *Biology of blood and marrow transplantation* **2013**; 19:305-13.
160. Kalwak K, Gorczynska E, Toporski J, et al. Immune reconstitution after haematopoietic cell transplantation in children: immunophenotype analysis with regard to factors affecting the speed of recovery. *British journal of haematology* **2002**; 118:74-89.
161. Niehues T, Rocha V, Filipovich AH, et al. Factors affecting lymphocyte subset reconstitution after either related or unrelated cord blood transplantation in children -- a Eurocord analysis. *British journal of haematology* **2001**; 114:42-8.

162. van Tol MJ, Gerritsen EJ, de Lange GG, et al. The origin of IgG production and homogeneous IgG components after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* **1996**; 87:818-26.
163. Machatschek J, Duda J, Matthay K, Cowan M, Horn B. Immune reconstitution, infectious complications and post transplant supportive care measures after autologous blood and marrow transplantation in children. *Bone marrow transplantation* **2003**; 32:687-93.
164. Merindol N, Charrier E, Duval M, Soudeyns H. Complementary and contrasting roles of NK cells and T cells in pediatric umbilical cord blood transplantation. *Journal of leukocyte biology* **2011**; 90:49-60.
165. Rocha V, Cornish J, Sievers EL, et al. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood* **2001**; 97:2962-71.
166. Eapen M, Rubinstein P, Zhang MJ, et al. Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. *Lancet* **2007**; 369:1947-54.
167. Siefer AK, Longo DL, Harrison CL, Reynolds CW, Murphy WJ. Activated natural killer cells and interleukin-2 promote granulocytic and megakaryocytic reconstitution after syngeneic bone marrow transplantation in mice. *Blood* **1993**; 82:2577-84.
168. Murphy WJ, Keller JR, Harrison CL, Young HA, Longo DL. Interleukin-2-activated natural killer cells can support hematopoiesis in vitro and promote marrow engraftment in vivo. *Blood* **1992**; 80:670-7.
169. Hirayama M, Genyca C, Brownell A, Kaplan J. IL-2-activated murine newborn liver NK cells enhance engraftment of hematopoietic stem cells in MHC-mismatched recipients. *Bone marrow transplantation* **1998**; 21:1245-52.
170. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* **2002**; 295:2097-100.
171. Martin PJ. The role of donor lymphoid cells in allogeneic marrow engraftment. *Bone marrow transplantation* **1990**; 6:283-9.

172. Jiang Z, Adams GB, Hanash AM, Scadden DT, Levy RB. The contribution of cytotoxic and noncytotoxic function by donor T-cells that support engraftment after allogeneic bone marrow transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation* **2002**; 8:588-96.
173. Hexner EO, Danet-Desnoyers GA, Zhang Y, et al. Umbilical cord blood xenografts in immunodeficient mice reveal that T cells enhance hematopoietic engraftment beyond overcoming immune barriers by stimulating stem cell differentiation. *Biology of blood and marrow transplantation* **2007**; 13:1135-44.
174. Charak BS, Brown EG, Mazumder A. Augmentation of murine hematopoiesis by interleukin 2-activated irradiated T cells. *Transplantation* **1995**; 60:589-94.
175. Krenger W, Ferrara JL. Graft-versus-host disease and the Th1/Th2 paradigm. *Immunologic research* **1996**; 15:50-73.
176. Berthou C, Legros-Maida S, Soulie A, et al. Cord blood T lymphocytes lack constitutive perforin expression in contrast to adult peripheral blood T lymphocytes. *Blood* **1995**; 85:1540-6.
177. Canto E, Rodriguez-Sanchez JL, Vidal S. Distinctive response of naive lymphocytes from cord blood to primary activation via TCR. *Journal of leukocyte biology* **2003**; 74:998-1007.
178. Ribeiro-do-Couto LM, Boeije LC, Kroon JS, et al. High IL-13 production by human neonatal T cells: neonate immune system regulator? *European journal of immunology* **2001**; 31:3394-402.
179. Godfrey WR, Spoden DJ, Ge YG, et al. Cord blood CD4(+)CD25(+)-derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function. *Blood* **2005**; 105:750-8.
180. Cupedo T, Nagasawa M, Weijer K, Blom B, Spits H. Development and activation of regulatory T cells in the human fetus. *European journal of immunology* **2005**; 35:383-90.
181. Mold JE, Michaelsson J, Burt TD, et al. Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. *Science* **2008**; 322:1562-5.

182. Wagner JE, Rosenthal J, Sweetman R, et al. Successful transplantation of HLA-matched and HLA-mismatched umbilical cord blood from unrelated donors: analysis of engraftment and acute graft-versus-host disease. *Blood* **1996**; 88:795-802.
183. Rocha V, Wagner JE, Jr., Sobocinski KA, et al. Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. *The New England journal of medicine* **2000**; 342:1846-54.
184. MacMillan ML, Weisdorf DJ, Brunstein CG, et al. Acute graft-versus-host disease after unrelated donor umbilical cord blood transplantation: analysis of risk factors. *Blood* **2009**; 113:2410-5.
185. Asai O, Longo DL, Tian ZG, et al. Suppression of graft-versus-host disease and amplification of graft-versus-tumor effects by activated natural killer cells after allogeneic bone marrow transplantation. *The Journal of clinical investigation* **1998**; 101:1835-42.
186. Olson JA, Leveson-Gower DB, Gill S, Baker J, Beilhack A, Negrin RS. NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects. *Blood* **2010**; 115:4293-301.
187. Cwynarski K, Roberts IA, Iacobelli S, et al. Stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia in children. *Blood* **2003**; 102:1224-31.
188. Rubinstein P, Stevens CE. Placental blood for bone marrow replacement: the New York Blood Center's program and clinical results. *Bailliere's best practice & research Clinical haematology* **2000**; 13:565-84.
189. Parody R, Martino R, Rovira M, et al. Severe infections after unrelated donor allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adults: comparison of cord blood transplantation with peripheral blood and bone marrow transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation* **2006**; 12:734-48.

190. Barker JN, Hough RE, van Burik JA, et al. Serious infections after unrelated donor transplantation in 136 children: impact of stem cell source. *Biology of blood and marrow transplantation* **2005**; 11:362-70.
191. Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, et al. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *The New England journal of medicine* **1998**; 339:1565-77.
192. Hamza NS, Lisgaris M, Yadavalli G, et al. Kinetics of myeloid and lymphocyte recovery and infectious complications after unrelated umbilical cord blood versus HLA-matched unrelated donor allogeneic transplantation in adults. *British journal of haematology* **2004**; 124:488-98.
193. Beck JC, Wagner JE, DeFor TE, et al. Impact of cytomegalovirus (CMV) reactivation after umbilical cord blood transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation* **2010**; 16:215-22.
194. Vandebosch K, Ovetchkine P, Champagne MA, Haddad E, Alexandrov L, Duval M. Varicella-zoster virus disease is more frequent after cord blood than after bone marrow transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation* **2008**; 14:867-71.
195. Benjamin DK, Jr., Miller WC, Bayliff S, Martel L, Alexander KA, Martin PL. Infections diagnosed in the first year after pediatric stem cell transplantation. *The Pediatric infectious disease journal* **2002**; 21:227-34.
196. Tomonari A, Iseki T, Takahashi S, et al. Varicella-zoster virus infection in adult patients after unrelated cord blood transplantation: a single institute experience in Japan. *British journal of haematology* **2003**; 122:802-5.
197. Soong W, Schultz JC, Patera AC, Sommer MH, Cohen JI. Infection of human T lymphocytes with varicella-zoster virus: an analysis with viral mutants and clinical isolates. *Journal of virology* **2000**; 74:1864-70.
198. Schaap A, Fortin JF, Sommer M, et al. T-cell tropism and the role of ORF66 protein in pathogenesis of varicella-zoster virus infection. *Journal of virology* **2005**; 79:12921-33.

199. Zerboni L, Ku CC, Jones CD, Zehnder JL, Arvin AM. Varicella-zoster virus infection of human dorsal root ganglia in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**; 102:6490-5.
200. Ku CC, Zerboni L, Ito H, Graham BS, Wallace M, Arvin AM. Varicella-zoster virus transfer to skin by T Cells and modulation of viral replication by epidermal cell interferon-alpha. *The Journal of experimental medicine* **2004**; 200:917-25.
201. Abendroth A, Morrow G, Cunningham AL, Slobedman B. Varicella-zoster virus infection of human dendritic cells and transmission to T cells: implications for virus dissemination in the host. *Journal of virology* **2001**; 75:6183-92.
202. Larghero J, Rocha V, Porcher R, et al. Association of bone marrow natural killer cell dose with neutrophil recovery and chronic graft-versus-host disease after HLA identical sibling bone marrow transplants. *British journal of haematology* **2007**; 138:101-9.
203. Kim DH, Sohn SK, Lee NY, et al. Transplantation with higher dose of natural killer cells associated with better outcomes in terms of non-relapse mortality and infectious events after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation from HLA-matched sibling donors. *European journal of haematology* **2005**; 75:299-308.
204. Willemze R, Rodrigues CA, Labopin M, et al. KIR-ligand incompatibility in the graft-versus-host direction improves outcomes after umbilical cord blood transplantation for acute leukemia. *Leukemia* **2009**; 23:492-500.
205. Brunstein CG, Wagner JE, Weisdorf DJ, et al. Negative effect of KIR alloreactivity in recipients of umbilical cord blood transplant depends on transplantation conditioning intensity. *Blood* **2009**; 113:5628-34.
206. Cohen G, Carter SL, Weinberg KI, et al. Antigen-specific T-lymphocyte function after cord blood transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation* **2006**; 12:1335-42.
207. Lin SJ, Peacock CD, Bahl K, Welsh RM. Programmed death-1 (PD-1) defines a transient and dysfunctional oligoclonal T cell population in acute homeostatic proliferation. *The Journal of experimental medicine* **2007**; 204:2321-33.

208. Gallez-Hawkins GM, Thao L, Palmer J, et al. Increased programmed death-1 molecule expression in cytomegalovirus disease and acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation* **2009**; 15:872-80.
209. Daly A, McAfee S, Dey B, et al. Nonmyeloablative bone marrow transplantation: Infectious complications in 65 recipients of HLA-identical and mismatched transplants. *Biology of blood and marrow transplantation* **2003**; 9:373-82.
210. Mohty M, Faucher C, Vey N, et al. High rate of secondary viral and bacterial infections in patients undergoing allogeneic bone marrow mini-transplantation. *Bone marrow transplantation* **2000**; 26:251-5.
211. Manteiga R, Martino R, Sureda A, et al. Cytomegalovirus pp65 antigenemia-guided pre-emptive treatment with ganciclovir after allogeneic stem transplantation: a single-center experience. *Bone marrow transplantation* **1998**; 22:899-904.
212. Rocha V, Gluckman E, Eurocord, European B, Marrow Transplant G. Clinical use of umbilical cord blood hematopoietic stem cells. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* **2006**; 12:34-41.
213. Rocha V, Labopin M, Sanz G, et al. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *The New England journal of medicine* **2004**; 351:2276-85.
214. Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P, et al. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *The New England journal of medicine* **2004**; 351:2265-75.
215. Everly MJ, Bloom RD, Tsai DE, Trofe J. Posttransplant lymphoproliferative disorder. *The Annals of pharmacotherapy* **2007**; 41:1850-8.
216. Shroff R, Trompeter R, Cubitt D, Thaker U, Rees L. Epstein-Barr virus monitoring in paediatric renal transplant recipients. *Pediatric nephrology* **2002**; 17:770-5.
217. Penn I. Post-transplant malignancy: the role of immunosuppression. *Drug safety* **2000**; 23:101-13.

218. Dotti G, Fiocchi R, Motta T, et al. Lymphomas occurring late after solid-organ transplantation: influence of treatment on the clinical outcome. *Transplantation* **2002**; 74:1095-102.
219. Green M. Management of Epstein-Barr virus-induced post-transplant lymphoproliferative disease in recipients of solid organ transplantation. *American journal of transplantation* **2001**; 1:103-8.
220. Cockfield SM. Identifying the patient at risk for post-transplant lymphoproliferative disorder. *Transplant infectious disease* **2001**; 3:70-8.
221. Trofe J, Beebe TM, Buell JF, et al. Posttransplant malignancy. *Progress in transplantation* **2004**; 14:193-200.
222. Boubenider S, Hiesse C, Goupy C, Kriaa F, Marchand S, Charpentier B. Incidence and consequences of post-transplantation lymphoproliferative disorders. *Journal of nephrology* **1997**; 10:136-45.
223. Nalesnik MA. Clinicopathologic features of posttransplant lymphoproliferative disorders. *Annals of transplantation* **1997**; 2:33-40.
224. Sica S, Metafuni E, Bellesi S, Chiusolo P. Epstein-barr virus related lymphoproliferations after stem cell transplantation. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases* **2009**; 1:e2009019.
225. Shapiro R, Nalesnik M, McCauley J, et al. Posttransplant lymphoproliferative disorders in adult and pediatric renal transplant patients receiving tacrolimus-based immunosuppression. *Transplantation* **1999**; 68:1851-4.
226. Styczynski J, Einsele H, Gil L, Ljungman P. Outcome of treatment of Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disorder in hematopoietic stem cell recipients: a comprehensive review of reported cases. *Transplant infectious disease* **2009**; 11:383-92.
227. Cesaro S, Murrone A, Mengoli C, et al. The real-time polymerase chain reaction-guided modulation of immunosuppression enables the pre-emptive management of Epstein-Barr virus reactivation after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *British journal of haematology* **2005**; 128:224-33.

228. Reddy N, Rezvani K, Barrett AJ, Savani BN. Strategies to prevent EBV reactivation and posttransplant lymphoproliferative disorders (PTLD) after allogeneic stem cell transplantation in high-risk patients. *Biology of blood and marrow transplantation* **2011**; 17:591-7.
229. Comoli P, Basso S, Labirio M, Baldanti F, Maccario R, Locatelli F. T cell therapy of Epstein-Barr virus and adenovirus infections after hemopoietic stem cell transplant. *Blood cells, molecules & diseases* **2008**; 40:68-70.
230. Heslop HE. Biology and treatment of Epstein-Barr virus-associated non-Hodgkin lymphomas. *Hematology American Society of Hematology Education Program* **2005**:260-6.
231. Long HM, Leese AM, Chagoury OL, et al. Cytotoxic CD4+ T cell responses to EBV contrast with CD8 responses in breadth of lytic cycle antigen choice and in lytic cycle recognition. *Journal of immunology* **2011**; 187:92-101.
232. Usami O, Saitoh H, Ashino Y, Hattori T. Acyclovir reduces the duration of fever in patients with infectious mononucleosis-like illness. *The Tohoku journal of experimental medicine* **2013**; 229:137-42.
233. Balfour HH, Jr., Hokanson KM, Schacherer RM, et al. A virologic pilot study of valacyclovir in infectious mononucleosis. *Journal of clinical virology* **2007**; 39:16-21.
234. Gershburg E, Pagano JS. Epstein-Barr virus infections: prospects for treatment. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **2005**; 56:277-81.
235. Buckley RH, Schiff RI. The use of intravenous immune globulin in immunodeficiency diseases. *The New England journal of medicine* **1991**; 325:110-7.
236. Jolles S, Sewell WA, Misbah SA. Clinical uses of intravenous immunoglobulin. *Clinical and experimental immunology* **2005**; 142:1-11.
237. Sokos DR, Berger M, Lazarus HM. Intravenous immunoglobulin: appropriate indications and uses in hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation* **2002**; 8:117-30.
238. Imbach P, Barandun S, d'Apuzzo V, et al. High-dose intravenous gammaglobulin for idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood. *Lancet* **1981**; 1:1228-31.

239. Takei S, Arora YK, Walker SM. Intravenous immunoglobulin contains specific antibodies inhibitory to activation of T cells by staphylococcal toxin superantigens [see comment]. *The Journal of clinical investigation* **1993**; 91:602-7.
240. Kawada K, Terasaki PI. Evidence for immunosuppression by high-dose gammaglobulin. *Experimental hematology* **1987**; 15:133-6.
241. Prasad NK, Papoff G, Zeuner A, et al. Therapeutic preparations of normal polyspecific IgG (IVIg) induce apoptosis in human lymphocytes and monocytes: a novel mechanism of action of IVIg involving the Fas apoptotic pathway. *Journal of immunology* **1998**; 161:3781-90.
242. Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Donkova-Petrini V, et al. Natural antibodies sustain differentiation and maturation of human dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**; 101:14210-5.
243. Bruhns P, Samuelsson A, Pollard JW, Ravetch JV. Colony-stimulating factor-1-dependent macrophages are responsible for IVIG protection in antibody-induced autoimmune disease. *Immunity* **2003**; 18:573-81.
244. Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Carbonneil C, et al. Inhibition of maturation and function of dendritic cells by intravenous immunoglobulin. *Blood* **2003**; 101:758-65.
245. Aukrust P, Froland SS, Liabakk NB, et al. Release of cytokines, soluble cytokine receptors, and interleukin-1 receptor antagonist after intravenous immunoglobulin administration in vivo. *Blood* **1994**; 84:2136-43.
246. Iwata M, Shimozato T, Tokiwa H, Tsubura E. Antipyretic activity of a human immunoglobulin preparation for intravenous use in an experimental model of fever in rabbits. *Infection and immunity* **1987**; 55:547-54.
247. Ruiz de Souza V, Carreno MP, Kaveri SV, et al. Selective induction of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-8 in human monocytes by normal polyspecific IgG (intravenous immunoglobulin). *European journal of immunology* **1995**; 25:1267-73.

248. Ling ZD, Yeoh E, Webb BT, Farrell K, Doucette J, Matheson DS. Intravenous immunoglobulin induces interferon-gamma and interleukin-6 in vivo. *Journal of clinical immunology* **1993**; 13:302-9.
249. Mollnes TE, Hogasen K, De Carolis C, et al. High-dose intravenous immunoglobulin treatment activates complement in vivo. *Scandinavian journal of immunology* **1998**; 48:312-7.
250. Lam L, Whitsett CF, McNicholl JM, Hodge TW, Hooper J. Immunologically active proteins in intravenous immunoglobulin. *Lancet* **1993**; 342:678.
251. Alder LB, Morgan LA, Spickett GP. Contribution of stabilizing agents present in intravenous immunoglobulin preparations to modulation of mononuclear cell proliferation in vitro. *Scandinavian journal of immunology* **1996**; 44:585-91.
252. Sewell WA, Jolles S. Immunomodulatory action of intravenous immunoglobulin. *Immunology* **2002**; 107:387-93.
253. Tjon AS, van Gent R, Geijtenbeek TB, Kwekkeboom J. Differences in Anti-Inflammatory Actions of Intravenous Immunoglobulin between Mice and Men: More than Meets the Eye. *Frontiers in immunology* **2015**; 6:197.
254. Anthony RM, Wermeling F, Karlsson MC, Ravetch JV. Identification of a receptor required for the anti-inflammatory activity of IVIG. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**; 105:19571-8.
255. Tjon AS, van Gent R, Jaadar H, et al. Intravenous immunoglobulin treatment in humans suppresses dendritic cell function via stimulation of IL-4 and IL-13 production. *Journal of immunology* **2014**; 192:5625-34.
256. Aslam R, Hu Y, Gebremeskel S, et al. Thymic retention of CD4+CD25+FoxP3+ T regulatory cells is associated with their peripheral deficiency and thrombocytopenia in a murine model of immune thrombocytopenia. *Blood* **2012**; 120:2127-32.
257. Ephrem A, Chamat S, Miquel C, et al. Expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells by intravenous immunoglobulin: a critical factor in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis. *Blood* **2008**; 111:715-22.

258. Bayry J, Mouthon L, Kaveri SV. Intravenous immunoglobulin expands regulatory T cells in autoimmune rheumatic disease. *The Journal of rheumatology* **2012**; 39:450-1.
259. Tsurikisawa N, Saito H, Oshikata C, Tsuburai T, Akiyama K. High-dose intravenous immunoglobulin treatment increases regulatory T cells in patients with eosinophilic granulomatosis with polyangiitis. *The Journal of rheumatology* **2012**; 39:1019-25.
260. Glowacki LS, Smaill FM. Meta-analysis of immune globulin prophylaxis in transplant recipients for the prevention of symptomatic cytomegalovirus disease. *Transplantation proceedings* **1993**; 25:1408-10.
261. Bass EB, Powe NR, Goodman SN, et al. Efficacy of immune globulin in preventing complications of bone marrow transplantation: a meta-analysis. *Bone marrow transplantation* **1993**; 12:273-82.
262. Abedi MR, Linde A, Christensson B, Mackett M, Hammarstrom L, Smith CI. Preventive effect of IgG from EBV-seropositive donors on the development of human lymphoproliferative disease in SCID mice. *International journal of cancer* **1997**; 71:624-9.
263. Nadal D, Guzman J, Frohlich S, Braun DG. Human immunoglobulin preparations suppress the occurrence of Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferation. *Experimental hematology* **1997**; 25:223-31.
264. Trappe R, Riess H, Anagnostopoulos I, et al. Efficiency of antiviral therapy plus IVIG in a case of primary EBV infection associated PTLD refractory to rituximab, chemotherapy, and antiviral therapy alone. *Annals of hematology* **2009**; 88:167-72.
265. Green M, Michaels MG, Katz BZ, et al. CMV-IVIG for prevention of Epstein Barr virus disease and posttransplant lymphoproliferative disease in pediatric liver transplant recipients. *American journal of transplantation* **2006**; 6:1906-12.
266. Humar A, Hebert D, Davies HD, et al. A randomized trial of ganciclovir versus ganciclovir plus immune globulin for prophylaxis against Epstein-Barr virus related posttransplant lymphoproliferative disorder. *Transplantation* **2006**; 81:856-61.

267. Raanani P, Gafter-Gvili A, Paul M, Ben-Bassat I, Leibovici L, Shpilberg O. Immunoglobulin prophylaxis in hematopoietic stem cell transplantation: systematic review and meta-analysis. *Journal of clinical oncology* **2009**; 27:770-81.
268. Winston DJ, Ho WG, Bartoni K, Champlin RE. Intravenous immunoglobulin and CMV-seronegative blood products for prevention of CMV infection and disease in bone marrow transplant recipients. *Bone marrow transplantation* **1993**; 12:283-8.
269. Sullivan KM, Kopecky KJ, Jocom J, et al. Immunomodulatory and antimicrobial efficacy of intravenous immunoglobulin in bone marrow transplantation. *The New England journal of medicine* **1990**; 323:705-12.
270. Tha-In T, Metselaar HJ, Tilanus HW, et al. Superior immunomodulatory effects of intravenous immunoglobulins on human T-cells and dendritic cells: comparison to calcineurin inhibitors. *Transplantation* **2006**; 81:1725-34.
271. Cordonnier C, Chevret S, Legrand M, et al. Should immunoglobulin therapy be used in allogeneic stem-cell transplantation? A randomized, double-blind, dose effect, placebo-controlled, multicenter trial. *Annals of internal medicine* **2003**; 139:8-18.
272. Beisel C, Tanner J, Matsuo T, Thorley-Lawson D, Kezdy F, Kieff E. Two major outer envelope glycoproteins of Epstein-Barr virus are encoded by the same gene. *Journal of virology* **1985**; 54:665-74.
273. Tanner J, Whang Y, Sample J, Sears A, Kieff E. Soluble gp350/220 and deletion mutant glycoproteins block Epstein-Barr virus adsorption to lymphocytes. *Journal of virology* **1988**; 62:4452-64.
274. Hoffman GJ, Lazarowitz SG, Hayward SD. Monoclonal antibody against a 250,000-dalton glycoprotein of Epstein-Barr virus identifies a membrane antigen and a neutralizing antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1980**; 77:2979-83.
275. Thorley-Lawson DA, Geilinger K. Monoclonal antibodies against the major glycoprotein (gp350/220) of Epstein-Barr virus neutralize infectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1980**; 77:5307-11.

276. Miller G, Heston L, Hoffman G. Neutralization of lymphocyte immortalization by different strains of Epstein-Barr virus with a murine monoclonal antibody. *Infection and immunity* **1982**; 37:1028-31.
277. Morgan AJ, Mackett M, Finerty S, Arrand JR, Scullion FT, Epstein MA. Recombinant vaccinia virus expressing Epstein-Barr virus glycoprotein gp340 protects cottontop tamarins against EB virus-induced malignant lymphomas. *Journal of medical virology* **1988**; 25:189-95.
278. Haque T, Johannessen I, Dombagoda D, et al. A mouse monoclonal antibody against Epstein-Barr virus envelope glycoprotein 350 prevents infection both in vitro and in vivo. *The Journal of infectious diseases* **2006**; 194:584-7.
279. Qualtiere LF, Decoteau JF, Hassan Nasr-el-Din M. Epitope mapping of the major Epstein-Barr virus outer envelope glycoprotein gp350/220. *The Journal of general virology* **1987**; 68 (Pt 2):535-43.
280. Nemerow GR, Houghten RA, Moore MD, Cooper NR. Identification of an epitope in the major envelope protein of Epstein-Barr virus that mediates viral binding to the B lymphocyte EBV receptor (CR2). *Cell* **1989**; 56:369-77.
281. Zhang PF, Klutch M, Armstrong G, Qualtiere L, Pearson G, Marcus-Sekura CJ. Mapping of the epitopes of Epstein-Barr virus gp350 using monoclonal antibodies and recombinant proteins expressed in *Escherichia coli* defines three antigenic determinants. *The Journal of general virology* **1991**; 72 (Pt 11):2747-55.
282. Pither RJ, Nolan L, Tarlton J, Walford J, Morgan AJ. Distribution of epitopes within the amino acid sequence of the Epstein-Barr virus major envelope glycoprotein, gp340, recognized by hyperimmune rabbit sera. *The Journal of general virology* **1992**; 73 (Pt 6):1409-15.
283. Urquiza M, Lopez R, Patino H, Rosas JE, Patarroyo ME. Identification of three gp350/220 regions involved in Epstein-Barr virus invasion of host cells. *The Journal of biological chemistry* **2005**; 280:35598-605.
284. Szakonyi G, Klein MG, Hannan JP, et al. Structure of the Epstein-Barr virus major envelope glycoprotein. *Nature structural & molecular biology* **2006**; 13:996-1001.

285. 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**; 50:203-13.
286. Zhang PF, Marcus-Sekura CJ. Conformation-dependent recognition of baculovirus-expressed Epstein-Barr virus gp350 by a panel of monoclonal antibodies. *The Journal of general virology* **1993**; 74 (Pt 10):2171-9.
287. McKnight JL, Cen H, Riddler SA, et al. EBV gene expression, EBNA antibody responses and EBV+ peripheral blood lymphocytes in post-transplant lymphoproliferative disease. *Leukemia & lymphoma* **1994**; 15:9-16.
288. 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**; 60:547-54.
289. Davis CL, Harrison KL, McVicar JP, Forg PJ, Bronner MP, Marsh CL. Antiviral prophylaxis and the Epstein Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disorder. *Clinical transplantation* **1995**; 9:53-9.
290. Darenkov IA, Marcarelli MA, Basadonna GP, et al. Reduced incidence of Epstein-Barr virus-associated posttransplant lymphoproliferative disorder using preemptive antiviral therapy. *Transplantation* **1997**; 64:848-52.
291. McDiarmid SV, Jordan S, Kim GS, et al. Prevention and preemptive therapy of posttransplant lymphoproliferative disease in pediatric liver recipients. *Transplantation* **1998**; 66:1604-11.
292. Kuo PC, Dafoe DC, Alfrey EJ, Sibley RK, Scandling JD. Posttransplant lymphoproliferative disorders and Epstein-Barr virus prophylaxis. *Transplantation* **1995**; 59:135-8.
293. Choquet S, Leblond V, Herbrecht R, et al. Efficacy and safety of rituximab in B-cell post-transplantation lymphoproliferative disorders: results of a prospective multicenter phase 2 study. *Blood* **2006**; 107:3053-7.

294. Lee MY, Chiou TJ, Hsiao LT, et al. Rituximab therapy increased post-transplant cytomegalovirus complications in Non-Hodgkin's lymphoma patients receiving autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Annals of hematology* **2008**; 87:285-9.
295. Savoldo B, Rooney CM, Quiros-Tejeira RE, et al. Cellular immunity to Epstein-Barr virus in liver transplant recipients treated with rituximab for post-transplant lymphoproliferative disease. *American journal of transplantation* **2005**; 5:566-72.
296. 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. *The Journal of experimental medicine* **1997**; 185:1605-17.
297. Rickinson AB, Finerty S, Epstein MA. Comparative studies on adult donor lymphocytes infected by EB virus in vivo or in vitro: origin of transformed cells arising in co-cultures with foetal lymphocytes. *International journal of cancer* **1977**; 19:775-82.
298. Yao QY, Czarnecka H, Rickinson AB. Spontaneous outgrowth of Epstein-Barr virus-positive B-cell lines from circulating human B cells of different buoyant densities. *International journal of cancer* **1991**; 48:253-7.
299. Morscio J, Dierickx D, Tousseyn T. Molecular pathogenesis of B-cell posttransplant lymphoproliferative disorder: what do we know so far? *Clinical & developmental immunology* **2013**; 2013:150835.
300. Morris SK, Dzolganovski B, Beyene J, Sung L. A meta-analysis of the effect of antibody therapy for the prevention of severe respiratory syncytial virus infection. *BMC infectious diseases* **2009**; 9:106.
301. Alexander BT, Hladnik LM, Augustin KM, et al. Use of cytomegalovirus intravenous immune globulin for the adjunctive treatment of cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Pharmacotherapy* **2010**; 30:554-61.
302. Valiathan R, Deeb K, Diamante M, Ashman M, Sachdeva N, Asthana D. Reference ranges of lymphocyte subsets in healthy adults and adolescents with special mention of T cell maturation subsets in adults of South Florida. *Immunobiology* **2014**; 219:487-96.

303. Bornkamm GW, Delius H, Zimmer U, Hudewentz J, Epstein MA. Comparison of Epstein-Barr virus strains of different origin by analysis of the viral DNAs. *Journal of virology* **1980**; 35:603-18.
304. Miller G, Lipman M. Release of infectious Epstein-Barr virus by transformed marmoset leukocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1973**; 70:190-4.
305. Sairenji T, Reisert PS, Spiro RC, Connolly T, Humphreys RE. Inhibition of Epstein-Barr virus (EBV) release from the P3HR-1 Burkitt's lymphoma cell line by a monoclonal antibody against a 200,000 dalton EBV membrane antigen. *The Journal of experimental medicine* **1985**; 161:1097-111.
306. Sairenji T, Bertoni G, Medveczky MM, Medveczky PG, Nguyen QV, Humphreys RE. Inhibition of Epstein-Barr virus (EBV) release from P3HR-1 and B95-8 cell lines by monoclonal antibodies to EBV membrane antigen gp350/220. *Journal of virology* **1988**; 62:2614-21.
307. Theofilopoulos AN, Wilson CB, Dixon FJ. The Raji cell radioimmune assay for detecting immune complexes in human sera. *The Journal of clinical investigation* **1976**; 57:169-82.
308. Lin JC, Raab-Traub N. Two strains of Epstein-Barr virus (B95-8 and a P3HR-1 subclone) that lack defective genomes induce early antigen and cause abortive infection of Raji cells. *Journal of virology* **1987**; 61:1985-91.
309. Harada H, Sawada K, Kudo S, et al. Development of cell systems to study viral gene transcription at the initial phase of Epstein-Barr virus infection. *Virus genes* **1987**; 1:73-82.
310. Wang D, Liebowitz D, Wang F, et al. Epstein-Barr virus latent infection membrane protein alters the human B-lymphocyte phenotype: deletion of the amino terminus abolishes activity. *Journal of virology* **1988**; 62:4173-84.
311. Mann KP, Staunton D, Thorley-Lawson DA. Epstein-Barr virus-encoded protein found in plasma membranes of transformed cells. *Journal of virology* **1985**; 55:710-20.
312. Kalyuzhny AE. Handbook of ELISPOT: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology* **2005**; 302.

313. Scotet E, David-Ameline J, Peyrat MA, et al. T cell response to Epstein-Barr virus transactivators in chronic rheumatoid arthritis. *The Journal of experimental medicine* **1996**; 184:1791-800.
314. Benninger-Doring G, Pepperl S, Deml L, Modrow S, Wolf H, Jilg W. Frequency of CD8(+) T lymphocytes specific for lytic and latent antigens of Epstein-Barr virus in healthy virus carriers. *Virology* **1999**; 264:289-97.
315. Tan LC, Gudgeon N, Annels NE, et al. A re-evaluation of the frequency of CD8+ T cells specific for EBV in healthy virus carriers. *Journal of immunology* **1999**; 162:1827-35.
316. Krause I, Wu R, Sherer Y, Patanik M, Peter JB, Shoenfeld Y. In vitro antiviral and antibacterial activity of commercial intravenous immunoglobulin preparations--a potential role for adjuvant intravenous immunoglobulin therapy in infectious diseases. *Transfusion medicine* **2002**; 12:133-9.
317. Macedo C, Donnenberg A, Popescu I, et al. EBV-specific memory CD8+ T cell phenotype and function in stable solid organ transplant patients. *Transplant immunology* **2005**; 14:109-16.
318. Opelz G, Daniel V, Naujokat C, Fickenscher H, Dohler B. Effect of cytomegalovirus prophylaxis with immunoglobulin or with antiviral drugs on post-transplant non-Hodgkin lymphoma: a multicentre retrospective analysis. *The lancet oncology* **2007**; 8:212-8.
319. Katz BZ, Raab-Traub N, Miller G. Latent and replicating forms of Epstein-Barr virus DNA in lymphomas and lymphoproliferative diseases. *The Journal of infectious diseases* **1989**; 160:589-98.
320. Lei KI, Chan LY, Chan WY, Johnson PJ, Lo YM. Quantitative analysis of circulating cell-free Epstein-Barr virus (EBV) DNA levels in patients with EBV-associated lymphoid malignancies. *British journal of haematology* **2000**; 111:239-46.
321. Hsieh WS, Lemas MV, Ambinder RF. The biology of Epstein-Barr virus in post-transplant lymphoproliferative disease. *Transplant infectious disease* **1999**; 1:204-12.

322. Tanner JE, Alfieri C. The Epstein-Barr virus and post-transplant lymphoproliferative disease: interplay of immunosuppression, EBV, and the immune system in disease pathogenesis. *Transplant infectious disease* **2001**; 3:60-9.
323. Meru N, Davison S, Whitehead L, et al. Epstein-Barr virus infection in paediatric liver transplant recipients: detection of the virus in post-transplant tonsillectomy specimens. *Molecular pathology* : MP **2001**; 54:264-9.
324. Chaganti S, Heath EM, Bergler W, et al. Epstein-Barr virus colonization of tonsillar and peripheral blood B-cell subsets in primary infection and persistence. *Blood* **2009**; 113:6372-81.
325. Shapiro NL, Tang CG, Bhattacharyya N. Association between Epstein-Barr virus seroconversion and immunohistochemical changes in tonsils of pediatric solid organ transplant recipients. *The Laryngoscope* **2011**; 121:1718-25.
326. Tanner JE, Alfieri C. Interactions involving cyclosporine A, interleukin-6, and Epstein-Barr virus lead to the promotion of B-cell lymphoproliferative disease. *Leukemia & lymphoma* **1996**; 21:379-90.
327. Prasad A, Remick J, Zeichner SL. Activation of human herpesvirus replication by apoptosis. *Journal of virology* **2013**; 87:10641-50.
328. Cen H, Breinig MC, Atchison RW, Ho M, McKnight JL. Epstein-Barr virus transmission via the donor organs in solid organ transplantation: polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of IR2, IR3, and IR4. *Journal of virology* **1991**; 65:976-80.
329. Trottier H, Buteau C, Robitaille N, et al. Transfusion-related Epstein-Barr virus infection among stem cell transplant recipients: a retrospective cohort study in children. *Transfusion* **2012**; 52:2653-63.
330. Alfieri C, Tanner J, Carpentier L, et al. 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**; 87:812-7.

331. Xu J, Ahmad A, Blagdon M, et al. The Epstein-Barr virus (EBV) major envelope glycoprotein gp350/220-specific antibody reactivities in the sera of patients with different EBV-associated diseases. *International journal of cancer* **1998**; 79:481-6.
332. Clave E, Agbalika F, Bajzik V, et al. Epstein-Barr virus (EBV) reactivation in allogeneic stem-cell transplantation: relationship between viral load, EBV-specific T-cell reconstitution and rituximab therapy. *Transplantation* **2004**; 77:76-84.
333. Moosmann A, Bigalke I, Tischler J, et al. Effective and long-term control of EBV PTLD after transfer of peptide-selected T cells. *Blood* **2010**; 115:2960-70.
334. Reusser P, Riddell SR, Meyers JD, Greenberg PD. Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* **1991**; 78:1373-80.
335. Chalandon Y, Degermann S, Villard J, et al. Pretransplantation CMV-specific T cells protect recipients of T-cell-depleted grafts against CMV-related complications. *Blood* **2006**; 107:389-96.
336. Omar H, Hagglund H, Gustafsson-Jernberg A, et al. Targeted monitoring of patients at high risk of post-transplant lymphoproliferative disease by quantitative Epstein-Barr virus polymerase chain reaction. *Transplant infectious disease* **2009**; 11:393-9.
337. Savoie A, Perpete 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**; 83:2715-22.
338. Jebbink J, Bai X, Rogers BB, Dawson DB, Scheuermann RH, Domiati-Saad R. Development of real-time PCR assays for the quantitative detection of Epstein-Barr virus and cytomegalovirus, comparison of TaqMan probes, and molecular beacons. *The Journal of molecular diagnostics* **2003**; 5:15-20.
339. Wagner HJ, Cheng YC, Huls MH, et al. Prompt versus preemptive intervention for EBV lymphoproliferative disease. *Blood* **2004**; 103:3979-81.

340. Hopwood PA, Brooks L, Parratt R, et al. Persistent Epstein-Barr virus infection: unrestricted latent and lytic viral gene expression in healthy immunosuppressed transplant recipients. *Transplantation* **2002**; 74:194-202.
341. Zawilinska B, Kosinska A, Lenart M, et al. Detection of specific lytic and latent transcripts can help to predict the status of Epstein-Barr virus infection in transplant recipients with high virus load. *Acta biochimica Polonica* **2008**; 55:693-9.
342. Carpentier L, Tapiero B, Alvarez F, Viau C, Alfieri C. Epstein-Barr virus (EBV) early-antigen serologic testing in conjunction with peripheral blood EBV DNA load as a marker for risk of posttransplantation lymphoproliferative disease. *The Journal of infectious diseases* **2003**; 188:1853-64.
343. Smets F, Latinne D, Bazin H, et al. Ratio between Epstein-Barr viral load and anti-Epstein-Barr virus specific T-cell response as a predictive marker of posttransplant lymphoproliferative disease. *Transplantation* **2002**; 73:1603-10.
344. Gao X, Wang H, Sairenji T. Inhibition of Epstein-Barr virus (EBV) reactivation by short interfering RNAs targeting p38 mitogen-activated protein kinase or c-myc in EBV-positive epithelial cells. *Journal of virology* **2004**; 78:11798-806.
345. Chang Y, Chang SS, Lee HH, Doong SL, Takada K, Tsai CH. Inhibition of the Epstein-Barr virus lytic cycle by Zta-targeted RNA interference. *The Journal of general virology* **2004**; 85:1371-9.

ANNEXES

Annexe I: Données cliniques individuelles des 49 patients VEB séropositifs greffés de cellules souches hématopoïétiques.

Patients	sexe (M/F)	Diagnostic	âge au moment de la greffe	Type de greffe	Régime d'immunosuppression (myéloablatif)
Patients traités avec les IgIV et qui sont VEB positifs par qPCR après greffe (n = 18), ≤ 3000 copies/ml et ≥ 3000 copies/ml					
A1	M	LAL(ph+)	17 ans	Cordon non apparenté	Cyclophosphamide, VP16, ICT
A2	M	MDS	7 ans	Cordon non apparenté	Busulfan, Cyclophosphamide
A3	F	AF	9 ans	Moelle apparentée	Busulfan, Cyclophosphamide
A4	F	MDS	9 ans	Moelle non apparentée	Cyclophosphamide, ICT
A5	M	JMML	1 an	Cordon non apparenté	Cyclophosphamide, ICT
A6	M	FEL	8 mois	Cordon non apparenté	Busulfan, VP16, Cyclophosphamide

A7	M	LMA	5 ans	Cordon non apparenté	Busulfan, Cyclophosphamide
A8	F	MDS	3 ans	Cordon non apparenté	Cyclophosphamide, ICT, VP16
A9	F	LMA	10 ans	Cordon non apparenté	Busulfan, Cyclophosphamide
A10	M	LMA	10 ans	Cordon non apparenté	Busulfan, Cyclophosphamide
A11	F	LAL	8 ans	Cordon non apparenté	Cyclophosphamide, VP16, ICT
A12	M	MDS	5 ans	Cordon non apparenté	Busulfan, Cyclophosphamide
A13	M	LAL	10 ans	Cordon non apparenté	Cyclophosphamide, VP16, ICT
A14	F	JMML	7 ans	Cordon non apparenté	Cyclophosphamide, ICT
A15	F	AF	5 ans	Moelle apparentée	Busulfan, Cyclophosphamide
A16	F	FEL	6 mois	Cordon non apparenté	Busulfan, VP16, Cyclophosphamide

A17	F	LAL	13 ans	Cordon non apparenté	Cyclophosphamide, VP16, ICT
A18	M	LYMPHOME (type non précisé)	16 ans	Cordon non apparenté	Cyclophosphamide, VP16, ICT
Patients traités avec les IgIV et qui sont VEB négatifs par qPCR après greffe (n = 19)					
A19	F	LAL	15 ans	Moelle apparentée	Cyclophosphamide, VP16, ICT
A20	F	LMC	18 ans	Moelle apparentée	Cyclophosphamide, ICT
A21	F	LAL	15 ans	Moelle apparentée	Cyclophosphamide, VP16, ICT
A22	M	LAL	11 ans	Cordon non apparentée	Cyclophosphamide, VP16, ICT
A23	M	Amégacariocytose congénitale	11 mois	Cordon non apparentée	Busulfan, Cyclophosphamide
A24	M	LMA	12 ans	Cordon non apparentée	Busulfan, Cyclophosphamide
A25	M	LAL	17 ans	Cordon non apparentée	Busulfan, Melfalan

A26	F	LAL	6 ans	Cordon non apparentée	Cyclophosphamide, VP16, ICT
A27	M	Myélofibrose	1an 8mois	Cordon non apparentée	Busulfan, Cyclophosphamide
A28	M	Myélofibrose	2 ans	Cordon non apparentée	Busulfan, Cyclophosphamide
A29	M	LAL	14 ans	Cordon non apparentée	Cyclophosphamide, ICT
A30	M	MDS	8 mois	Cordon non apparentée	Busulfan, Cyclophosphamide
A31	M	WAS	5 mois	Cordon non apparentée	Busulfan, Cyclophosphamide
A32	M	LAL	7 ans	Cordon non apparentée	Cyclophosphamide, VP16, ICT
A33	F	LAL	14 ans	Cordon non apparentée	Cyclophosphamide, VP16, ICT
A34	F	Syndrome hémophagocytaire	18 mois	Cordon non apparentée	Busulfan, Cyclophosphamide, VP16
A35	M	LMA	16 ans	Cordon non	Busulfan,

				apparentée	Cyclophosphamide
A36	F	LAL	10 ans	Cordon non apparentée	Cyclophosphamide, VP16, ICT
A37	M	LAL	14 ans	Cordon non apparentée	Cyclophosphamide, VP16, ICT
Patients non traités avec les IgIV et qui sont VEB positifs par qPCR après greffe (n = 3), ≤ 3000 copies/ml et ≥ 3000 copies/ml					
A38	F	LML	10 ans	Moelle apparentée	Busulfan, Cyclophosphamide
A39	F	LMA	16 ans	Moelle apparentée	Busulfan, Cyclophosphamide
A40	F	LAL	18 ans	Moelle apparentée	Cyclophosphamide, VP16, ICT
Patients non traités avec les IgIV et qui sont VEB négatifs par qPCR après greffe (n = 9)					
A41	M	LMA	12 ans	Moelle apparentée	Cyclophosphamide, VP16, ICT
A42	F	LAL	9 ans	Moelle apparentée	Cyclophosphamide, VP16, ICT

A43	M	LMA	17 ans	Moelle apparentée	Busulfan, Cyclophosphamide
A44	M	LAL	7 ans	Moelle apparentée	Cyclophosphamide, VP16, ICT
A45	M	MDS	12 ans	Moelle apparentée	Cyclophosphamide, VP16, ICT
A46	F	LAL	6 ans	Moelle apparentée	Cyclophosphamide, VP16, ICT
A47	F	LB	10 ans	Moelle apparentée	Cyclophosphamide, VP16, ICT
A48	M	SCID	7 mois	Cordon non apparenté	Busulfan, Cyclophosphamide
A49	F	LMA	2 ans	Cordon non apparenté	Cyclophosphamide, VP16, ICT

Légende:

- *LMA = Leucémie Myéloïde Aiguë*
- *LAL = Leucémie Aiguë Lymphoblastique*
- *MDS = Syndrome Myélodysplasique*
- *AF = Anémie Falciforme*
- *FEL = Lymphohistiocytose Hémophagocytaire*
- *LML = Leucémie Myéloïde Lymphoblastique*
- *WAS = Wiscott-Aldrich*

- *JMML = Leucémie myélomonocytaire juvénile*
- *LMC = Leucémie myéloïde chronique*
- *SCID = Déficit immunitaire combiné sévère*
- *LB = Lymphome de Burkitt*
- *ICT = Irradiation corporelle totale*
- *VP16 = Étoposide*
- *M = Masculin*
- *F = Féminin*

Annexe II: Statut post-greffe de l'infection par le VEB ou sa réactivation chez les 49 enfants greffés de cellules souches hématopoïétiques.

Patients	VEB qPCR (positif ou négatif)	mois post- greffe au moment du VEB qPCR	MLP (oui ou non)	Période post-greffe diagnostic de la MLP	Traitement de la MLP
Patients traités avec les IgIV et qui sont VEB positifs par qPCR après greffe (n = 18), ≤ 3000 copies/ml et ≥ 3000 copies/ml					
A1	positif	6 mois	non	s.o	s.o
A2	positif	1 mois	non		
A3	positif	1 mois	oui	5 mois	rituximab
A4	positif	7 mois	non	s.o	s.o
A5	positif	1 mois	non	s.o	s.o
A6	positif	4 Jours	non	s.o	s.o
A7	positif	1 mois	non	s.o	s.o
A8	positif	1 mois	oui	1 mois	rituximab
A9	positif	5 mois	oui	6 mois	rituximab
A10	positif	8 mois	non	s.o	s.o

A11	positif	1 mois	oui	1 mois	rituximab
A12	positif	2 mois	non	s.o	s.o
A13	positif	2 mois	non	s.o	s.o
A14	positif	2 mois	non	s.o	s.o
A15	positif	1 mois	non	s.o	s.o
A16	positif	9 mois	non	s.o	s.o
A17	positif	2 mois	non	s.o	s.o
A18	positif	6 mois	non	s.o	s.o
Patients non traités avec les IgIV et qui sont VEB positifs par qPCR après greffe					
(n = 3), ≤ 3000 copies/ml et ≥ 3000 copies/ml					
A38	positif	1 mois	non	s.o	s.o
A39	positif	3 mois	non	s.o	s.o
A40	positif	1 mois	non	s.o	s.o

Légende: s.o = sans objet

Annexe III: Infection à CMV et autres infections chez les 49 enfants greffés de cellules souches hématopoïétiques

Patients	CMV qPCR (positif ou négatif)	mois post-greffe au moment du CMV qPCR	Traitement anti-CMV	Autres infections post-greffe	mois post-greffe au moment de ces infections
Patients traités avec les IgIV et qui sont VEB positifs par qPCR après greffe (n = 18), ≤ 3000 copies/ml et ≥ 3000 copies/ml					
A1	négatif	s.o	s.o	négatif	s.o
A2	négatif	s.o	s.o	négatif	s.o
A3	positif	1 mois	ganciclovir	non	s.o
A4	négatif	s.o	s.o	varicelle	6 ans
A5	positif	1 mois	ganciclovir	HSV-1	
A6	positif	9 mois	ganciclovir et foscarnet	Rotavirus	1ere année de greffe
A7	négatif	s.o	s.o	BKV	s.o
A8	négatif	s.o	s.o	négatif	s.o
A9	négatif	s.o	s.o	négatif	s.o

A10	négatif	s.o	s.o	BKV et parvovirus	1 mois
A11	Positif	1 mois	ganciclovir, valaciclovir et foscarnet	HSV	s.o
A12	négatif	s.o	s.o	négatif	s.o
A13	négatif	s.o	s.o	négatif	s.o
A14	positif	1 mois	foscarnet	Parainfluenza3 et VRS	s.o
A15	négatif	s.o	s.o	VRS	3 jours
A16	négatif	s.o	s.o	Parainfluenza 3 et rotavirus	1 semaine et 3 mois respectivement
A17	négatif	s.o	s.o	Adénovirus, VZV et Influenza A	2, 7 et 12 mois respectivement
A18	négatif	s.o	s.o	VZV	3 mois

Patients traités avec les IgIV et qui sont VEB négatifs par qPCR après greffe (n = 19)					
A19	négatif	s.o	s.o	Influenza	15 mois
A20	négatif	s.o	s.o	Picornaviridae et HSV-1	1 jour et 2 mois respectivement
A21	négatif	s.o	s.o	Adénovirus, HHV-6, HSV- 1 et Rotavirus	11, 5, 1 et 2 mois respectivement
A22	négatif	s.o	s.o	HHV-7	15 jours
A23	négatif	s.o	s.o	Rotavirus et VZV	4 et 6 mois respectivement
A24	négatif	s.o	s.o	Papovavirus, Rotavirus, et VZV	2 semaines, 1 et 2 mois respectivement
A25	négatif	s.o	s.o	Papovavirus Rotavirus et VZV	3 semaines, 2 et 11 mois respectivement

A26	négatif	s.o	s.o	Papovavirus, HHV-6, HHV- 7 et VZV	1 mois
A27	positif	2 semaines	foscarnet	non	s.o
A28	positif	2 semaines	foscarnet	non	s.o
A29	négatif	s.o	s.o	BKV, VZV et Adénovirus	1, 2 et 4 mois respectivement
A30	négatif	s.o	s.o	non	na
A31	négatif	s.o	s.o	RSV et Rotavirus	3 et 7 mois
A32	négatif	s.o	s.o	Adénovirus et H1N1	2 et 10 mois respectivement
A33	positif	2 mois	ganciclovir et foscarnet	HHV-6, Adénovirus et Rotavirus	6, 3 et 8 mois respectivement
A34	positif	14 jours	ganciclovir	non	s.o
A35	négatif	s.o	s.o	BKV, HHV-6, Rotavirus, Papovavirus et Adénovirus	20 jours, 6 mois, 5 jours, 2 et 8 mois respectivement

A36	négatif	s.o	s.o	HHV-6 et HHV-7	1 mois
A37	négatif	s.o	s.o	HHV-6	8 mois
Patients non traités avec les IgIV et qui sont VEB positifs par qPCR après greffe (n = 3), ≤ 3000 copies/ml et ≥ 3000 copies/ml					
A38	négatif	s.o	s.o	non	s.o
A39	négatif	s.o	s.o	non	s.o
A40	positif	s.o	fanciclovir	Rotavirus, <i>C-difficile</i> et HSV-1	
Patients non traités avec les IgIV et qui sont VEB négatifs par qPCR après greffe (n = 9)					
A41	négatif	s.o	s.o	non	s.o
A42	négatif	s.o	s.o	non	s.o
A43	négatif	s.o	s.o	VZV et H1N1	6 mois et 10 mois respectivement

A44	négatif	s.o	s.o	Influenza B et HHV-6	1 jour et 7 mois respectivement
A45	négatif	s.o	s.o	non	s.o
A46	négatif	s.o	s.o	non	s.o
A47	négatif	s.o	s.o	non	s.o
A48	négatif	s.o	s.o	Coronavirus et Calicivirus	2 et 3 mois respectivement
A49	négatif	s.o	s.o	non	s.o

Légende:

s.o = sans objet

HSV = Herpes Simplex Virus (virus herpès simplex)

HHV = Herpesvirus humain

VZV = Varicella Zoster Virus (virus de la varicelle et du zona)

BKV = Virus BK

VRS = Virus respiratoire syncytial

Annexe IV: Prophylaxie GVH (reaction du greffon contre l'hôte), traitements antiviraux et survie chez les 49 enfants greffés de cellules souches hématopoïétiques.

Patients	Prophylaxie GVH	GVH (aiguë ou chronique)	période post-greffe au moment de la GVH	Traitement antiviral	Vivant (V) ou décédé (D)
Patients traités avec les IgIV et qui sont VEB positifs par qPCR après greffe (n = 18), ≤ 3000 copies/ml et ≥ 3000 copies/ml					
A1	Cyclosporine, ATG et corticostéroïdes	non	s.o	Acyclovir, famciclovir et cidofovir	V
A2	ATG, cyclosporine et méthylprednisolone	Oui, chronique cutanée	11 mois	Acyclovir et famciclovir	V
A3	Cyclosporine et ATG	non	s.o	Acyclovir et famciclovir	V
A4	ATG, cyclosporine et stéroïdes	Oui, chronique	5 ans	Acyclovir	V
A5	ATG, cyclosporine et corticostéroïdes	non	s.o	Acyclovir et foscarnet	V
A6	ATG, cyclosporine et stéroïdes	non	s.o	Acyclovir	V

A7	ATG, cyclosporine et stéroïdes	non	s.o	Famciclovir et acyclovir	D
A8	ATG, cyclosporine et stéroïdes	non	s.o	Acyclovir	D
A9	ATG et cyclosporine	Oui, aiguë	4 mois	Acyclovir	D
A10	ATG, cyclosporine et prednisolone	non	s.o	Acyclovir	V
A11	ATG, cyclosporine et corticoïdes	non	s.o	Acyclovir et famciclovir	V
A12	ATG, cyclosporine et prednisolone	non	s.o	Acyclovir et famciclovir	V
A13	ATG, cyclosporine et corticoïdes	non	s.o	Acyclovir, famciclovir et foscarnet	V
A14	ATG, cyclosporine, corticoïdes et tacrolimus	non	s.o	Foscarnet et ribavirine	D
A15	ATG et méthotrexate	non	s.o	Ribavirine	V
A16	ATG, cyclosporine et corticoïdes	non	s.o	Acyclovir, ribavirine et palivizumab	V

A17	ATG, cyclosporine et corticoïdes	non	s.o	Acyclovir, oseltamivir et famciclovir	V
A18	ATG, cyclosporine et corticoïdes	non	s.o	Acyclovir et famciclovir	V
Patients traités avec les IgIV et qui sont VEB négatifs par qPCR après greffe (n = 19)					
A19	Cyclosporine et tacrolimus	non	s.o	Acyclovir et famciclovir	V
A20	Cyclosporine et méthotrexate	Oui, aiguë et chronique	à 23jours et à 20 mois respectivement	Acyclovir, cidofovir et famciclovir	D
A21	Cyclosporine et méthotrexate	non	s.o	Acyclovir, gancyclovir et famciclovir	D
A22	ATG, cyclosporine et méthotrexate	non	s.o	Acyclovir	V
A23	ATG, cyclosporine et méthotrexate	non	s.o	Acyclovir	V
A24	ATG, cyclosporine et méthotrexate	non	s.o	Acyclovir	V

	stéroïdes				
A25	ATG, cyclosporine et méthotrexate	non	s.o	Acyclovir et famciclovir	V
A26	ATG, cyclosporine et corticoïdes	Oui, cutanée grade 1	5 mois	Acyclovir et famciclovir	D
A27	ATG, cyclosporine et corticoïdes	non	s.o	Acyclovir	V
A28	ATG, cyclosporine	non	s.o	Acyclovir	V
A29	ATG, cyclosporine et corticoïdes	non	s.o	Acyclovir et famciclovir	V
A30	ATG, cyclosporine et corticoïdes	non	s.o	Acyclovir et palivizumab	V
A31	ATG, cyclosporine	non	s.o	Acyclovir	V
A32	ATG, cyclosporine et corticoïdes	Oui, grade 1	2 mois	Acyclovir, famciclovir et oseltamivir	V
A33	ATG, cyclosporine et corticoïdes	Oui, aiguë	6 mois	Acyclovir, infliximab, cidofovir et dacluzimab	D

A34	ATG, cyclosporine et corticoïdes	non	s.o	Acyclovir	V
A35	ATG, cyclosporine et corticoïdes	non	s.o	Acyclovir et famciclovir	V
A36	ATG, cyclosporine, corticoïdes et tacrolimus	non	s.o	acyclovir	D
A37	ATG, cyclosporine et corticoïdes	non	s.o	Acyclovir et foscarnet	V
Patients non traités avec les IgIV et qui sont VEB positifs par qPCR après greffe (n = 3), ≤ 3000 copies/ml et ≥ 3000 copies/ml					
A38	cyclosporine	non	s.o	Acyclovir et famciclovir	V
A39	cyclosporine	Oui, grade 1	1 mois	Gancyclovir	V
A40	cyclosporine, méthotrexate	Oui, chronique	inconnu	Acyclovir	V
Patients non traités avec les IgIV et qui sont VEB négatifs par qPCR après greffe (n = 9)					
A41	Cyclosporine et méthotrexate	non	s.o	Acyclovir	V
A42	Cyclosporine et méthotrexate	non	s.o	Famciclovir et acyclovir	D

A43	Cyclosporine et méthotrexate	oui	5 mois	Famciclovir et acyclovir	V
A44	cyclosporine	Oui, aiguë	5 mois	acyclovir	D
A45	Cyclosporine et méthotrexate	Oui, chronique	7 mois	Acyclovir et famciclovir	V
A46	Rien reçu (car greffe identique)	non	s.o	Acyclovir	V
A47	Corticoïdes, cyclosporine et méthotrexate	non	s.o	Acyclovir et famciclovir	V
A48	ATG, corticoïdes et cyclosporine	non	s.o	palivizumab	V
A49	ATG, corticoïdes et cyclosporine	non	s.o	Acyclovir	V

Légende: s.o = sans objet, ATG = Anti-Thymocyte Globuline.