

CAHIER DE

Formation

Biologie médicale

N°36

2006

Le virus Epstein-Barr et les marqueurs de l'infection



BIOFORMA

FORMATION CONTINUE DES BIOLOGISTES



Chère Consœur, Cher Confrère,

Voici un nouveau cahier de formation, le premier diffusé pour cette année 2006.

La prévalence statistique des infections par l'EBV étant remarquablement élevée, la présence du virus au stade latent après une primo-infection, amènent tout particulièrement cette pathologie à constituer un terrain d'activités intenses au laboratoire.

Le dialogue entre le clinicien et le biopathologiste est indispensable pour décider de la série des analyses à effectuer, pour en contrôler le suivi et fixer le traitement le plus approprié.

Les méthodes les plus récentes d'analyse permettent aujourd'hui de plonger au cœur des réactions croisées liées à l'activité de l'EBV.

Ce Cahier, numéro 36, préparé par une équipe scientifique de haut niveau travaillant depuis trente ans sur le sujet, est aussi un manuel pratique de mise à niveau des connaissances.

Vous pourrez également le consulter sur le site bioforma.net, comme la plupart des ouvrages déjà parus.

Nous vous souhaitons bonne réception de ce document et vous prions d'accepter, Chères Consoeurs et Chers Confrères, nos cordiales et confraternelles salutations.

230, boulevard Raspail
75014 Paris

Tél. 01.56.54.39.39
Fax : 01.56.54.39.30

site internet : www.bioforma.net
E-mail : bioforma@wanadoo.fr

Association régie par la loi de 1901
siret : 391 155 744 00025
code APE : 8040

Adrien BEDOSSA
Président

Liste des auteurs

- **Jean-Marie Seigneurin**
jmseigneurin@chu-grenoble.fr

- **Samira Fafi-Kremer**
samira.fafi-kremer@chru-strasbourg.fr

- **Monique Baccard**
mbaccard@chu-grenoble.fr

- **Patrice Morand**
pmorand@chu-grenoble.fr

- *Laboratoire de Virologie
CHU – Hôpital Michallon - BP 217
38043 Grenoble Cedex 9 France
tél 33 (0)4 76 76 56 04
fax 33 (0)4 76 76 52 28*

Ce texte, dont l'objectif est essentiellement la compréhension du diagnostic biologique des maladies associées à l'EBV, n'aurait pu être écrit sans une collaboration et des échanges permanents avec les cliniciens, les biologistes et les chercheurs depuis près de 30 ans. Je tiens ici à les remercier.

Je pense particulièrement aux pionniers R. Sohier, G. de Thé, Cl. Desgranges, G. Lenoir, A. Sergeant, I. Joab, D. Nadal, et à leurs élèves et/ou successeurs représentés dans les groupes EBV/lymphomes à l'ANRS et dans le réseau INSERM EBV en cours de création.

Jean-Marie Seigneurin
Grenoble, mars 2006

EBV

Le virus Epstein-Barr et les marqueurs de l'infection

Ouvrage réalisé sous la direction du
Professeur Jean-Marie Seigneurin

ABRÉVIATIONS

Ac : anticorps	LCR : liquide céphalorachidien
ADN: acide désoxyribonucléique	LMNH : lymphome malin non hodgkinien
Ag : antigène	LMP : <i>latent membrane protein</i>
ARNm : acide ribonucléique messenger	Ly B : lymphocyte B
CAEBV : <i>chronic active EBV disease</i>	MH : maladie de Hodgkin
CMV : cytomégalovirus	MNI : mononucléose infectieuse
cp : copies de génome	NFS : numération formule sanguine
CTL : lymphocytes T cytotoxiques	NK : <i>Natural killer</i>
EA : <i>early antigen</i>	NPC : carcinome du nasopharynx
EBERs : <i>Epstein-Barr encoded small RNAs</i>	ORF : <i>open reading frame</i>
EBNA : <i>EB nuclear antigen</i>	pb : paire de bases
EBV : Epstein-Barr Virus	PBD : Paul-Bunnell-Davidsohn
ELISA : <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>	PBMC : <i>peripheral blood mononuclear cell</i>
FRET : <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>	PCR : <i>polymerase chain reaction</i>
gp : glycoprotéine	RS : Reed-Sternberg
HLA : <i>human leukocyte antigen</i>	RT-PCR : <i>reverse transcriptase-PCR</i>
HHV8 : Herpesvirus humain de type 8	SLPT (ou PTLT) : syndrome lymphoprolifératif post-transplantation
HSV : virus herpès simplex	TNF : <i>tumor necrosis factor</i>
Ig : immunoglobuline	TR : <i>terminal repeat</i>
IL : interleukine	VCA : <i>viral capsid antigen</i>
kb : kilobases	VIH : virus d'immunodéficience humaine
kDa : kilodaltons	VPN : valeur prédictive négative
LB : lymphome de Burkitt	VPP : valeur prédictive positive
LCL : lignées cellulaires lymphoblastoïdes	VZV : virus varicelle-zona

SOMMAIRE

Introduction.....	8
-------------------	---

CHAPITRE I Le virus 9

un virus hors du commun !

- Découverte de l'EBV et de son rôle.....	10
<i>l'EBV est mis en évidence dans des cultures de cellules tumorales de lymphome de Burkitt</i>	
- Caractéristiques du virus.....	11
<i>un herpesvirus aux propriétés de latence et d'immortalisation très particulières</i>	
- Gènes et protéines de l'EBV.....	13
<i>ou le cycle latent contre le cycle lytique !</i>	
1. protéines de la latence.....	13
2. protéines du cycle productif lytique.....	16
- Réplication productive et cycle lytique.....	17
<i>la fabrication des nouveaux virions conduit à la destruction de la cellule</i>	
- Immortalisation, transformation et lignées lymphoïdes.....	20
<i>un virus qui fait proliférer indéfiniment les lymphocytes B qu'il infecte</i>	

CHAPITRE II Pouvoir pathogène chez l'homme 23

ou le cycle productif avec la persistance virale !

- Histoire de la mononucléose infectieuse (MNI).....	24
<i>une maladie infectieuse hématologique provoquée en grande partie par la réponse immunitaire</i>	
- Rôle causal de l'EBV dans la MNI.....	25
<i>un virus des années 1960 pour une maladie des années 1920</i>	
- Epidémiologie.....	26
<i>la MNI assaille entre 15 et 30 ans</i>	
- Transmission du virus.....	28
<i>ou tout est dans la salive !</i>	

SOMMAIRE

- Physiopathologie.....	29
<i>L'intrication étroite entre le virus et les lymphocytes B</i>	
1. cellules cibles de l'EBV	29
2. dans les amygdales... ..	31
3. dans le sang périphérique... ..	32
4. la charge virale dans la salive et le sang.....	34
- Réponse immunitaire	35
<i>une réponse généralisée mais heureusement transitoire</i>	
1. les anticorps	35
2. l'immunité cellulaire	37
- Manifestations cliniques.....	38
<i>de la mononucléose infectieuse simple à la primo-infection à EBV complexe</i>	
1. MNI classique	38
2. MNI atypique ou compliquée	41
3. cas particuliers.....	44
- Infection persistante normale et pathologique	45
<i>de la coexistence pacifique aux cancers associés à l'EBV</i>	
1. porteur sain.....	46
2. lymphome de Burkitt.....	48
3. syndrome lymphoprolifératif post-transplantation	50
4. lymphome de Hodgkin	55
5. lymphome malin non hodgkinien des patients VIH-positifs.....	58
6. carcinome indifférencié du nasopharynx	60

CHAPITRE III Diagnostic biologique et marqueurs de l'infection 65

du diagnostic étiologique jusqu'au suivi thérapeutique, et au-delà vers le dépistage et les marqueurs d'association

- Méthodes sérologiques.....	66
<i>tout est dans le profil !</i>	
1. les lignées lymphoblastoïdes comme sources d'antigènes EBV dès l'origine.....	66
2. anticorps hétérophiles	76
- Diagnostic moléculaire.....	78
<i>il repose aujourd'hui avant tout sur la PCR en temps réel</i>	
1. différents principes.....	79
2. extraction	82
3. trousse commercialisées	83
- Culture du virus.....	85
<i>comment un virus extrêmement banal dans la bouche se comporte en agent extrêmement transformant dans les cellules in vitro</i>	

CHAPITRE IV Applications 87

des anticorps et des génomes

- Diagnostic de la MNI.....	88
<i>un diagnostic positif qui doit rassurer</i>	
- Marqueurs viraux et cancers associés à l'EBV.....	93
<i>anticorps, génome, charge virale : en association ou non</i>	
- Récapitulatif.....	94
<i>ou dans la pratique quotidienne</i>	
- Cas biocliniques	96
<i>c'est difficile !</i>	
1. cas sérologiques QCM	96
2. cas clinicovirologiques	99
3. réponses	102
4. une MNI fatale.....	107

Références bibliographiques.....	111
---	------------

Introduction

Le virus Epstein-Barr (EBV) infecte la grande majorité de la population mondiale, souvent sous la forme d'une infection asymptomatique chez l'enfant. Chez l'adolescent et l'adulte jeune, cette primo-infection s'accompagne fréquemment d'un ensemble de signes cliniques que l'on regroupe sous le terme de mononucléose infectieuse (MNI). Le virus persiste ensuite dans l'organisme pendant toute la vie, à l'état latent dans des lymphocytes B, mais aussi sous forme de particules virales infectieuses excrétées au niveau de l'oropharynx et dans la salive. Cette réactivation virale, intermittente chez le sujet immunocompétent, est accrue grandement lors des états d'immunodépression.

L'EBV possède la propriété remarquable d'induire la prolifération continue des lymphocytes B infectés. Les principaux signes cliniques de la MNI sont provoqués par l'intense réaction immunitaire dirigée contre cette lymphoprolifération B EBV-induite. En revanche, chez l'immunodéprimé, cette prolifération peut aboutir à un lymphome malin. Par ailleurs, le virus est impliqué dans la pathogénie de plusieurs cancers aux dépens des lymphocytes ou des cellules épithéliales, comme le lymphome de Burkitt, le carcinome du nasopharynx, ou le lymphome de Hodgkin.

Le diagnostic de la MNI repose avant tout sur la sérologie spécifique de l'EBV. Au contraire, dans le cas des maladies malignes associées à l'EBV, la détection du génome viral et/ou sa quantification sont les analyses les plus importantes.

Le virus

un virus hors du commun !

CHAPITRE I

Découverte de l'EBV et de son rôle

L'EBV est mis en évidence dans des cultures de cellules tumorales de lymphome de Burkitt

Dans les années 1950, un chirurgien anglais, Denis Burkitt, décrit des cas de lymphomes à localisation maxillaire chez les enfants d'Afrique de l'Est. Il remarque que ce type de lymphome est plus fréquent dans les régions d'Afrique équatoriale où sévit le paludisme. Devant ces données épidémiologiques et cliniques, D. Burkitt suggère que l'étiologie de ces lymphomes est infectieuse. Il envisage même le rôle d'un virus. A la suite d'une conférence qu'il donne à l'université de Bristol, Anthony Epstein et son étudiante Yvonne Barr s'intéressent à l'hypothèse de l'étiologie infectieuse du lymphome, et proposent une collaboration pour obtenir des biopsies tumorales. L'équipe d'Epstein réussit à mettre en culture les cellules tumorales dérivées du lymphome, et en 1964, Epstein, Achong et Barr découvrent en microscopie électronique des particules virales dans ces lignées cellulaires (17). Ces virus, morphologiquement similaires aux herpesvirus connus à cette époque, étaient en fait complètement différents du point de vue biologique et antigénique. Le premier gammaherpesvirus humain, l'EBV, fut ainsi découvert dans des tumeurs de lymphome de Burkitt africain.

Caractéristiques du virus

un herpesvirus aux propriétés de latence et d'immortalisation très particulières

L'EBV, ou herpesvirus humain de type 4 (HHV-4), appartient donc à la famille des Herpesviridae, virus composés d'une capsidie icosaédrique entourée d'une enveloppe dérivée des membranes cellulaires dans laquelle sont insérées des glycoprotéines virales (figure 1). Cette structure externe rend le virus fragile dans le milieu extérieur. Sa taille est d'environ 150 nm.

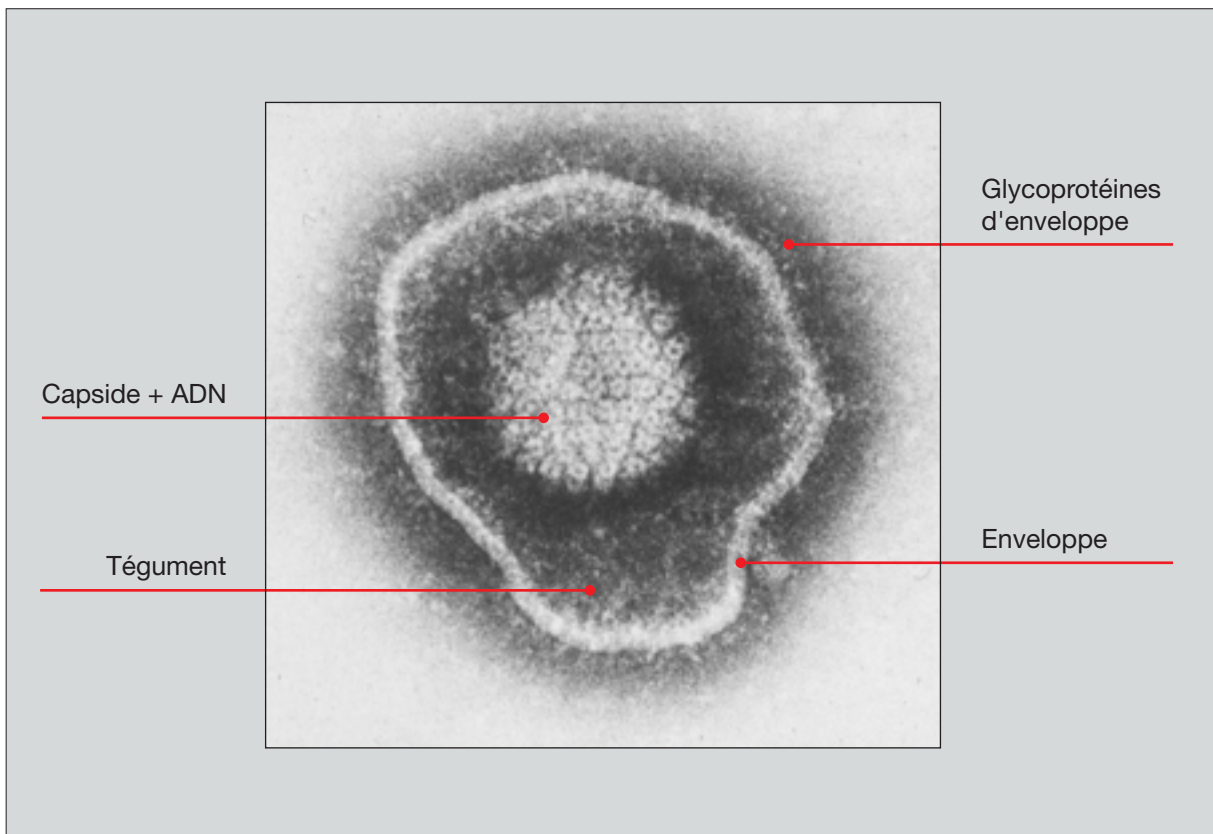


Figure 1 : Structure du virus en microscopie électronique (coloration négative)

Le génome, une molécule d'ADN double-brin d'un peu plus de 172 000 paires de bases, a une capacité de codage de 100 à 150 protéines. Il est divisé en plusieurs domaines uniques, séparés par des répétitions internes, et chaque extrémité comporte des répétitions terminales qui permettent la circularisation du génome dans certaines circonstances lors de la réplication de l'ADN. A l'intérieur du virion, la molécule d'ADN se présente toujours sous forme linéaire (figure 2).

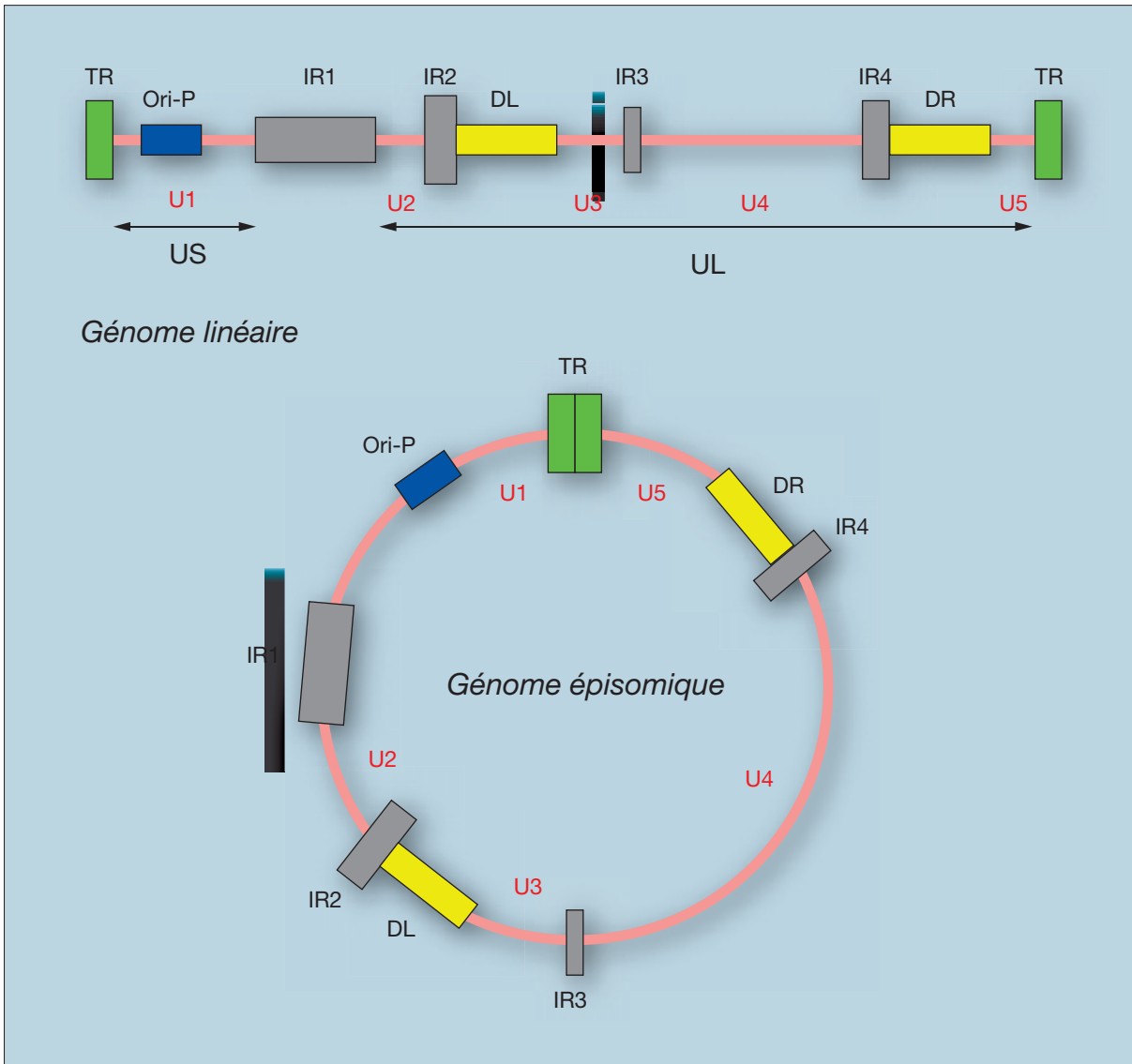


Figure 2 : Représentation schématique du génome EBV.

L'analyse de la séquence entière de la souche prototype EBV B95-8 (virus produit par la lignée lymphoïde B95-8) a permis l'identification d'une centaine de cadres de lecture ouverts (open reading frame ORF, [tableau I](#)). Les ORFs de l'EBV sont répertoriés d'après les fragments de restriction obtenus avec l'enzyme BamH1. Les gènes EBV sont nommés selon le fragment de restriction BamH1 dans lequel ils se trouvaient, l'orientation de leur transcription (leftward ou rightward), et la phase de lecture (frame) ; par exemple : BamH1 N leftward frame 1 s'écrit BNLF1.

Gènes et protéines de l'EBV

ou le cycle latent contre le cycle lytique !

L'EBV code d'une part des protéines associées à la latence virale et d'autre part des protéines responsables de la production des nouveaux virions et du cycle lytique.

1. Protéines de la latence

L'EBV établit une infection latente dans les lymphocytes B qu'il infecte, par l'expression d'un nombre restreint de gènes viraux. Ces protéines virales associées à la latence ainsi que leurs fonctions actuellement connues sont répertoriées dans le [tableau II](#). Elles comprennent 6 protéines nucléaires (EBNAs) et 3 protéines membranaires (LMPs) ; de plus 2 gènes sont transcrits en grande quantité, (Epstein-Barr Encoded small RNAs, ou EBERs), mais non traduits en protéines. L'analyse des gènes mutés ou délétés a montré que certaines de ces protéines sont indispensables à la transformation cellulaire (ou immortalisation), en particulier EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3C et LMP-1. C'est dans ces protéines de latence que l'on a pu mettre en évidence une certaine diversité génétique au sein des différentes souches virales isolées. Le gène EBNA-2, puis les gènes EBNA-3 et les EBERs montrent un polymorphisme qui permet de classer les isolats en 2 types viraux : EBV-1 et EBV-2 (anciennement EBNA-2A et EBNA-2B).

Tableau I : Nomenclature des protéines de l'EBV

Noms	fonctions
BALF1	inhibiteur de l'apoptose
BALF2	protéine majeure de fixation de l'ADN simple brin
BALF3	terminase
BALF4 gp115 GP110 precursor	glycoprotéine B
BALF5	ADN polymérase ADN-dépendante
BaRF1	petite sous-unité de la ribonucléotide réductase
BARF1 p33 early prot	colony-stimulating factor 1
BBLF1	inconnues
BBLF2	inconnues
BBLF3	inconnues
BBLF4	protéine associée à l'helicase/primase
BBRF1	protéine mineure de la capsid
BBRF2	inconnues
BBRF3	glycoprotéine M
BCLF1 MCP	protéine majeure de la capsid
BCRF1	inconnues
BCRF1 (precursor)	interleukine virale -10
BDLF1 VP23	protéine mineure de la capsid
BDLF2	inconnues
BDLF3 mb antigen gp85	glycoprotéine
BDLF4	inconnues
BDRF1 scaffold prot	terminase
BERF2A/B EBNA-3B/4 nuclear prot	antigène nucléaire de latence
BERF3/4 EBNA-3C/4B EBNA-6	antigène nucléaire de latence
BFLF1 major envelope gp	protéine de clivage / compactage de l'ADN
BFLF2	phosphoprotéine nucléaire?
BFRF1	protéine de tégument
BFRF2	capsid ?
BFRF3 VP26, capsid prot, VCA p18	protéine de capsid
BGLF1	inconnues
BGLF2	protéine de tégument
BGLF3	inconnues
BGLF4	protéine kinase Ser/Thr
BGLF5	exonucléase alcaline
BGRF1 BDRF1	protéine de compactage de l'ADN
BHRF1 EA-R nuclear antigen	composant du complexe antigène précoce
BILF1 mb prot	inconnues
BILF2 mb gp 55-78	glycoprotéine
BKRF1 EBNA-1	EBNA-1 (basse complexité)

Tableau I : (suite)

Noms	fonctions
BKRF2 (precursor)	glycoprotéine L
BKRF3	uracil-ADN glycosylase
BKRF4	inconnues
BLLF1 MA gp340/220	glycoprotéine majeure de membrane
BLLF2	inconnues
BLLF3	dUTPase
BLRF1	Protéine de membrane, glycoprotéine N
BLRF2	inconnues
BLRF3	antigène nucléaire de latence
BMLF1 diffuse early antigen EB2	régulateur post-transcriptionnel
BMRF1 EA-D	
BMRF2	inconnues
BNLF1 LMP-1 P63	Protéine membranaire de latence LMP1
BNRF1 mb antigen p140	protéine de tégument
BOLF1 capsid assembly prot	protéine de tégument
BORF1 capsid assembly prot	Protéine de maturation et d'assemblage de l'ADN
BORF2	réductase ribonucléotidique
BPLF1	protéine de tégument
BRLF1	activateur de transcription Rta
BRLF1	domaine bZIP
BRRF1	inconnues
BRRF2	inconnues
BSLF1	helicase/primase
BSRF1	inconnues
BTRF1	inconnues
BVRF1 EC-RF2	protéine de tégument du virion
BVRF2 P40 EC-RF3(a)	protéinase/protéine d'échafaudage de la capsid
BWRF1 (12 copies) / BCRF2	inconnues
BXLF1	thymidine kinase
BXLF2 gp85 precursor	glycoprotéine H
BXRF1 EC-RF1	protéine de fusion
BYRF1 EBNA2	EBNA2
BZLF1 Zebra EB1	protéine transactivatrice
BZLF2	glycoprotéine
EBNA1	antigène nucléaire
EBNA3A (BLRF3+BERF1)	
LF2	inconnues
LF3	inconnues
LMP2A/B	protéine membranaire de latence 2A/B

Tableau II : Nomenclature des protéines de latence de l'EBV et leurs principales fonctions

Protéines virales	Latence	Localisation	Fonctions principales
EBNA1	I, II, III	Nucléaire	Maintien du génome viral sous forme épisomale
EBNA2	III	Nucléaire	Immortalisation des LyB, activateur de transcription cellulaire et virale
EBNA3A (ou EBNA3)	III	Nucléaire	Répresseur de l'action d'EBNA2, se lie à RBP-Jkappa, participe à l'immortalisation des LyB
EBNA3B (ou EBNA4)	III	Nucléaire	Inconnue, se lie à RBP-Jkappa
EBNA3C (ou EBNA6)	III	Nucléaire	Répresseur de l'action d'EBNA2, action sur le cycle cellulaire, se lie à RBP-Jkappa, participe à l'immortalisation
EBNALP (ou EBNA5)	III	Nucléaire	Cofacteur de EBNA2, interagit avec p53 et Rb
LMP1	II, III	Membranaire	Oncogène majeur Transducteur de signaux via TRAF vers NF-KB et JNK, induit bcl2
LMP2A	II, III	Membranaire	Prévient la réactivation virale
LMP2B	II, III	Membranaire	Inconnue

2. Protéines du cycle productif lytique

La fabrication d'une particule virale nécessite la synthèse de protéines dites tardives (protéines de structure), précédée obligatoirement par celle de protéines dites précoces et de protéines très précoces (ou "précoces immédiates"). Ces phases d'expression forment une cascade, même si elles peuvent se chevaucher en partie.

Réplication productive et cycle lytique

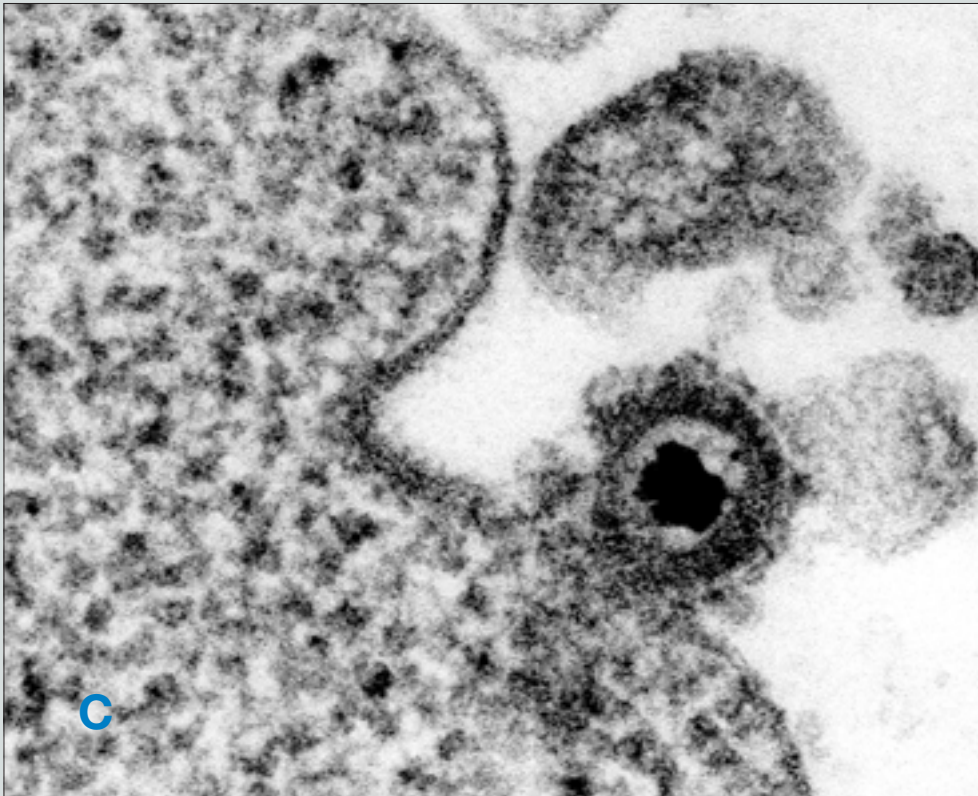
La fabrication des nouveaux virions conduit à la destruction de la cellule

Le cycle de multiplication de l'EBV dans la cellule suit le schéma classique qui comporte les étapes d'attachement et de pénétration (figure 3), puis la synthèse des macromolécules (acides nucléiques et protéines), enfin l'assemblage des nucléocapsides, l'enveloppement (figure 4) et la libération des virions infectieux. Toutes ces étapes n'ont pu être étudiées *in vitro* que dans le système cellulaire des lymphocytes B.

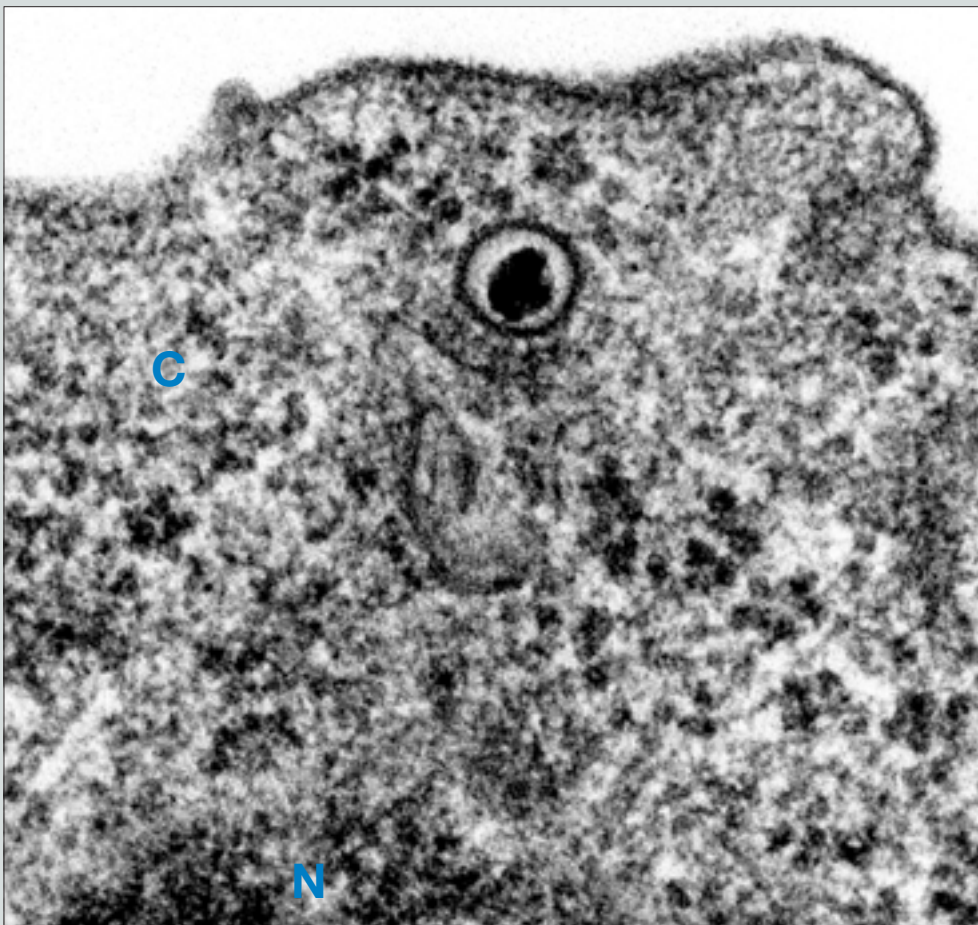
La particule virale s'attache spécifiquement à la surface de la cellule grâce à l'interaction entre la gp 350/220 de l'enveloppe virale et la molécule CD21 présente sur la membrane plasmique cellulaire. Ce récepteur CD21 (ou CR2), un récepteur physiologique du complément, fait partie de la superfamille des immunoglobulines et est exprimé sur les lymphocytes B matures. La fixation du virus sur CD21 induit les signaux initiaux d'activation des cellules. Une fois attachée, l'enveloppe virale fusionne avec la membrane cellulaire et la pénétration requiert l'interaction du complexe gp 85-gp 42. L'EBV peut utiliser comme corécepteurs les molécules HLA-DR, -DP ou -DQ (25). La nucléocapside, libérée dans le cytoplasme, migre en direction des pores nucléaires et se désintègre progressivement (décapsidation) pour laisser la molécule d'ADN viral seule entrer dans le noyau.

Les synthèses aboutissant ensuite à la fabrication de nouveaux virions ne se produisent que dans un petit nombre de lymphocytes B. Les gènes "très précoces" du génome viral sont transcrits, notamment les facteurs de transcription nucléaires comme BZLF1 - ou EB1 (Zebra)- et BRLF1, ce qui conduit à l'activation de l'expression des gènes précoces. Les produits de ces derniers, comme l'ADN-polymérase virale et d'autres enzymes responsables de la synthèse de l'ADN, répliquent l'ADN à partir de l'origine de réplication "lytique" (ou Ori-Lyt).

Figure 3 : cycle de multiplication du virus : phases précoces (microscopie électronique. coupes)
cliché Centre International de Recherche sur le Cancer, J.M. Seigneurin

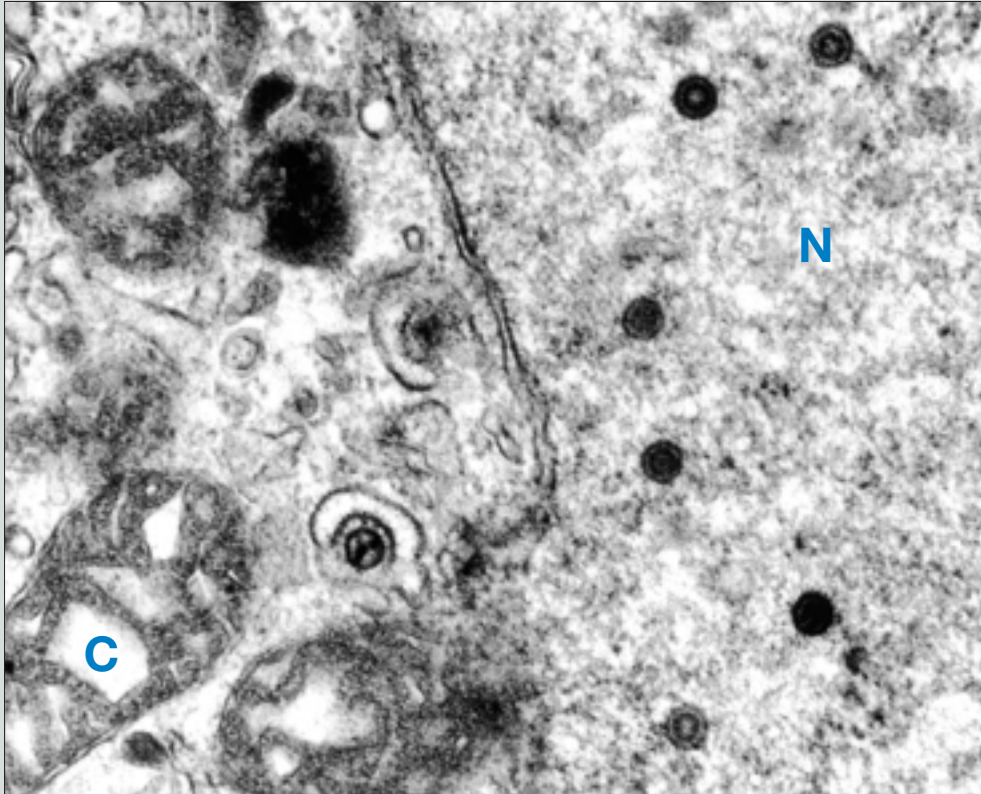


Attachement d'un virion EBV à la surface d'un lymphocyte B

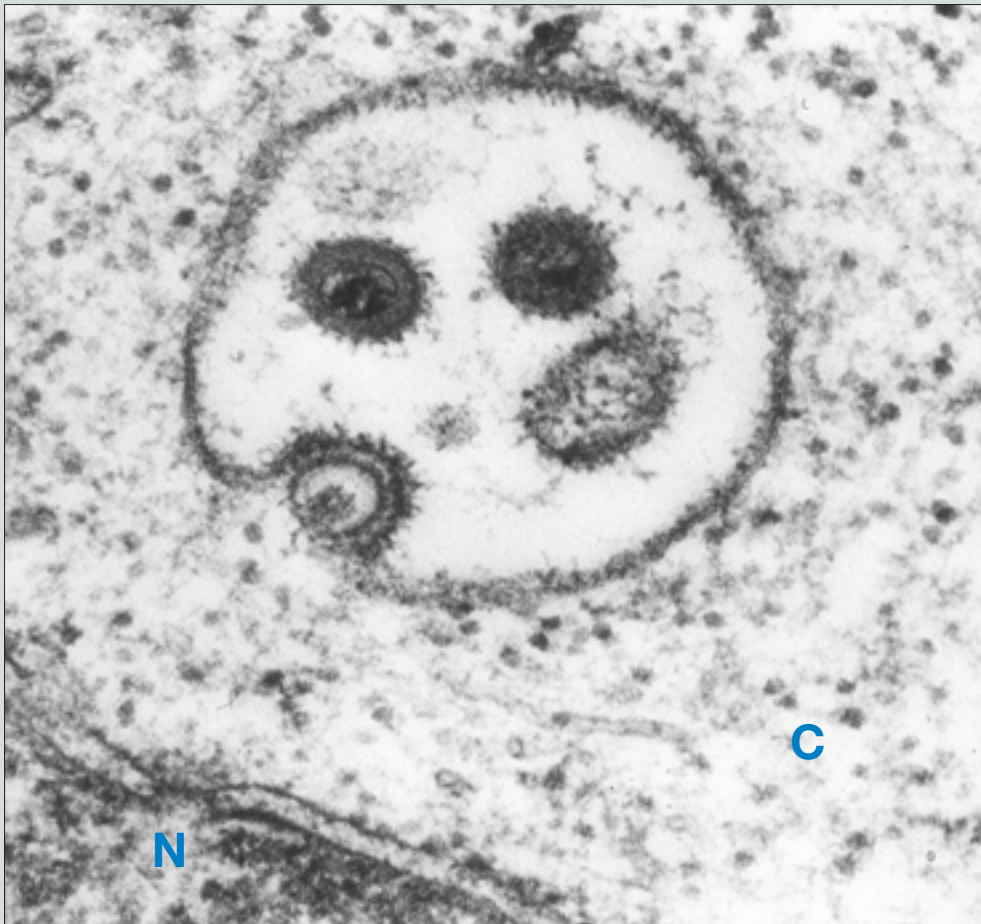


Pénétration et migration de la nucléocapside dans le cytoplasme

Figure 4 : cycle de multiplication du virus : phases tardives (microscopie électronique. coupes)
cliché Centre International de Recherche sur le Cancer, J.M. Seigneurin



Synthèse des nouvelles nucléocapsides dans le noyau



Bourgeonnement des nucléocapsides dans les vacuoles intra-cytoplasmiques

C'est à partir de ces nouvelles molécules linéaires de génome EBV que les gènes tardifs sont transcrits : les protéines synthétisées sont celles de la capsidite et des glycoprotéines de l'enveloppe. La molécule de génome est incorporée à l'intérieur d'une capsidite presque terminée pour constituer la nucléocapsidite. Cet assemblage a lieu dans le noyau cellulaire et nécessite une protéase codée par le virus. Les nucléocapsidites rencontrent, au cours de leur migration en direction de la surface de la cellule, les membranes nucléaires et/ou intracytoplasmiques dans lesquelles elles bourgeonnent. L'acquisition de l'enveloppe précède la libération du virion dans le milieu extracellulaire et la lyse de la cellule.

Immortalisation, transformation et lignées lymphoïdes

un virus qui fait proliférer indéfiniment les lymphocytes B qu'il infecte

Si le cycle productif que nous venons de voir est comparable à celui d'autres herpesvirus, l'immortalisation par l'EBV demeure une propriété remarquable et unique : c'est le plus puissant agent immortalisant les cellules de mammifères.

Dès une douzaine d'heures après la pénétration du virus dans le lymphocyte B, la protéine EBNA-2 est exprimée et active les gènes codant les LMPs ; la synthèse des marqueurs d'activation lymphocytaire CD21 et CD23 est induite. En 48 heures, l'expression de l'ensemble des gènes latents est achevée. La cellule progresse dans les phases G1, S et G2, et vers 72 heures entre en mitose. Pour que l'ADN viral soit constamment présent dans chaque cellule fille, il doit se répliquer de façon synchrone au dédoublement du génome cellulaire. C'est le rôle de la protéine EBNA-1 qui se lie à la seconde origine de réplication dite plasmidique (ou Ori-P) du génome EBV et l'active ; la stabilité du nombre de copies au cours des divisions cellulaires successives est donc assurée. Le génome viral se maintient en général sous forme extrachromosomique circulaire (= épisome) en plusieurs copies ; il peut parfois s'intégrer dans un chromosome cellulaire.

Ces lymphocytes B infectés prolifèrent indéfiniment et donnent naissance à une population "immortalisée" de cellules qu'on appelle lignée lymphoblastoïde. Le phénotype de ces cellules proliférantes est semblable à celui de lymphoblastes stimulés par un antigène ; mais surtout la plupart des caractères des lymphocytes B initiaux sont conservés.

On s'est beaucoup servi - et encore aujourd'hui - des lignées immortalisées pour étudier des caractères phénotypiques ou génotypiques particuliers que possèdent les lymphocytes B lors de certaines maladies. Dans ce cas, les lymphocytes du sang circulant du patient sont inoculés *in vitro* avec l'EBV produit par la lignée lymphoïde B95-8 : les cellules lymphoblastoïdes prolifèrent à l'infini et permettent de disposer de quantités très importantes de matériel cellulaire contenant l'anomalie à étudier. On peut faire produire également dans le milieu de culture des immunoglobulines humaines à spécificité anticorps définie (52).

Pouvoir pathogène chez l'homme

*ou le cycle productif
avec la persistance virale !*

CHAPITRE II

Il faut distinguer la mononucléose infectieuse (MNI) de la primo-infection à EBV qui, elle, n'est définie que depuis la découverte du virus et la mise au point de tests diagnostiques.

Histoire de la mononucléose infectieuse (MNI)

une maladie infectieuse hématologique provoquée en grande partie par la réponse immunitaire

Les 3 symptômes qui caractérisent la MNI, fièvre, angine et polyadénopathies, ont été décrits dès la fin du 19^{ème} siècle (51). Mais, c'est en 1920 que le terme de "mononucléose infectieuse" a été utilisé pour la première fois par deux médecins, Sprunt et Evans (54). Ils décrivent 6 patients hospitalisés pour fièvre, angine et adénopathies, avec présence de lymphocytes circulants anormaux faisant suspecter une leucémie. Mais devant la résolution spontanée des symptômes, ils concluent à une infection aiguë bénigne. La description des lymphocytes atypiques chez ce type de patients par Downey et McKinlay (16) en 1923 permet de définir la MNI comme une entité clinique distincte de la leucémie aiguë.

Quelques années plus tard, on suspecte *Listeria monocytogenes* comme agent étiologique de la MNI, car cette bactérie entraîne une mononucléose sanguine chez le lapin. Nyfelt isole cette bactérie chez 3 sur 33 patients et soutient cette hypothèse en 1932. A cette même date, Paul et Bunnell (41) décrivent au cours de la MNI la présence d'anticorps hétérophiles capables d'agglutiner les globules rouges de mouton. Cette découverte permit d'établir le diagnostic de la maladie de manière rapide et assez précise. Cependant, l'agent responsable de la MNI n'était toujours pas

connu à cette date. En 1939, Kolmer montre que *Listeria monocytogenes* ne possède pas d'antigènes réagissant avec les globules rouges de mouton. Deux années plus tard, Janeway et Dammin démontrèrent qu'au cours de la MNI, il n'y avait pas d'anticorps dirigés contre *L. monocytogenes*. Depuis, cette bactérie ne fut plus incriminée dans l'étiologie de la MNI. L'agent de la toxoplasmose a été ensuite suspecté puis "disqualifié" dans la MNI. Plusieurs investigations sur l'animal et l'homme suivirent pour tenter d'isoler l'agent pathogène, en vain.

Pendant ce temps, plusieurs équipes s'interrogeaient sur le mode de transmission de cette maladie. En 1955, Hoagland (30) observa un pic de MNI chez les étudiants de l'US Military Academy, environ 6 semaines après leur retour de vacances. Un questionnaire précis rapporta un ou plusieurs contacts oraux intimes 32 à 49 jours avant le début de la MNI. Cette observation permit à Hoagland de suggérer que la MNI se transmettait par la salive lors du baiser, d'où le nom de "maladie du baiser".

Rôle causal de l'EBV dans la MNI

un virus des années 1960 pour une maladie des années 1920

Au milieu des années 60, les chercheurs Werner et Gertrude Henle travaillant sur l'EBV, montrèrent, grâce aux techniques sérologiques d'immunofluorescence et de fixation du complément, que les anticorps dirigés contre l'EBV étaient non seulement détectables chez les africains atteints de lymphome de Burkitt mais aussi dans 85 % de la population adulte des Etats-Unis. En 1968, un technicien de leur laboratoire, séronégatif pour l'EBV, développa une MNI ; son sérum prélevé après la maladie était devenu positif. L'EBV fut définitivement reconnu comme l'agent étiologique de la MNI, à la suite d'études séro-épidémiologiques rétrospectives menées chez les étudiants d'universités américaines.

Dans les années 70, Chang et Golden (11) et Pereira et al. (43) montrèrent la présence de particules virales transformantes dans la salive des patients. D'autres études suivirent et confirmèrent la présence de virions infectieux dans la salive de tous les malades au cours de la phase aiguë (4, 63).

Epidémiologie

la MNI assaille entre 15 et 30 ans

Les études séro-épidémiologiques montrent que plus de 95% de la population mondiale adulte a été infectée par l'EBV. Cette prévalence importante est due à la transmission salivaire précoce et aux périodes d'excrétion salivaire au décours de la primo-infection et pendant la phase d'infection persistante dans l'organisme.

L'incidence de la MNI est, elle, très variable selon les études. Dans les pays développés, l'incidence dans la population générale a été estimée à 45 cas par an pour 100 000 habitants (9), ce taux variant avec l'âge. Dans la tranche d'âge 15-19 ans, elle atteint 345 à 671 cas. Dans la tranche d'âge supérieure ou égale à 35 ans, elle n'est que de 2 à 4 cas. D'après une étude française effectuée auprès des médecins généralistes entre 1990 et 1991 (37), l'incidence de la MNI en France a été évaluée entre 29 000 et 114 000 cas/ an, dont 87% surviennent avant l'âge de 25 ans. Dans cette étude, le nombre de MNI consultant en médecine générale a été estimé entre 0,59 et 2,28 cas par médecin par an.

Ces chiffres montrent que dans la population générale, les adolescents et les adultes jeunes sont plus susceptibles que les enfants de présenter un tableau clinique de MNI lors de la primo-infection à EBV. Du point de vue physiopathologique, Thorley-Lawson (57) a expliqué ce phénomène à travers le concept de l'immunité hétérologue. Schématiquement, quand l'infection à EBV survient chez les enfants, ceux-ci ont une réserve importante de lymphocytes T naïfs capables de contrôler rapidement l'infection virale. Cependant, avec l'âge, la réserve des lymphocytes T naïfs est moins importante, et le pool de cellules T mémoires est saturé à cause des précédentes expositions de l'individu à différents agents pathogènes au cours de sa vie. Quand l'infection à EBV survient plus tard, l'organisme sollicite les lymphocytes T hétérologues (déjà stimulés) qui, pour être efficaces, nécessitent une activation beaucoup plus importante que les lymphocytes T naïfs ; il en résulte alors une réponse inflammatoire massive responsable des symptômes de la MNI.

Plusieurs études ont tenté de mettre en évidence les facteurs impliqués dans la survenue ou non d'une MNI, au cours d'une primo-infection EBV. L'étude épidémiologique de Borer et al. (9) a montré une corrélation positive entre le niveau socio-économique élevé et la survenue de la MNI; les auteurs expliquent cette tendance par l'amélioration des conditions d'hygiène, qui entraîne une exposition plus tardive au virus. Une étude récente de Morris et Edmunds (38) suggère un changement de l'épidémiologie de la MNI au cours des 30 dernières années. Les auteurs ont effectué une analyse épidémiologique rétrospective sur une durée de 30 ans entre 1970 et 1999, de toutes les consultations et hospitalisations dues à une mononucléose infectieuse auprès des médecins généralistes en Angleterre. Comme le montre le graphe (figure 5), le nombre de consultations chez un généraliste pour une MNI a diminué de 1 à 2% par an entre 1970 et 1980, cette diminution s'est accélérée à partir de 1990 avec un taux d'environ 6% par

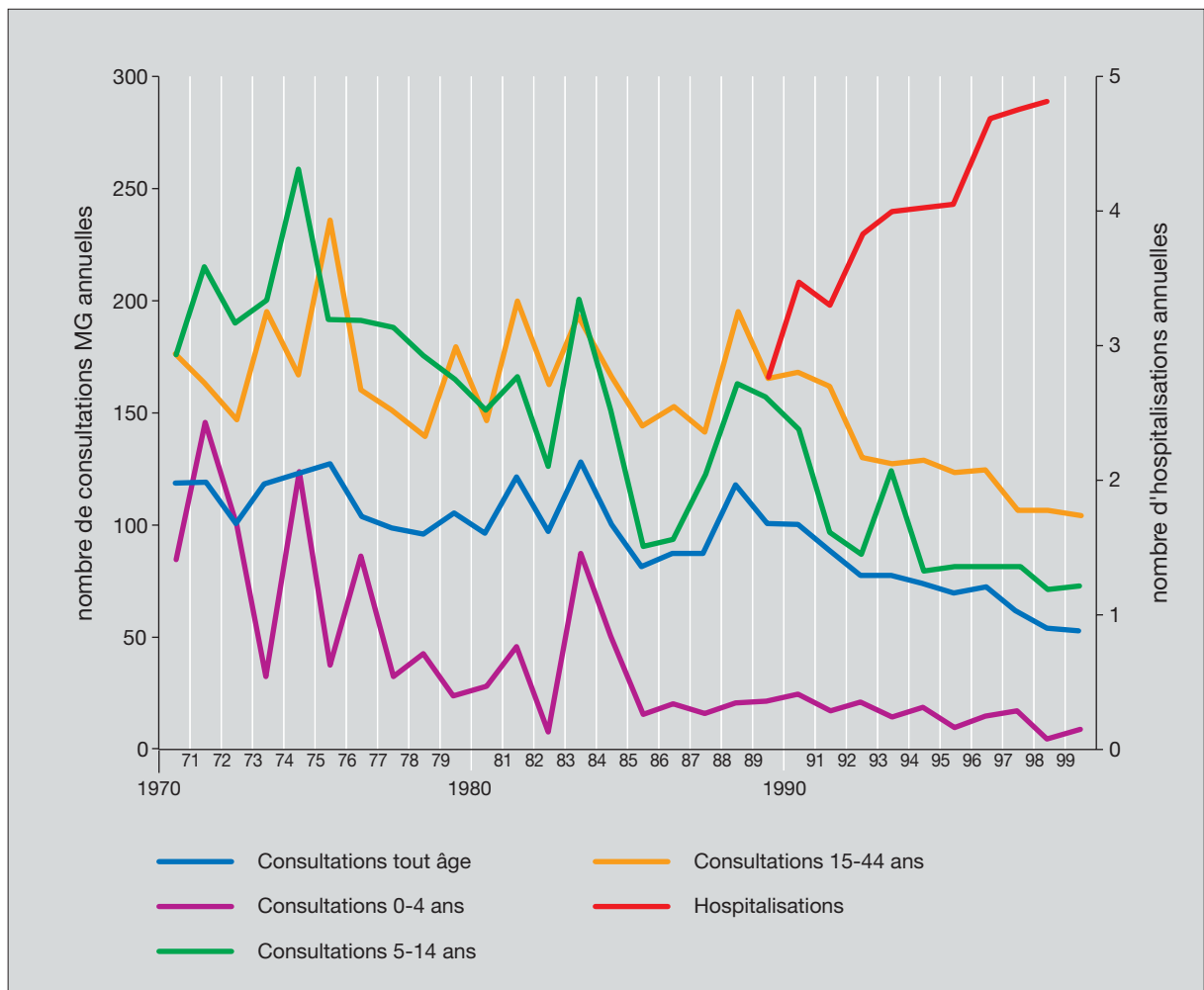


Figure 5 : Evolution du nombre de consultations chez le médecin généraliste (MG) et du nombre d'hospitalisations de cas de mononucléose infectieuse pour 100 000 habitants sur 30 ans en Angleterre. (Morris et Edmunds, 2002)

an, toutes catégories d'âge confondues. Cependant, le nombre d'hospitalisations pour une primo-infection sévère a doublé entre 1989 et 1999, cette augmentation concernant en particulier les adolescents et les adultes jeunes. Au service des Maladies Infectieuses du CHU de Grenoble, on dénombre environ 10 à 12 MNI hospitalisées par an.

Aux Etats-Unis, l'incidence de la MNI paraît 30 fois plus élevée dans la population de race blanche comparée à celle de race noire, probablement du fait d'une différence de niveau socio-économique. Il n'existe pas de différence entre les hommes et les femmes sur le risque de survenue d'une MNI (27).

Transmission du virus

ou tout est dans la salive !

Il est bien établi que la transmission de l'EBV se fait principalement par voie salivaire. Les autres modes de contamination sont moins connus. Dans une étude prospective effectuée dans un internat militaire sur une période de 2 ans, Hallee et al. (26) ont étudié le mode de transmission de l'EBV entre des sujets atteints de MNI et des sujets séronégatifs, en distinguant 2 groupes chez ces derniers : les sujets séronégatifs exposés considérés comme ceux partageant la même chambre, la même classe, la même cantine ou le même office religieux que les sujets MNI ; les sujets séronégatifs non exposés étant ceux n'ayant pas de contact rapproché avec les sujets MNI. Les résultats obtenus montrent qu'il n'y avait pas de différence significative entre les deux groupes. Cette étude confirme donc les investigations précédentes effectuées sur la transmission intra-familiale de l'EBV qui suggèrent que les sujets MNI sont très peu contagieux en dehors du contexte d'un contact intime (49).

L'EBV a été détecté dans les sécrétions génitales de sujets sains EBV-séropositifs (53), mais la transmission sexuelle de l'EBV reste très controversée. De rares cas de transmission de l'EBV par transfusion sanguine ont été rapportés (28, 55). La transmission de l'EBV lors des greffes d'organes ou de cellules de moelle osseuse n'est pas rare chez les enfants EBV-séronégatifs, car ils sont statistiquement plus souvent greffés avec des cellules d'un sujet séropositif.

La durée de la contagiosité des patients MNI a été longtemps méconnue. Dans une étude prospective récente, nous avons montré que ces patients sont très contagieux à partir de leur salive pendant au moins 6 mois, voire un an, après le début des symptômes (19).

Physiopathologie

l'intrication étroite entre le virus et les lymphocytes B

1. cellules cibles de l' EBV

La présence de l'ADN et des ARN EBV dans les cellules épithéliales de l'oropharynx, décrite au cours de la MNI, suggérait que les cellules épithéliales étaient la première cible de l'EBV et le principal site de la réplication virale. En se basant sur ces données et sur la détection constante de l'EBV dans les cellules épithéliales du carcinome indifférencié du nasopharynx et de la leucoplasie orale chevelue, il a été proposé que les cellules épithéliales, en plus des lymphocytes B, soient un site de persistance de l'EBV. Cependant, l'utilisation de nouvelles techniques plus sensibles remet en cause cette hypothèse. L'hybridation *in situ*, l'immunohistochimie et la PCR sur les cellules des glandes salivaires et des amygdales des malades ont montré que l'EBV a un lymphotropisme strict lors de la primo-infection, et que la persistance du virus a lieu principalement dans les cellules B mémoires (31). Les débats sur le double ou le mono-tropisme de l'EBV ne sont pas clos.

Faulkner et al. (20) ont présenté un modèle sur le transit de l'EBV depuis l'oropharynx jusqu'aux cellules B lors de la primo-infection (**figure 6**) : l'EBV pourrait traverser l'épithélium par transcytose ou emprunter les cryptes de l'épithélium oropharyngé afin d'infecter les cellules B en contact immédiat avec celui-ci. Plus récemment, Borza et al. (10) ont décrit un autre modèle qui pourrait aplanir les controverses concernant le tropisme cellulaire de l'EBV. Les cellules épithéliales seraient probablement les premières cellules cibles de l'EBV lors de la primo-infection, cette infection ayant lieu au cours de la période d'incubation - silencieuse - qui est de 4 à 6 semaines. Il s'agirait

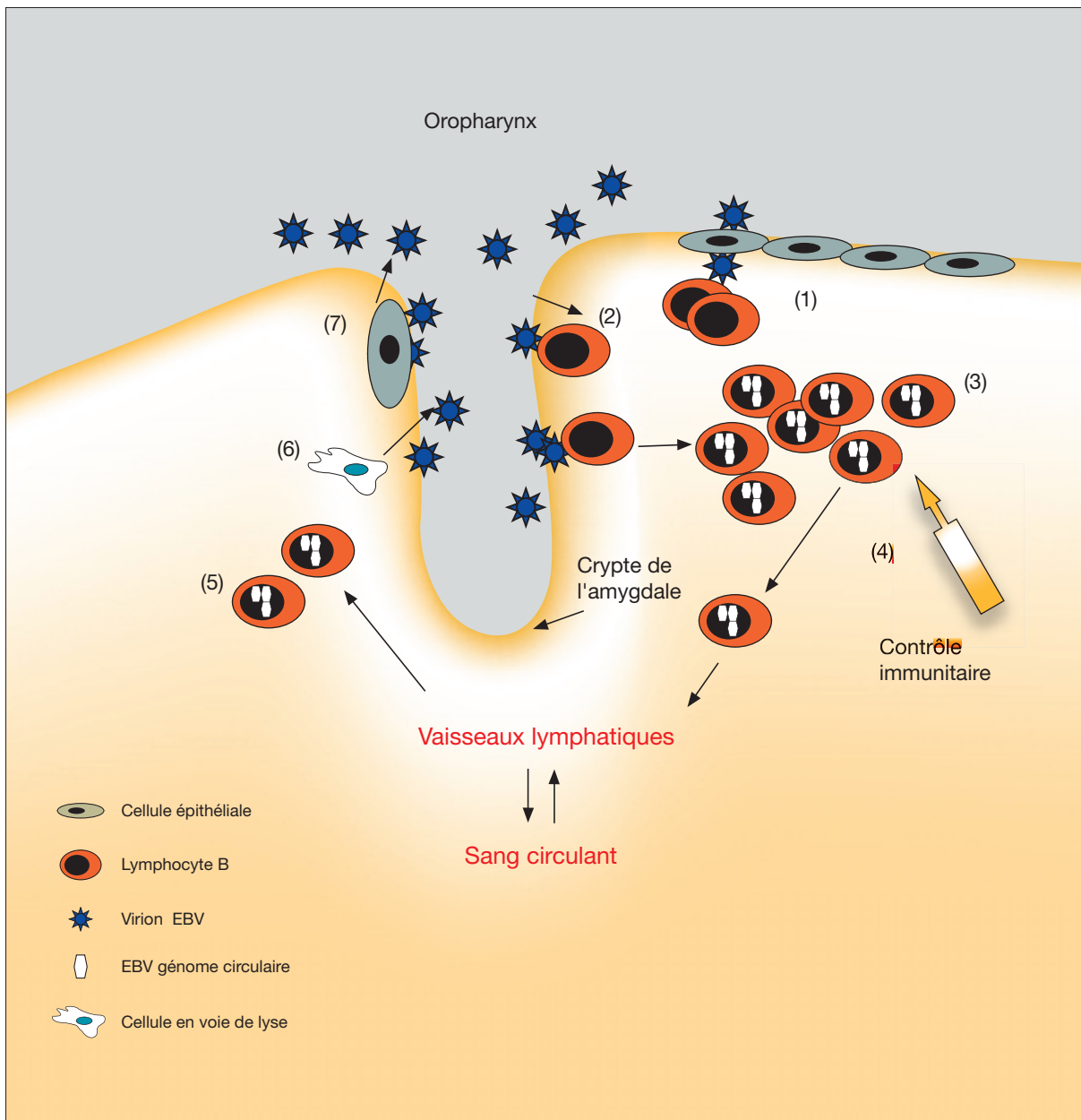


Figure 6 : modèle d'infection EBV *in vivo* adapté de Faulkner et al (20).

(1) L'EBV traverse l'épithélium par transcytose ; (2) ou infecte directement les lymphocytes B (LyB) à travers la crypte ; (3) prolifération des cellules infectées contrôlée par le système immunitaire ; (4) l'EBV se met en latence stricte dans les cellules mémoires qui migrent dans le sang circulant ; (5) les LyB mémoires retournent dans les amygdales (6) se différencient et produisent des virions puis meurent ; (7) les virions sont relargués dans la salive.

d'un phénomène transitoire car les cellules épithéliales sont incapables de maintenir de l'EBV latent sous forme épisomale. Le virus présent dans ces cellules sous forme répliquative lytique induit la production de virions et la lyse cellulaire. Les virus relargués par les cellules épithéliales infectent ensuite les lymphocytes B présents dans le tissu lymphoïde. Toutes les cellules infectées par l'EBV, notamment les cellules épithéliales, sont la cible de la très forte réponse immunitaire qui précède l'apparition des symptômes de la MNI. Seules les cellules infectées qui n'expriment aucune protéine de latence virale (latence 0) échapperont à la réponse immunitaire. Par ce biais, le virus est détecté uniquement dans les cellules B mémoires pendant la phase symptomatique de la MNI, ce qui expliquerait pourquoi les équipes citées précédemment n'ont jamais pu détecter le génome EBV dans les cellules épithéliales au cours de la MNI.

2. Morphologie et phénotype des cellules infectées dans les amygdales

La combinaison de l'hybridation *in situ* pour la détection des EBERs, et de l'immunohistochimie pour le marquage des protéines virales de latence et des différents types cellulaires, a permis d'étudier avec précision l'expression virale et le type de cellules infectées dans les amygdales au cours de la primo-infection.

La majorité des cellules EBER-positives présentes dans les amygdales au cours de la MNI sont des lymphocytes B, situés principalement dans la zone paracorticale extrafolliculaire, alors que de très rares cellules sont situées dans les follicules ou dans le centre germinatif. L'expression de EBNA2 et LMP1 serait responsable de cette répartition des lymphocytes B infectés. Ces protéines déclencheraient la prolifération et la différenciation des cellules B du centre germinatif en cellules mémoires qui migrent hors du centre germinatif et peuplent ainsi la zone paracorticale. Tous les types de latence sont mis en évidence dans la population lymphoïde des amygdales de ces sujets. Il faut noter que 1 à 5% des cellules B infectées présentent la morphologie des cellules HRS-like (Hodgkin Reed-Sternberg-like) : très grandes, polynucléées et CD30+, elles expriment parfois l'ensemble des protéines de la latence III.

Le cycle lytique a été peu étudié dans les amygdales lors de la MNI. Seuls les ARNm Zebra ont été recherchés et mis en évidence dans les petits lymphocytes B.

3. Morphologie et phénotype des cellules infectées dans le sang périphérique

Les premières études effectuées chez les sujets atteints de MNI ont montré la présence d'un grand nombre de lymphocytes B infectés par l'EBV dans le sang périphérique. Une cellule sur 100 à 1000 est infectée par l'EBV au cours de la phase aiguë, et une cellule sur 10000 est infectée au cours de la phase de pré-convalescence, contre 0,5 à 50 cellules sur 1 million au cours de la latence. Ces chiffres ont été calculés par différentes méthodes : capacité des lymphocytes B à proliférer spontanément *in vitro*, détection de l'EBNA par immunofluorescence anti-complément, et récemment, amplification de l'ADN EBV par PCR.

Au cours de la MNI, plus de 99% des cellules B infectées du sang périphérique sont des cellules mémoires quiescentes qui n'expriment aucune protéine de latence (31). Dans le faible pourcentage de cellules restant, l'EBV induit un programme de transcription de gènes de latence *in vivo* comparable à celui observé lors de la prolifération des lignées établies *in vitro*, le profil de latence III : LMP1 et LMP2A sont détectés dans 0,01 à 1,8% des lymphocytes B, les EBNA dans 0,01 à 4,5%. Les mêmes taux d'expression sont retrouvés pour les gènes du cycle lytique, avec des valeurs variant de 0,01% à 1,09% des lymphocytes B, pour les ARNm Zebra, BALF2 (Early Antigen) et BCLF1 (VCA) (Late Antigen). L'expression de ces gènes est variable d'un individu à un autre.

Enfin, l'équipe de Thorley-Lawson (42) a mis au point, très récemment, un modèle de centre germinatif *in vitro*, validé par des études *in vivo* sur les amygdales et le sang périphérique, qui vise à étudier le cheminement de l'EBV dans les deux compartiments depuis la primo-infection jusqu'à la persistance. La conclusion des auteurs est que l'EBV a trouvé un moyen infallible pour persister dans l'organisme, celui de mimer le cycle cellulaire des lymphocytes B (figure 7) : les lymphocytes B natifs quiescents sont

infectés par l'EBV en premier, entrent dans le cycle cellulaire, et se différencient en lymphoblastes. Ces derniers expriment toutes les protéines de latence, dont EBNA2 et LMP1 qui induisent leur activation et leur prolifération. L'expression de EBNA1 favorise par ailleurs la persistance des épisomes viraux dans le noyau des lymphocytes au cours de la division cellulaire. Les lymphoblastes se différencient ensuite en centroblastes puis en centrocytes ; au cours de ces deux stades cellulaires, l'expression virale est limitée à LMP1, LMP2 et EBNA1. Les centrocytes se différencient en lymphocytes B mémoires quiescents qui n'expriment aucune protéine de latence, ils échappent donc à tout contrôle immunitaire. Ce sont ces cellules qui entrent dans la circulation sanguine périphérique.

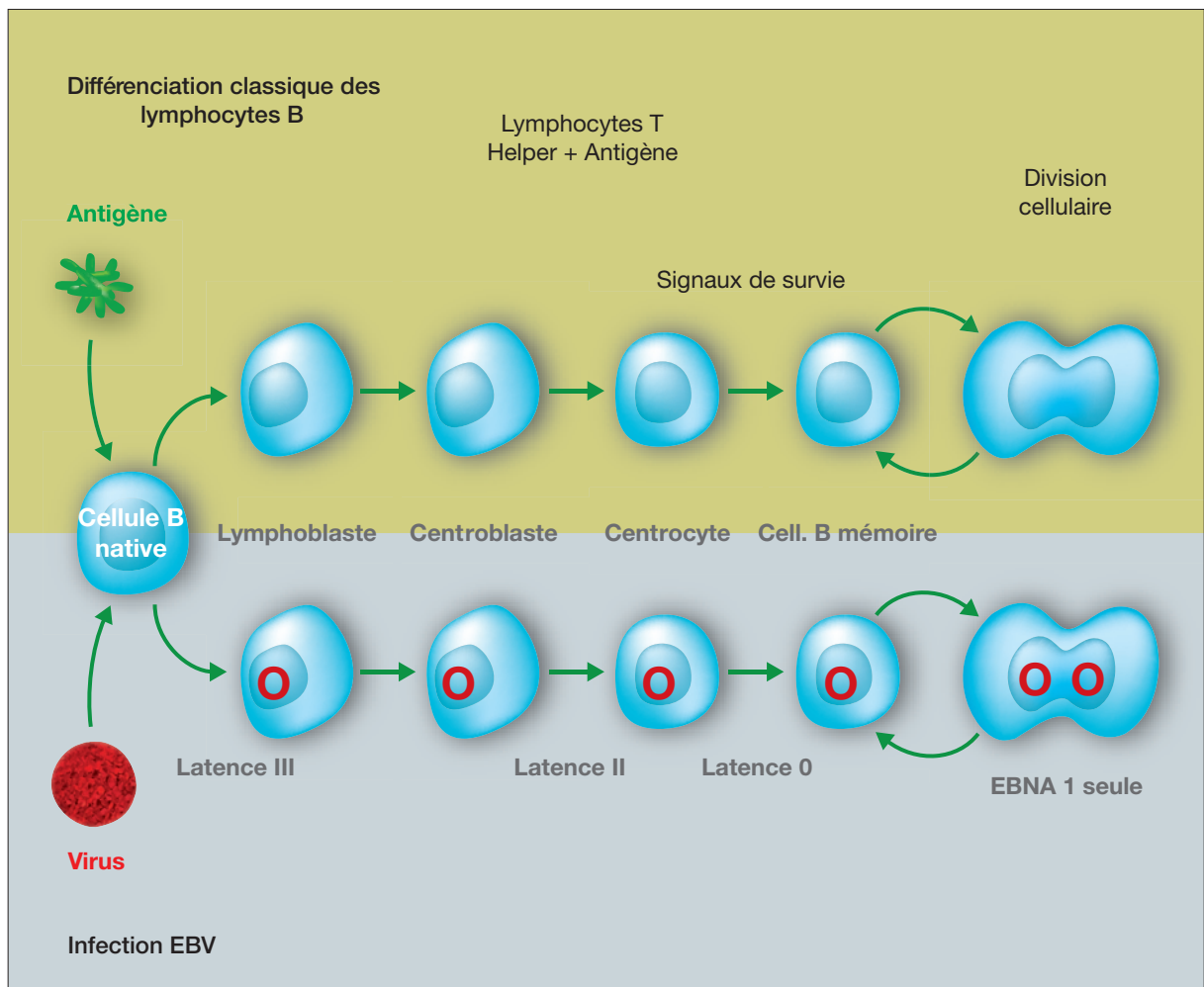


Figure 7 : EBV et tropisme cellulaire B d'après Thorley-Lawson (56)

4. La charge virale EBV au cours de la MNI

Au cours de la phase aiguë de la MNI, la charge virale EBV est élevée à la fois dans la salive, le plasma et les cellules mononucléées (PBMCs). Dans la salive, ce qui correspond à la porte d'entrée oropharyngée du virus, l'ADN viral est présent en très grande quantité, les charges virales sont souvent supérieures à 6 log copies/mL. Nous avons montré que ces charges virales élevées persistaient encore après la phase de convalescence (19). De plus, les tests d'infectiosité effectués sur les lymphocytes de sang de cordon ont montré que l'ADN viral détecté correspondait à des virions infectieux. Ces données suggèrent que ces personnes restent très longtemps contagieuses après la disparition des symptômes cliniques ; la transmission de l'EBV pourrait avoir lieu par l'intermédiaire d'un individu récemment infecté par l'EBV plus souvent que par un partenaire sain anciennement infecté. D'autre part, cette persistance virale incite à penser que le contrôle immunitaire dans ce compartiment est peu efficace.

Dans le compartiment sanguin, l'évolution de la charge virale est complètement différente. L'ADN EBV est présent dans le plasma pendant la phase aiguë (4 log copies/mL) ; il se négative complètement dans les 2 semaines qui suivent l'apparition des signes cliniques. Dans les PBMCs, des charges virales similaires (3 à 4 log copies/mL) sont observées en phase aiguë, elle baissent lentement et progressivement au cours du premier mois, pour atteindre des valeurs comparables à celles observées chez le sujet sain (< 2,8 log copies/mL). Nous avons montré que cette charge virale réaugmente souvent au 2^{ème} et/ou au 3^{ème} mois, et peut s'accompagner d'une rechute des signes cliniques. Pendant la phase de convalescence, elle rediminue pour atteindre des valeurs faibles, proches de celles observées chez le sujet sain. Cette évolution de la charge virale sanguine suggère au contraire la présence d'un contrôle immunitaire qui a réussi à faire diminuer fortement voire à éliminer les virions présents dans le sang. L'ADN détecté dans les PBMCs correspondrait à du virus latent.

La détermination de la charge virale au cours de la MNI a permis une meilleure compréhension de l'histoire naturelle de la MNI. Elle n'est cependant pas utile en général pour le diagnostic de la MNI classique, qui repose toujours avant tout sur la sérologie, sauf en cas de sérologie difficilement interprétable ou dans les cas de MNI graves.

Réponse immunitaire

une réponse généralisée mais heureusement transitoire

La primo-infection à EBV induit chez l'hôte une réponse immunitaire très intense, à la fois humorale et cellulaire, dont l'objectif est de limiter la réplication virale et d'éliminer les cellules infectées.

1. Les anticorps

La réponse humorale anti-EBV correspond à des anticorps dirigés contre une grande variété d'antigènes viraux du cycle lytique et du cycle latent. Parmi les antigènes du cycle lytique, on distingue : EA (early antigen), VCA (virus capsid antigen) et MA (membrane antigen). Les antigènes du cycle latent sont représentés principalement par les EBNA (Epstein-Barr nuclear antigen).

Le composant EA correspond aux antigènes très précoces et précoces du cycle lytique. Il comprend la protéine très précoce EB1/Zebra (BZLF1), et les protéines précoces, exprimées en quantité importante, BALF2, BHRF1, BMRF1, et BMLF1. Les anticorps anti-VCA sont dirigés contre les protéines tardives de la nucléocapside: BCLF1, BFRF3, BLRF2 et gp110. Les anticorps anti-MA sont des anticorps neutralisants, produits contre la gp85 et la gp350 qui sont présentes à la surface des cellules infectées et sur l'enveloppe virale. Les anticorps anti-EBNA sont dirigés contre l'ensemble des protéines EBNA exprimées au cours du cycle latent, mais surtout contre EBNA1 présente en très grande quantité. Les anticorps dirigés contre LMP1 ou LMP2, décelés chez un petit nombre de sujets sains, n'ont pas été détectés jusqu'à présent chez les malades ayant une MNI.

Au cours de la phase aiguë de la MNI, les patients présentent des taux sériques élevés d'IgM anti-VCA, et une augmentation progressive des IgG anti-VCA et anti-EA. Les IgA anti-VCA et anti-EA sont détectées de manière transitoire. Le taux d'IgM anti-VCA diminue progressivement au cours de l'évolution de la MNI. Ces anticorps disparaissent

chez la plupart des patients à partir des 2^e- 3^eme mois après le début des symptômes. Le taux sérique d'IgG anti-VCA atteint un pic vers le 2^eme mois après le début des symptômes, puis diminue lentement jusqu'à atteindre un taux stable qui persiste indéfiniment dans l'organisme. L'apparition des Ac anti-EA (IgG et IgA) reste inconstante et transitoire. Les IgG anti-EBNA apparaissent 3 à 6 mois après la phase aiguë, et persistent ensuite toute la vie dans l'organisme.

Au cours de la phase aiguë de la MNI, on constate une production importante d'anticorps non spécifiques de l'EBV, d'auto-anticorps et d'anticorps anti-tissus.

La majorité des auto-anticorps produits au cours de la primo-infection à EBV sont de la classe IgM. Les anticorps anti-muscles lisses sont fréquemment détectés, et des anticorps dirigés contre le noyau cellulaire, les mitochondries, les plaquettes, les globules rouges, les neutrophiles, et des organes comme la thyroïde, le foie ou l'estomac sont également observés. Plus récemment, des anticorps dirigés contre la manganèse super-oxyde dismutase, une enzyme qui permet d'éliminer les radicaux libres de l'oxygène (15) ont été détectés au cours de la MNI. L'auteur attribue en partie les symptômes cliniques de la MNI à ce type d'auto-anticorps qui entraînent une accumulation des radicaux oxygène toxiques pour l'organisme.

Les anticorps dits "hétérophiles" sont utilisés pour le diagnostic rapide de la MNI (MNI-test, test de Paul-Bunnell-Davidsohn...).

L'origine des auto-anticorps et des Ac hétérophiles serait due à une activation polyclonale accrue des lymphocytes B après fixation de l'EBV sur le récepteur du complément (CD21). Il est aussi admis que l'homologie de structure entre la région répétée glycine-alanine de EBNA1 et les épitopes de certaines protéines de l'organisme humain induit une réaction croisée entre ces épitopes et les anticorps dirigés contre l'EBV : on les soupçonne d'être en grande partie responsables de la réponse auto-immune (59).

2. L'immunité cellulaire

Le syndrome mononucléosique, qui se caractérise par la présence dans le sang d'une hyperleucocytose constituée majoritairement de lymphocytes "atypiques" (à cytoplasme hyperbasophile), est un des éléments clés du diagnostic de la MNI. Il témoigne de la présence d'une réponse immune cellulaire importante, qui joue un rôle majeur dans le contrôle de l'infection à EBV.

Au moment de l'apparition des symptômes de la MNI, la population lymphocytaire sanguine est majoritairement représentée par les cellules T cytotoxiques CD8+ (CTL) ; les cellules T CD4+ et les cellules NK activées sont moins nombreuses.

Les cellules NK seraient le vestige de la réponse immunitaire innée qui se produit immédiatement après la primo-infection. Elles entraînent la lyse des cellules infectées sans qu'il y ait une reconnaissance spécifique des antigènes viraux. Elles sont aussi productrices de différents médiateurs dont l'interféron gamma qui inhibe directement la réplication virale. Récemment, Williams et al. ont montré que le taux de cellules NK mesuré pendant la phase aiguë de la MNI est inversement proportionnel à la charge virale dans les PBMCs (61).

L'expansion des cellules T CD8+ a d'abord été attribuée à l'action d'un super antigène, mais le développement de nouvelles techniques comme la cytométrie en flux et les tétramères HLA-dépendants, a permis de mettre au jour la présence de cellules T dirigées contre des épitopes spécifiques de l'EBV. Au cours de la phase aiguë, les CTL dirigées contre les épitopes lytiques sont dominantes (50%), mais diminuent considérablement (jusqu'à 20 fois) au cours de la convalescence. Les CTL dirigées contre les épitopes latents sont faiblement détectables (3%) à la phase aiguë, mais leur taux augmente trois à huit mois après, puis rediminue et persiste à un taux stable souvent comparable à celui observé au cours de la MNI. La majorité des cellules TCD8+ présentes au cours de la MNI sont des cellules T mémoires activées (HLA DR+, CD38+, CD45RO+), qui ont un faible taux de bcl-2, et sont donc très sensibles à l'apoptose ; elles subissent un renouvellement continu et très rapide.

Contrairement aux cellules T CD8+, les cellules T CD4+ ont été très peu étudiées, cela étant dû en grande partie à des difficultés techniques traduites par un manque de réactifs capables de distinguer spécifiquement les lymphocytes T CD4+. Récemment, Amyes et al. (2) ont rapporté un taux allant de 0,04 à 5,2 % (moyenne 1,4 %) de lymphocytes CD4+ chez 36 patients en phase aiguë. Seul un très petit nombre de lymphocytes CD4+ spécifiques de l'EBV persistera au cours de la latence. Ils joueraient un rôle dans la conservation de la fonctionnalité des cellules T CD8+ mémoires.

Les cytokines jouent aussi un rôle important dans la physiopathologie de la MNI lors de la phase aiguë. Des taux élevés d'interleukine (IL)1, IL2, IL6, IL10 et d'interferon ont été détectés dans le sérum au cours de la phase aiguë de la MNI. La lymphotoxine, l'IL6 et le *tumor necrosis factor* (TNF) sont fortement exprimés par les cellules infectées par l'EBV localisées dans les amygdales de ces malades.

Manifestations cliniques

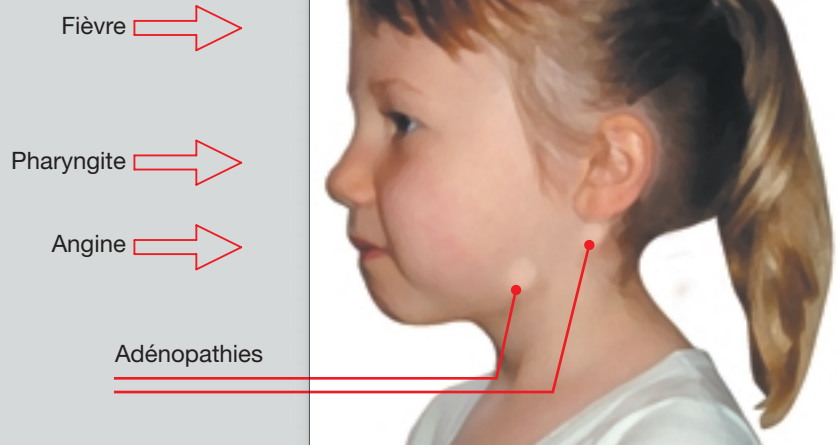
de la mononucléose infectieuse simple à la primo-infection à EBV complexe

1. MNI classique

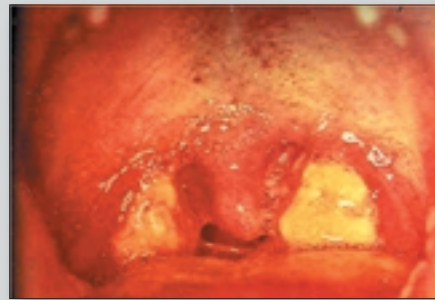
Après une période d'incubation de 4 à 8 semaines, la MNI se présente sous forme de : fièvre, angine ou rhinopharyngite, polyadénopathies, et asthénie prolongée (figure 8).

En plus des symptômes classiques, malaises et migraine ont été rapportés dans 50% des cas (47). Toux, arthralgies, myalgies, nausées et somnolence surviennent moins fréquemment (<10 % des cas). La splénomégalie est rapportée dans plus de 50% des cas, la fréquence de l'hépatomégalie varie entre 7% et 90 % selon les études (tableau III) (3, 47). Le rash maculopapuleux observé dans moins de 10% des cas de MNI est souvent dû à un traitement antibiotique (en particulier les bêta-lactamines) administré aux patients de façon empirique devant une angine fébrile. De rares cas d'ulcérations génitales ont été également rapportés (syndrome de Lipschutz).

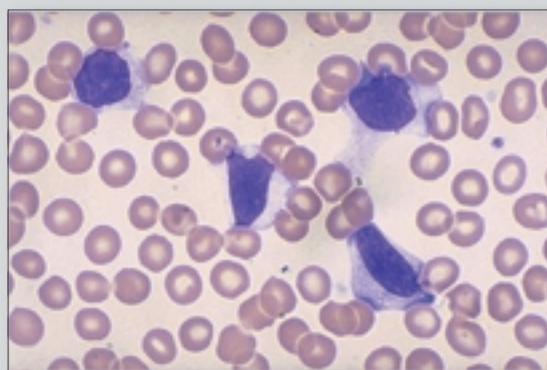
MNI



Adénopathie cervicale



Angine pseudomembraneuse



Lymphocytes hyperbasophiles colorés et fixés sur lame

Figure 8 : Manifestations cliniques et biologiques de la MNI

Tableau III : Fréquence des différents signes cliniques de la MNI

Symptômes	Fréquence	Références
Fièvre	26-100 %	Andersson, Fafi-Kremer et al., Rea et al. (3, 19, 47)
Pharyngite / angine	70-90 %	
Adénopathies	60-100 %	
Asthénie	45-96 %	Fafi-Kremer et al., Rea et al. (19, 47)
Splénomégalie	50-63 %	Andersson (3)
Hépatomégalie	7-90 %	Andersson et al., Rea et al. (3, 47)

Les études qui ont comparé les manifestations cliniques de la MNI chez les sujets de moins de 35 ans et ceux de plus de 35 ans, ont montré que les sujets âgés présentent des symptômes plus discrets, ce qui rend ce diagnostic alors plus difficile, plus tardif et plus coûteux.

• **Traitement de la MNI classique :**

Hormis un traitement symptomatique, il n'existe pas de traitement spécifique de la MNI. Néanmoins, plusieurs équipes ont étudié l'effet d'une corticothérapie ou d'un traitement antiviral sur la durée et la sévérité des symptômes.

L'analyse des différentes études cliniques (8, 13) comportant une corticothérapie suggère que ce traitement peut accélérer la résolution de la fièvre et de l'angine, mais ne présente pas de bénéfice significatif ou reproductible sur les adénopathies ou l'hépatosplénomégalie. Aujourd'hui, il est admis qu'il n'y a pas d'indication des corticoïdes dans les MNI non compliquées.

La réplication de l'EBV est inhibée *in vitro* par l'acyclovir, le ganciclovir, le cidofovir et le foscarnet. Cette action concerne uniquement la forme linéaire du génome (production de virions), elle est sans effet sur la forme latente. Il n'y a pas d'indication actuellement des antiviraux dans la MNI non compliquée.

2. MNI atypique ou compliquée

La MNI se complique parfois par des manifestations aiguës ou chroniques graves (tableau IV). Schématiquement, le mécanisme de ces complications est dû soit à une réponse immunitaire exagérée, soit à une réponse insuffisante incapable de contrôler la prolifération des lymphocytes B infectés.

Tableau IV : Complications aiguës de la MNI

I. Classiques	
- éruption après administration de β -lactamines	40 - 95 %
- neutropénie	50 - 80 %
neutropénie sévère (< 1000 neutrophiles/mm ³)	1 - 3 %
- atteinte hépatite : transaminases élevées	50 - 80 %
ictère	5 %
- thrombocytopénie sévère (< 20 000 plaquettes/mm ³)	25 - 50 %
- anémie hémolytique	3 %
- complications neurologiques (encéphalite, cérébellite, névrite, myélite, Guillain-Barré ...)	1 - 5 %
II. Complications rares	
- anémie aplasique	
- thrombocytopénie sévère	
- syndrome hémophagocytaire	
- pancytopénie	
- pneumonie interstitielle	
- myocardite, péricardite	
- rhabdomyolyse	
- complications psychologiques	
- obstruction des voies aériennes	
- rupture splénique	

La rupture splénique, complication ancienne la plus connue de la MNI, est très rare. Elle survient surtout durant la 2^{ème} ou la 3^{ème} semaine de la maladie et peut être fatale. Une contre-indication à toute activité sportive pendant les 4 premières semaines est de ce fait imposée à tous ces patients.

Les complications neurologiques (méningite aseptique, encéphalite, syndrome de Guillain–Barré, névrite optique ou périphérique, paralysie faciale, et plus rarement myélite transverse ou ataxie cérébelleuse aiguë) sont les plus fréquentes lors d'une MNI (1-5%). Si elles surviennent le plus souvent au même moment ou très peu de temps après le début des symptômes classiques de la MNI, elles peuvent apparaître parfois après leur résolution. La plupart des complications neurologiques guérissent sans séquelles entre 1 semaine et 3 mois.

La leucopénie et parfois l'agranulocytose et la thrombopénie sont les principaux troubles hématologiques décrits dans la littérature et retrouvés en pratique courante. Bien que le mécanisme de cette cytopénie ne soit pas bien élucidé, la présence d'anticorps anti-leucocytes ou anti-plaquettes a été parfois incriminée.

La MNI peut se compliquer par un syndrome hémophagocytaire. Ce syndrome grave et souvent fatal est plus fréquemment observé en Asie du Sud-Est, particulièrement chez les enfants japonais. Il est caractérisé par une fièvre persistante et une hépatosplénomégalie accompagnées de cytopénie, coagulopathie et hyperferritinémie. L'analyse histologique des organes lymphoïdes et de la moelle montre une expansion et une accumulation des macrophages qui phagocytent le reste des cellules sanguines. Le mécanisme de ce syndrome n'est pas bien compris, mais il pourrait s'agir d'un relargage massif de cytokines par les macrophages.

Une trentaine de cas de néphrites interstitielles ont été rapportés dans la littérature. Un infiltrat cellulaire avec prédominance des cellules T cytotoxiques caractérise cette complication rénale qui guérit de façon spontanée au bout de quelques jours.

Parmi les complications respiratoires, l'obstruction pharyngée est la plus fréquente et constitue l'une des premières causes d'hospitalisation en particulier chez les enfants. La surinfection par le streptocoque A chez les enfants atteints de MNI est retrouvée

dans 3 à 33 % des cas. L'atteinte pulmonaire est rare. Une atteinte cardiaque (myocardite, péricardite) a été parfois associée à l'EBV.

La primo-infection à EBV, même en l'absence de syndrome mononucléosique, peut se révéler par l'une des complications précédentes.

La MNI d'évolution fatale est souvent liée aux complications citées plus haut, en particulier à un syndrome hémophagocytaire, à des complications neurologiques, à une rupture splénique ou à une obstruction oropharyngée sévère. Plus rarement elle est associée à des complications hématologiques, notamment l'agranulocytose associée à une surinfection bactérienne.

• **Traitement des formes compliquées :**

Contrairement à la MNI classique, la corticothérapie associée ou non à l'acyclovir apporte un bénéfice non négligeable dans la prise en charge de ces formes.

Quelques études sur de petites séries ont montré que la corticothérapie réduisait rapidement et efficacement l'obstruction pharyngée et pouvait éviter une éventuelle trachéotomie. Elle pourrait aussi améliorer l'anémie hémolytique auto-immune, la thrombocytopénie et l'aplasie. Les corticoïdes ont même été utilisés avec succès dans certains cas d'encéphalite, de myocardite et de péricardite.

L'acyclovir administré en plus des corticostéroïdes peut prévenir une potentielle réplication virale due à l'immunodépression induite par la corticothérapie.

La corticothérapie associée à l'étoposide (antinéoplasique) est proposée dans le traitement du syndrome hémophagocytaire lié à l'EBV. Dans les cas graves, la ciclosporine peut être proposée en association à une chimiothérapie plus agressive, voire à une greffe de moelle dans les cas résistants au traitement.

3. Cas particuliers

a. Le syndrome lymphoprolifératif lié au chromosome X (XLP) ou syndrome de Purtilo

Décrit par Purtilo en 1974 (45), le syndrome lymphoprolifératif lié au chromosome X (XLP) est caractérisé par une altération de l'immunosurveillance de l'EBV. Il s'agit probablement d'une prolifération polyclonale des lymphocytes B et des lymphocytes T CD8.

Le syndrome de Purtilo touche les jeunes garçons. Il se manifeste en général par une MNI typique, avec fièvre, adénopathies et hépatosplénomégalie, qui évolue très rapidement vers une hépatite fulminante accompagnée d'une aplasie médullaire entraînant la mort dans 40% des cas. Il se manifeste aussi dans 25 % des cas d'emblée par un lymphome B non hodgkinien. Au total 70% des enfants de sexe masculin atteints de ce syndrome meurent avant l'âge de dix ans. Mais en l'absence d'infection par l'EBV, les enfants portant ce déficit génétique présentent une réponse immunitaire normale.

La cause génétique de ce déficit a été identifiée en 1998 (50). Il s'agit d'un gène, localisé au niveau du chromosome X dans la région Xq25, qui code pour une protéine intervenant dans les mécanismes physiologiques d'activation lymphocytaire T. Cette protéine appelée SH2D1A (SH2 domain protein 1A) interagit avec la "SLAM" (*signaling lymphocyte activation molecule*) ; il en résulte une perturbation de l'immunité à médiation cellulaire anti-EBV.

b. Infection chronique active à EBV

Classiquement, après la phase aiguë de la primo-infection, qu'elle soit symptomatique ou non, l'EBV persiste sous forme silencieuse dans l'organisme et est rarement responsable de récurrence symptomatique chez les sujets immunocompétents. L'infection chronique active à EBV, connue sous le nom de CAEBV (Chronic Active EBV Infection), est définie comme une infection chronique ou une mononucléose récurrente grave dont les symptômes persistent plus d'un an. C'est une affection rare (0,01 à 0,1%) qui survient chez les sujets immunocompétents, avec une fréquence plus élevée au Japon. Dans sa forme sévère, elle est associée à une mortalité élevée (43%), et peut évoluer vers un lymphome, un syndrome myélodysplasique ou une lymphohistiocytose hémophagocytaire. Du point de vue virologique, la CAEBV est toujours associée à la présence d'un taux d'anticorps anti-EBV élevé (en particulier anti-EA et anti-VCA),

suggérant une réplication virale active, et/ou d'une forte charge virale EBV dans le sang périphérique et dans les tissus atteints. Contrairement à ce qui est observé de manière générale chez le sujet sain EBV-séropositif, où le virus infecte principalement les lymphocytes B et persiste dans ces mêmes cellules, les patients atteints d'une CAEBV montrent une infection des lymphocytes T ou des cellules NK parfois suivie d'une prolifération monoclonale. L'analyse de tissus provenant de lymphomes T ou NK post-CAEBV a montré une expression des protéines de latence EBV de type II ou III, et la présence d'ARN messagers Zebra et BCRF-1(vIL10) (33).

Infection persistante normale et pathologique

de la coexistence pacifique aux cancers associés à l'EBV

Après la primo-infection, l'EBV persiste toute la vie dans l'organisme, le plus souvent sans aucune conséquence pathologique apparente pour l'hôte infecté : on peut ainsi parler de "persistance normale du virus chez l'individu". Cette cohabitation pacifique est le résultat d'un équilibre complexe entre 3 phénomènes :

1. L'infection virale se manifeste sous deux formes complémentaires : latente et productive. La forme latente se caractérise par l'expression limitée des protéines dénommées protéines de latence sans production de nouveaux virions par la cellule infectée. Le nombre des protéines de latence exprimées est variable selon l'état de différenciation de la cellule infectée et définit plusieurs types de latence.

Latence I = EBNA1 ;

Latence II = EBNA1 + LMP1 + LMP2 ;

Latence III = EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C, LP + LMP1, 2A, 2B.

Dans l'infection productive, de nombreuses protéines du cycle lytique sont exprimées de façon séquentielle. Elle aboutit, lorsque l'expression est complète, au relargage par la cellule de nouvelles particules virales infectieuses ainsi qu'à la lyse de cette cellule.

2. La biologie normale des lymphocytes B comprend des mécanismes de différenciation et d'activation dans le tissu lymphoïde, en particulier au niveau de l'oropharynx, qui conditionnent les différentes formes d'infection virale citées plus haut.
3. La réponse immunitaire anti-EBV, elle, sans pouvoir éradiquer l'infection, contrôle la quantité de virions libres et le nombre de cellules infectées dans l'organisme.

A l'opposé de cette persistance asymptomatique, la notoriété de l'EBV, depuis sa découverte dans les lignées cellulaires issues de lymphome de Burkitt, tient au fait que le génome viral et certaines protéines de latence, oncogéniques expérimentalement, sont retrouvés avec une grande fréquence dans des lymphomes et carcinomes chez l'homme. On parle alors de cancers associés à l'EBV. L'infection virale étant ubiquitaire dans la population générale, et le virus étant "normalement" lymphotrope et épithéliotrope, les critères de cette association sont complexes et encore discutés. Cependant, le rôle dans certains cancers semble bien établi et, dans l'histoire de la médecine, l'EBV restera le premier virus humain à être associé à des cancers. Cette association est le résultat d'un déséquilibre entre les 3 phénomènes cités plus haut.

1. porteur sain

Le scénario le plus abouti des mécanismes de cette persistance a été écrit en grande partie par David Thorley-Lawson (56). Son hypothèse principale veut que l'EBV, pour persister et se transmettre entre individus, ne doit pas engendrer de situations à risque pour son hôte. Pour cela, il étudie la biologie normale des lymphocytes B dans l'oropharynx. Les lymphocytes B naïfs rencontrant un antigène sont activés et prolifèrent dans le tissu lymphoïde de la région en formant des centres germinatifs. Dans ces centres, des mécanismes de différenciation vont sélectionner les lymphocytes B les plus adaptés à reconnaître l'antigène en question et à sécréter les anticorps correspondants pendant que les lymphocytes B non sélectionnés vont mourir par apoptose. Les lymphocytes B sélectionnés vont ensuite quitter le centre germinatif et devenir des lymphocytes B mémoires capables de répondre très rapidement en cas de réapparition de l'antigène. L'EBV qui infecte des lymphocytes B naïfs via la salive, va dans un premier temps les faire proliférer grâce à l'expression des 9 protéines de latence (les 6 protéines EBNA et les 3

protéines LMPs). Ce programme de latence est dénommé : "programme de croissance". Ces lymphocytes B vont donc pouvoir former un centre germinatif dans le tissu lymphoïde de l'oropharynx, en particulier dans les amygdales. Dans ce site, apparaît un nouveau programme d'expression plus restreint des protéines de latence : "le programme par défaut" où seules les protéines EBNA1 et LMP1 et 2 sont exprimées. Ce programme particulier va permettre aux lymphocytes B infectés de sortir du centre germinatif et d'évoluer vers un statut de lymphocytes B mémoires qui contiennent le génome viral sous forme épisomale sans aucune expression de protéine virale. Cette troisième forme de latence est dénommée : "latence 0". Ces lymphocytes B mémoires ne seront donc pas reconnus par l'immunité cellulaire comme des lymphocytes infectés à détruire. Lorsque les lymphocytes B mémoires infectés vont se diviser, pour maintenir le génome viral à l'intérieur de chacune des cellules filles, seule la protéine virale EBNA1 est cette fois-ci exprimée (forme de latence dite : "EBNA1 isolée"). Cette protéine relie le génome viral au chromosome cellulaire, ce qui permet la ségrégation du génome viral dans chaque cellule fille. Cette protéine est difficilement reconnue par le système immunitaire, ce qui empêche la destruction des cellules qui l'expriment. La boucle est fermée quand les cellules mémoires sont activées au niveau des amygdales et se transforment en plasmocytes dans lesquels le cycle productif du virus se met en place et aboutit à la libération de nouveaux virions. Ces virus vont en effet infecter de nouveaux lymphocytes B naïfs pour reproduire le cycle précédent et être excrétés dans la salive, peut-être après une amplification du cycle lytique dans les cellules épithéliales, pour contaminer des individus non encore infectés.

Ce scénario a le mérite d'expliquer comment l'EBV persiste dans l'organisme en dépit d'une réponse immunitaire cellulaire et humorale : en effet, cette dernière ne peut éradiquer le virus dans les cellules B mémoires. La réponse cellulaire va cependant contrôler très efficacement le nombre de cellules infectées dans l'organisme et détruire dans le sang et les ganglions lymphoïdes les cellules où s'exprimerait le dangereux programme de croissance capable de faire proliférer les lymphocytes B. De même, la réaction humorale contre les antigènes du cycle lytique contrôle en partie la réplication virale et n'autorise qu'une certaine production de nouveaux virions dans la salive. Ce scénario permet également de comprendre (cf infra) le mécanisme des lymphoproliférations associées à l'EBV en cas d'immunodépression.

Cependant, de nombreuses inconnues subsistent à propos de cette persistance. Quel est le rôle de l'infection de cellules lymphoïdes non naïves ou des cellules épithéliales au décours de la primo-infection ? Quel est le rôle de l'excrétion élevée et prolongée du virus dans la salive que nous avons montrée dans les 6 mois qui suivent la primo-infection malgré une réponse immunitaire efficace ? Existe-t-il une excrétion salivaire chronique à bas bruit chez tous les porteurs sains, ou bien cette excrétion ne survient-elle que de manière périodique à l'occasion d'épisodes que l'on pourrait appeler réactivation virale ? Quel est le mécanisme expliquant la présence de plusieurs souches différentes chez un porteur sain : y-a-t-il une possibilité de ré-infection au cours de la vie, ou cette multi-infection a-t-elle lieu dès la primo-infection ? Les événements qui se déroulent principalement dans les amygdales peuvent-ils se dérouler dans d'autres tissus lymphoïdes ? Quelles sont les interactions moléculaires entre le virus et le lymphocyte B qui permettent au niveau de ces amygdales une expression aussi précise des différents programmes de latence ?

2. lymphome de Burkitt (LB)

Le lymphome qui a donné naissance à l'EBV !

Classiquement, il existe deux formes de LB : la "forme endémique" fréquente dans les pays africains équatoriaux et en Nouvelle Guinée-Papouasie, la forme "sporadique" rencontrée beaucoup plus rarement dans les pays occidentaux. Dans ces 2 formes, la cellule lymphomateuse dérive d'un lymphocyte B probablement issu des centres germinatifs. Ce lymphocyte malin comprend dans tous les cas l'une des 3 translocations suivantes : t(8;14) (la plus fréquente), t(2;8), t(8;22) qui mettent l'oncogène *c-myc* (présent sur le chromosome 8) sous la dépendance des gènes des chaînes lourdes (chromosome 14) ou légères (chromosome 2 ou 22) des immunoglobulines. Ces translocations conduisent à une hyper-expression de l'oncogène *c-myc*.

Histologiquement, les deux formes sont caractérisées par la présence de cellules tumorales monomorphes, de taille moyenne avec un très fort taux de prolifération et la présence de nombreuses cellules apoptotiques. Cliniquement, ces deux formes se révèlent le plus souvent par des manifestations extra-ganglionnaires avec des

différences toutefois : l'atteinte au niveau de la mâchoire est très fréquente dans les formes endémiques avec une sensibilité plus grande à la chimiothérapie. Dans la forme sporadique, on observe plus souvent une atteinte digestive et un envahissement médullaire. L'atteinte ganglionnaire est fréquente dans les LB se développant dans le contexte spécifique de l'infection VIH.

41 ans après sa découverte, le rôle toujours non élucidé de l'EBV dans le LB

L'EBV est associé au lymphome de Burkitt endémique dans presque 100% des cas. A l'inverse, l'EBV n'est détectable que dans 15 à 20 % des cas de LB sporadique, sauf dans le cas particulier de l'infection VIH où la fréquence de détection avoisine les 30 à 40%. Pour compliquer les choses, le virus est présent dans 50 à 85 % des LB survenant dans des pays ayant une incidence intermédiaire comme au Brésil ou en Afrique du Nord.

Quelle que soit la fréquence de détection du génome viral, seuls la protéine EBNA1 et les ARN EBERs sont exprimés dans les cellules tumorales, ce qui définit la latence de type I. Du fait de ces différences dans le taux de détection du génome viral et du fait d'une expression virale limitée à EBNA1, le rôle du virus dans cette tumeur reste controversé. Pour Alan Rickinson, l'EBV pourrait avoir un rôle initiateur par l'intermédiaire du programme de latence de type III lors de la primo-infection ou en cas d'immunodépression. Cette latence de type III aboutissant à une prolifération intense des lymphocytes B favoriserait l'émergence de la translocation du gène c-myc à l'intérieur d'une cellule B. L'apparition de cette translocation donnerait à la cellule un avantage prolifératif qui ne rend plus nécessaire le programme de type III. Cette translocation va au contraire entraîner la sélection des clones exprimant la latence de type I le plus souvent, ou un programme de latence atypique intermédiaire entre le I et le III avec une inactivation de l'EBNA2 et par voie de conséquence des LMPs. Dans un autre scénario, l'EBV donnerait un avantage supplémentaire à une cellule où la translocation serait déjà présente grâce à une stimulation chronique des lymphocytes B par le paludisme ou l'infection VIH. Ces infections chroniques augmentent également le nombre de lymphocytes B infectés par l'EBV. L'avantage serait conféré par les propriétés oncogéniques récemment démontrées de EBNA1 ou des EBERs. Par

exemple, le blocage de l'EBNA1 dans des lignées issues de lymphome de Burkitt entraîne la mort des cellules, ce qui suggère un rôle de la protéine virale dans la survie des cellules malignes. Les EBERs en induisant une sécrétion d'IL10 pourraient également protéger les cellules de LB de l'apoptose .

3. syndrome lymphoprolifératif post-transplantation

Le syndrome lymphoprolifératif post-transplantation (SLPT) inclut par définition toutes les lymphoproliférations qui surviennent après une greffe d'organe ou de moelle osseuse. Globalement, entre 80 à 90 % de ces tumeurs sont associées à l'EBV qui est le facteur étiologique prédominant.

Ces lymphoproliférations, le plus souvent extra-ganglionnaires, se développent aux dépens des lymphocytes B dans plus de 80 % des cas. Ces SLPT se présentent sous un large spectre morphologique. On peut distinguer schématiquement 3 grandes formes morphologiques: hyperplasie polyclonale avec différenciation plasmocytaire ; prolifération polymorphe polyclonale, oligoclonale ou monoclonale ; prolifération monomorphe immunoblastique monoclonale.

L'incidence des SPLT dépend essentiellement du type de tissu greffé, du statut immunitaire du couple receveur-donneur, de l'âge du receveur, du type d'immunodépresseurs anti-rejet utilisés, et d'autres facteurs moins importants ([tableau V](#)). A immunodépression équivalente, les SLPT sont plus fréquents dans les greffes de poumon ou d'intestin, ce qui pourrait s'expliquer par la grande quantité de tissu lymphoïde dans ces organes (1, 5, 14, 24, 34, 39, 46). La primo-infection chez un receveur EBV-séronégatif greffé avec un greffon d'un donneur séropositif est un facteur de risque important : lors des greffes d'organe, les greffés EBV-séronégatifs présentent un risque de SLPT 10 à 76 fois plus élevé que les greffés EBV-séropositifs. Cela explique la grande fréquence de SLPT précoces chez les jeunes enfants qui bénéficient d'une greffe d'organe. A l'inverse, les patients plus âgés (plus de 49 ans) présentent de nouveau un risque plus important en particulier au-delà de la première année qui suit la greffe, peut-être à cause de l'altération de la réponse immunitaire de l'hôte. Enfin, le

Tableau V : Risque de SLPT en % selon les types de greffe

Type de greffe	Incidence	Références
Moelle	0,5-1%	Curtis et al. (14)
Rein	1 %	Nalesnik et al. (39)
Foie	2,2 %	
Cœur	3,4 %	Armitage et al. ; Levine et al. (5, 34)
Poumon	1,8-7,9 %	
Cœur-poumon	9,4 %	Randhawa et al. (46)
Intestin	7-11 %	Abu-elmagd et al. ; Grant et al. (1, 24)
Multi-organes	13-33 %	

statut sérologique EBV des transplantés de moelle semble moins influencer l'incidence du SLPT puisque c'est le greffon qui apporte à la fois l'EBV et les cellules anti-EBV. La fréquence des SLPT sur ce terrain dépend donc essentiellement du type de greffe (B- ou T- déplété) et du traitement immunosuppresseur.

La physiopathologie des SLPT associés à l'EBV est complexe. La déficience de l'immunité cellulaire anti-EBV est au premier plan. Ce déficit est provoqué par le traitement immunosuppresseur administré pour la prévention du rejet de greffe. Chez les greffés de moelle osseuse, il est provoqué par les fortes doses de radiothérapie et/ou chimiothérapie, par la déplétion du greffon en cellules T, et par le traitement immunosuppresseur contre la maladie de la réaction du greffon contre l'hôte. En plus du déficit de l'immunité cellulaire anti-EBV, des études récentes incriminent principalement deux phénomènes : la survenue d'un accident génétique ou épigénétique dans l'organisme, associé à un blocage de la différenciation des cellules B naïves infectées ou à l'infection directe des cellules B mémoires (44).

Les cellules B naïves infectées par l'EBV expriment le répertoire entier des protéines de latence, c'est-à-dire la latence de type III qui induit une prolifération cellulaire polyclonale. Le microenvironnement local représenté par les cytokines peut induire préférentiellement la prolifération de certains clones, d'où l'évolution vers une prolifération oligoclonale ou

monoclonale. Chez l'immunocompétent, ces cellules infectées sont éliminées soit par l'intermédiaire d'une différenciation vers les cellules mémoires quiescentes qui n'expriment pas de protéines de latence, soit par la réponse cytotoxique T qui reconnaît les antigènes EBV. Chez l'immunodéprimé, le taux de prolifération cellulaire peut dépasser celui de la clearance immunitaire et de la différenciation cellulaire, entraînant l'apparition d'un SLPT. Des anomalies cytogénétiques peuvent survenir en même temps et seraient responsables de la forme maligne du SLPT.

Le traitement d'un SLPT avéré relève toujours d'une diminution des doses des immunosuppresseurs, quand cela est possible, avec un taux de réponse qui varie chez les greffés d'organe entre 25 et 63% (23). Dans les cas où la diminution de l'immunosuppresseur n'est pas efficace, on peut instaurer un traitement par des anticorps monoclonaux anti-lymphocytes B (anti-CD20 ou Rituximab), avec un taux de réponse de 60 à 100% quelle que soit la greffe. La chimiothérapie conventionnelle est réservée aux cas résistants aux anti-CD20. Des résultats prometteurs ont été obtenus avec des thérapies cellulaires impliquant des cellules T cytotoxiques anti-EBV générées et amplifiées ex vivo, en particulier chez les greffés de moelle. Les antiviraux ou l'injection d'Ig neutralisantes ont été utilisés, mais leur intérêt est limité aux cas de donneur EBV+/ receveur EBV-, où ils freinent la production des virions par les lymphocytes B du donneur. D'autres molécules ont été testées dans le traitement des SLPT notamment l'interféron et les anticorps anti-IL6, mais des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux définir leur place dans le traitement des SLPT.

Intérêt de la charge virale dans les SLPT

Les signes cliniques du SLPT sont parfois comparables à ceux d'une réaction du greffon contre l'hôte ou d'une réaction de rejet, mais les stratégies thérapeutiques de ces deux complications sont complètement opposées, (diminution ou augmentation de l'immunosuppression respectivement). Il est donc primordial de trouver un moyen rapide et efficace permettant de différencier les deux complications.

La mesure de la charge virale EBV dans le sang périphérique pourrait apporter une aide importante dans le diagnostic précoce et le suivi du SLPT, mais l'utilisation de la charge virale EBV seule pour la prédiction du développement d'un SLPT présente des limites.

En effet, l'intérêt du suivi de la charge virale EBV dans la prédiction du risque d'un SLPT ou pour son diagnostic dépend du type de greffe, du statut EBV avant la greffe, du type et des doses d'immunosuppresseurs, et de l'âge des patients. Il faut rappeler que quelques cas de SLPT ont été décrits chez des patients ayant des charges virales faibles ou négatives (6). D'autre part, il est actuellement difficile de définir une valeur de charge virale EBV à partir de laquelle on peut considérer qu'il y a toujours un risque de développer un SLPT. Cette difficulté réside dans le fait qu'il n'y a pas de technique standard qui mesure la charge virale dans un compartiment unique. La revue de la littérature montre une grande disparité dans les seuils de charge virale EBV, avec des valeurs allant de 300 jusqu'à 100 000 copies/ μ g ADN (tableau VI). La principale cause de ces disparités est l'utilisation de différentes techniques pour quantifier l'ADN viral, et de différents types de prélèvements obtenus dans des populations de transplantés très différentes d'une étude à l'autre (21, 32, 35, 40, 48, 58, 60, 62).

Tableau VI : Seuil, sensibilité et spécificité de la charge virale EBV dans les SLPT

(à noter la très grande variabilité entre les différents seuils indiquant la possibilité d'un SLPT)

Etude	Méthode	Sensibilité	Spécificité	Seuil
PBMC				
Rooney et al. (48)	Semi-quantitative (copies/ μ g ADN)	80%	100%	20 000
Lucas et al. (35)	Semi-quantitative (copies/ μ g ADN)	71%	94%	40 000
Hoshino et al. (32)	PCR tps réel (copies/ μ g ADN)	100%	73%	320
Wagner et al. (60)	PCR tps réel (copies/ μ g ADN)	100%	89%	4000
Plasma				
Van Esser et al. (58)	PCR tps réel (copies/mL)	100%	89%	1000
Ohga et al. (40)	PCR tps réel (copies/mL)	100%	100%	40 000
Sang total				
Gärtner et al. (21)	PCR compétitive (copies/mL)	87%	91%	100000
Yancoski et al. (62)	PCR tps réel (copies/mL)	95,8%	71,4%	6215

De manière globale, de nombreuses études ont établi une corrélation positive entre une charge virale EBV élevée et le développement d'un SLPT. L'augmentation de la charge virale dans le sang périphérique peut être observée environ 4 semaines avant la survenue d'un SLPT précoce (survenant dans la première année de la greffe), et plus de 6 mois avant la survenue d'un SLPT tardif (plus d'un an après la greffe), d'où la nécessité d'un suivi régulier de la charge virale chez les greffés. Le plasma aussi bien que le sang total ou les PBMCs peuvent être utilisés pour la mesure de la charge virale dans le cadre d'un diagnostic ou d'un suivi d'un SLPT (18).

Par ailleurs, nous avons observé (communication personnelle) des charges virales élevées dans le LCR chez les patients présentant un SLPT avec atteinte cérébrale. Ces charges virales (>10000 cp/ mL) étaient significativement plus élevées que celles observées dans les LCR de patients VIH ou greffés sans SLPT, dans lesquels l'EBV était parfois détecté. D'où l'intérêt de quantifier l'ADN viral dans le LCR en cas de suspicion de lymphome cérébral.

Pour améliorer la pertinence de la mesure de la charge virale EBV dans le diagnostic précoce du SLPT, des études récentes (7, 12, 36) l'ont associée à la mesure des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) circulants chez les greffés. Les charges virales EBV élevées étaient toujours prédictives du développement d'un SLPT uniquement dans le cas où elles étaient associées à une réponse CTL faible ou indétectable (VPP : 100%). Mais la lourdeur et le coût de la technique de mesure de la réponse CTL limitent son utilisation en pratique quotidienne.

4. lymphome de Hodgkin

Les relations épidémiologiques compliquées entre Hodgkin et EBV

La maladie de Hodgkin (MH) ou lymphome de Hodgkin est définie par la présence, au sein des ganglions, d'une cellule anormale dite cellule de Reed-Sternberg (RS), cellule lymphoïde d'origine B, dérivée des cellules post centre germinatif ayant des réarrangements clonaux mais anormaux des gènes des immunoglobulines. Cette cellule tumorale est faiblement représentée au sein de la tumeur (1% des cellules) au milieu d'un tissu réactionnel important de lymphocytes non tumoraux T et B avec ou sans fibrose. En fonction de l'organisation de ce tissu réactionnel, deux types de MH sont décrits : la MH classique (95% des cas) et la MH nodulaire à prédominance lymphocytaire. La MH classique est subdivisée en 4 sous-types histologiques : scléro-nodulaire (2/3 de l'ensemble des MH dans les pays développés), à cellularité mixte, riche en lymphocytes, et lympho-déplété.

Dans les pays développés, l'incidence de la MH est faible, estimée à 2,4 /100 000 habitants/an, ce qui représente seulement 10% de l'ensemble des lymphomes B dans la population générale. Il existe deux pics d'incidence de la MH : le premier chez des individus jeunes (20-30 ans) et le second chez des patients plus âgés. 30 à 40% des MH classiques contiennent le génome EBV à l'état clonal dans les cellules RS alors que le virus est toujours absent des formes nodulaires à prédominance lymphocytaire. Dans ces formes associées à l'EBV, le génome viral est présent dans toutes les cellules tumorales lors de la découverte de la maladie et également lors des rechutes. La fréquence de l'association dépend à la fois de l'âge de survenue et du type histologique de la tumeur. Le génome est presque toujours présent dans les MH de l'enfant et du sujet âgé alors qu'il l'est beaucoup moins souvent chez les patients entre 15 et 35 ans. La présence du génome est plus fréquente dans les formes à cellularité mixte (70%) et lympho-déplétées (90%) que dans la forme scléro-nodulaire (10-40%), forme prédominante chez le sujet jeune.

Le risque de développement de MH classique chez le sujet infecté par le VIH est 3 à 6 fois supérieur à celui de la population non VIH et l'association avec l'EBV est également plus fréquente (90% des cas). Les MH survenant dans d'autres contextes d'immunodépression (greffe, immunodéficit congénital) sont également la plupart du temps associées à l'EBV. Dans des pays en développement, la fréquence d'association avec l'EBV est également plus importante et peut atteindre 100% dans certaines études.

Les relations entre MH et mononucléose infectieuse (MNI) sont très discutées et complexes : les MH le plus souvent associées à l'EBV surviennent dans des pays en développement où la MNI est peu fréquente. Dans les pays développés où la MNI est fréquente, la MH est plus rarement associée à l'EBV. Cependant, plusieurs études épidémiologiques dans les pays nordiques mettent en évidence un lien entre MNI et développement ultérieur d'une MH. Les études de Hjalgrim et al. (29) montrent un risque de développer une MH EBV-positive (présence du génome dans la cellule RS) 4 fois plus élevé chez des individus ayant présenté une MNI, que chez les individus n'ayant jamais eu de MNI clinique. Les auteurs estiment la médiane d' "incubation" de la MH "associée" à l'EBV après une MNI à 4 ans avec un pic de 2,4 ans après la MNI. Par contre, le risque de développer une MH EBV-négative n'est pas plus élevé chez les patients aux antécédents de MNI que chez les individus sans MNI.

L'EBV un moyen pour la cellule de RS d'éviter l'apoptose

En général, dans les MH associées à l'EBV, trois protéines de latence de l'EBV sont exprimées dans les cellules de RS : EBNA1, LMP1, parfois LMP2 ainsi que les ARN non codants EBEBs, ce qui correspond à une latence virale de type II. Les protéines LMP1 et LMP2A semblent jouer un rôle important au moins au début du processus lymphomateux : en effet, la cellule de RS n'exprime pas les marqueurs/récepteurs habituels de surface d'une cellule B et devrait normalement mourir par apoptose. LMP2A pourrait prévenir cette apoptose en entraînant un signal mimant l'activité des Ig de surface. LMP1 permettrait aux cellules de RS d'échapper à cette apoptose en stimulant de manière constitutive l'activation de NF- κ B dans les cellules de RS. LMP1 est également capable d'induire *in vitro* l'expression de molécules anti-apoptotiques comme bcl2 et A20, mais l'hyperexpression de ces molécules dans la cellule de RS reste à démontrer.

Est-il utile de surveiller l'infection EBV en pratique dans la prévention et la prise en charge des MH ?

Malgré ces nombreux indices en faveur de l'association entre l'EBV et au moins certaines formes de MH, la caractérisation sérologique ou moléculaire de l'infection à EBV est inutile aujourd'hui en dehors des protocoles de recherche qu'il faut encourager.

Des titres d'anticorps anti-EBV (IgG anti-EA, anti-VCA et anti EBNA) légèrement plus élevés ont été détectés au cours de cette maladie, ou dans les 3 années précédant le diagnostic, mais cette constatation n'a pas d'incidence pratique. A ce jour, il n'y a pas d'études démontrant l'intérêt d'un suivi virologique post MNI pour un diagnostic précoce de MH. Aucune étude sur l'intérêt de la charge virale sanguine n'a été publiée, contrairement à d'autres cancers liés à l'EBV comme le SLPT et le NPC. Dans la mesure où la présence de l'EBV dans la tumeur n'influe pas aujourd'hui sur la prise en charge ni sur le pronostic, il n'y a pas lieu de rechercher en routine par PCR ou immunohistochimie le génome ou les protéines virales dans les biopsies tumorales en cas de découverte de MH. En effet, les études ayant rapporté un pronostic meilleur dans les cas EBV-positifs par rapport aux EBV-négatifs sont controversées ; de même, une plus grande agressivité dans les MH associées à des souches EBV présentant une délétion dans LMP1 n'a pas été toujours retrouvée.

Un traitement anti-EBV est-il envisageable dans les MH associées au virus ?

Actuellement, le traitement des MH classiques repose sur une prise en charge par chimiothérapie et/ou radiothérapie. Les stratégies dépendent essentiellement de l'extension du cancer et parfois du type histologique mais pas de la présence ou non de l'EBV. L'autogreffe de moelle est réservée aux formes résistantes au traitement initial. Dans la forme nodulaire à prédominance lymphocytaire, une chirurgie d'exérèse avec ou sans radiothérapie peut suffire. Globalement, le pronostic des MH est bon avec un taux de guérison d'environ 80%. Ces patients guéris sont néanmoins susceptibles de présenter des complications à long terme avec en particulier un risque plus grand que dans la population générale de développer des tumeurs solides et des accidents cardiovasculaires qui justifient une recherche de drogues cytostatiques moins toxiques ou une

approche en immunothérapie. Actuellement des essais sont en cours avec des anticorps monoclonaux anti-CD30, un antigène fortement exprimé à la surface des cellules de RS. Des essais d'injection de cellules T cytotoxiques anti-EBV du patient sont également en cours, après amplification *in vitro* et ciblage des antigènes LMP exprimés par la cellule de RS mais les résultats sont décevants. Une des raisons pourrait être un environnement cytokinique tumoral, défavorable à l'action de ces clones cytotoxiques.

5. lymphome malin non hodgkinien des patients VIH-positifs (LMNH)

Les LMNH de ces patients sont très souvent associés à l'EBV

L'incidence des LMNH chez les patients infectés par le VIH est 60 fois plus élevée que dans la population générale. Le génome EBV est détectable dans les cellules tumorales de 60 à 70 % des cas mais cette fréquence varie selon le type histologique et la localisation du LMNH. On distingue schématiquement 3 types de LMNH dans ce contexte : (i) les LMNH à grandes cellules et à cellules immunoblastiques, (ii) le lymphome de Burkitt et les formes apparentées, (iii) le lymphome primitif des séreuses. Les LMNH à grandes cellules et les LMNH immunoblastiques sont les tumeurs rencontrées le plus fréquemment même si leur incidence tend à diminuer depuis les multithérapies anti-VIH. Ces LMNH surviennent en effet le plus souvent sur un terrain fortement immunodéprimé, contrairement au lymphome de Burkitt, avec des localisations extraganglionnaires fréquentes et un mauvais pronostic. Les lymphomes à grandes cellules sont associés à l'EBV dans 20 % des cas, les LMNH immunoblastiques dans 80 % des cas. Cette fréquence atteint presque 100% dans la forme particulière des LMNH cérébraux primitifs qui sont souvent de nature immunoblastique. L'expression des protéines virales dans la tumeur est variable et plusieurs types de latence peuvent co-exister en particulier dans les tumeurs immunoblastiques qui sont souvent polyclonales. Dans ces formes immunoblastiques, on retrouve néanmoins le plus souvent une expression similaire aux SLPT avec une latence de type III et la présence de certaines protéines du cycle lytique (EB1/Zebra), en particulier dans les formes cérébrales. L'EBV semble donc jouer un rôle initial primordial

dans les formes immunoblastiques, qui présentent également des anomalies cytogénétiques au niveau de l'oncogène *c-myc*. Dans les LMNH à grandes cellules, on retrouve un réarrangement de l'oncogène *Bcl6* dans 20 % des cas.

Le lymphome primitif des séreuses est une tumeur rare, y compris sur ce terrain, caractérisée par une prolifération d'une forme particulière de lymphocytes B constamment infectés par l'herpesvirus humain de type 8 (HHV8) ; l'EBV n'est présent que dans 50 % des cas. Sa particularité est de se développer initialement à partir des séreuses sous forme d'épanchements malins isolés ou plus rarement associés à d'autres localisations extra-ganglionnaires. Il est admis que l'HHV8 est à la base de la lymphomatogénèse et que l'EBV n'est pas indispensable mais peut apporter un avantage prolifératif supplémentaire.

En dehors de quelques exceptions, le suivi EBV n'est pas encore validé pour la prise en charge des LMNH chez le patient VIH- positif.

De nombreuses études ont montré que le profil sérologique et la charge virale sanguine EBV étaient modifiés chez ces patients. Le profil sérologique est souvent en faveur d'une réactivation virale (augmentation des titres d'IgG anti-VCA et EA avec ou sans IgA anti-VCA) avec une diminution ou une disparition des IgG anti-EBNA (on parle de profil sérologique déséquilibré). Les charges virales sanguines et salivaires sont en général plus élevées que chez l'individu sain. Cependant, la fréquence de ces modifications et leur corrélation avec l'intensité de l'immunodépression sont encore aujourd'hui discutées. L'intérêt de la recherche de ces marqueurs pour dépister les sujets à risque de développer un LMNH ou orienter le diagnostic lors d'une suspicion a parfois été rapporté dans la littérature mais ces études ne sont pas suffisantes pour conseiller actuellement un suivi de l'infection EBV chez ces patients. L'exception notable est celle des LMNH cérébraux primitifs où la mise en évidence du génome viral dans le LCR est un élément en faveur de la nature lymphomateuse du processus expansif intra-crânien et pourrait, pour certains, éviter la biopsie cérébrale si celle-ci s'avérait trop dangereuse. A noter dans ce contexte certains cas publiés d'efficacité des antiviraux dans des processus tumoraux intracrâniens associés à l'EBV.

6. carcinome indifférencié du nasopharynx (NPC)

Un problème de santé publique dans certaines régions du globe

Le carcinome indifférencié du nasopharynx (ou carcinome du nasopharynx de type III selon la classification OMS) est une tumeur qui se développe aux dépens de l'épithélium de la cavité rétronasale, d'où les signes cliniques d'appel insidieux et une découverte le plus souvent au stade d'une métastase ganglionnaire cervicale. Du point de vue histologique, la tumeur est caractérisée par des cellules carcinomateuses indifférenciées associées à un important infiltrat lymphocytaire majoritairement de type T. Dans certaines provinces de Chine du Sud (Canton, Hong Kong, Guanzhou) et à Taiwan, son incidence atteint 30-80 cas pour 100 000 habitants/an (contre 0,5 à 2/100 000 en Europe et aux Etats-Unis), ce qui en fait le cancer le plus fréquent chez l'homme adulte. Dans ces régions, le NPC s'avère un problème de santé publique dans la mesure où la survie sous traitement à 5 ans des tumeurs supérieures à 2 cm est inférieure à 50 %. Son incidence est également élevée (8 à 12/100 000 habitants/an) dans d'autres pays d'Asie comme le Vietnam ou l'Indonésie, dans certaines populations de l'Alaska et du Groenland et dans les pays d'Afrique du Nord. Dans le nord de la Chine au contraire, son incidence est plus faible (3/100 000/an). Cette distribution s'explique actuellement par une susceptibilité génétique particulière associée à des facteurs environnementaux. Il existe en effet des cas d'agrégation familiale de NPC en Chine et on constate une diminution de l'incidence chez les chinois ayant émigré en Occident (mais cette incidence reste toujours plus élevée que dans la population blanche). Les facteurs environnementaux comportent surtout des habitudes alimentaires ou culturelles (méthodes de conservation du poisson, herbes médicinales en Chine, méthodes de conservation de la viande et assaisonnements en Afrique du Nord, etc.)

Le rôle de l'EBV : nécessaire mais insuffisant

Le rôle important de l'EBV dans ce cancer est probable pour au moins trois raisons :

- 1.** Le génome complet de l'EBV est détecté à l'intérieur des cellules tumorales dans 100 % des biopsies de NPC. Cette fréquence de détection fait de cette tumeur le cancer le plus fréquemment associé à l'EBV.

2. L'étude moléculaire des régions répétées du génome a montré que le virus est présent à l'état clonal dans les cellules tumorales. Cette clonalité implique la présence du virus dans la cellule avant sa transformation maligne.

3. Le virus exprime des protéines potentiellement oncogènes à l'intérieur de la cellule tumorale. La protéine EBNA1 et les ARN non codants EBERS sont présents dans 100% des cas, les protéines LMP2A et 2B dans 75% des cas, la protéine LMP1 dans 50 à 65% des cas. Le transcrite BARF 1 est également régulièrement détecté dans la tumeur et son expression semble spécifique de la cellule épithéliale mais la présence des protéines correspondantes est controversée. Il pourrait avoir le même rôle que LMP1 en induisant une résistance à l'apoptose via l'induction du facteur anti-apoptotique bcl2. En fait, la fréquence de détection des différents transcrits ou des protéines correspondantes semble dépendre des sensibilité et spécificité des techniques utilisées. Quoiqu'il en soit, cette expression correspond à une latence de type II et il est admis que cette latence participe au maintien du phénotype malin. Plusieurs protéines du cycle lytique, notamment les protéines très précoces ou précoces comme EB1/Zebra, EB2, BARF1, ont été détectées dans les tumeurs. Le rôle du cycle lytique, d'ailleurs induit par les facteurs alimentaires, dans le maintien du phénotype transformé de la cellule est en cours d'exploration. Il est cependant admis que le génome viral n'est pas détectable dans les tissus nasopharyngés normaux des sujets à haut risque de NPC mais devient détectable dans les dysplasies sévères et les cancers *in situ*. L'hypothèse actuelle se fonde sur la présence initiale d'anomalies génétiques chez les individus à risque (notamment des délétions sur les chromosomes 3 et 9). Ces anomalies seraient la première étape du processus malin et favoriseraient la pénétration et la persistance de l'EBV dans les cellules. Le virus apporte ensuite, par l'expression des protéines citées plus haut, un avantage supplémentaire (décisif ?) à la cellule qui va donner naissance au clone malin. La présence d'une souche particulière d'EBV dans les NPC a été évoquée mais n'est pas démontrée et ne pourrait correspondre qu'à des particularités épidémiologiques géographiques. L'une des principales questions non résolues à l'heure actuelle est la suivante : comment la cellule exprimant la latence virale de type II peut-elle échapper à la surveillance immunitaire des CTL anti-EBV ?

L'association de l'EBV aux autres formes de cancer du nasopharynx (types I et II selon la classification OMS) est possible mais controversée. La présence de l'EBV a également été rapportée, avec une fréquence moindre que dans le NPC, dans d'autres carcinomes indifférenciés avec une forte infiltration lymphocytaire (thymus , estomac, amygdale).

L'indiscutable apport du laboratoire de virologie dans le diagnostic et le suivi du NPCO

Avant l'apparition du cancer clinique, les titres d'anticorps IgA anti-VCA et anti-EA (déterminés classiquement par immunofluorescence indirecte plutôt que par ELISA) chez les sujets à risque ou atteints de NPC infra-clinique sont élevés, ce qui rend cette sérologie très intéressante pour le dépistage précoce des tumeurs dans les pays à forte endémie. D'autres marqueurs sérologiques (IgG anti-Zebra) sont en cours d'étude mais ne sont pas disponibles en routine dans ces pays. Par contre, des publications récentes suggèrent que la quantification de l'ADN viral sérique serait équivalente ou supérieure au dépistage sérologique .

Le diagnostic du NPC est avant tout histopathologique mais la présence du génome ou des ARN EBER détectés par PCR ou hybridation *in situ* est un critère du diagnostic. Il n'est pas démontré définitivement si la charge virale intra-tumorale ou l'expression de certaines protéines (LMP1) ont une importance pronostique. Il n'est pas nécessaire non plus en routine de chercher à typer la souche virale intra-tumorale. En revanche, le titrage des IgA anti-VCA et anti-EA et la quantification de l'ADN sérique sont indispensables car ces marqueurs diminuent souvent sous traitement. Une ré-ascension à distance d'une cure thérapeutique est en faveur d'une récurrence locale ou métastatique.

L'EBV dans le NPC : une potentielle cible thérapeutique ?

Le traitement du NPC repose sur la radiothérapie avec ou sans chimiothérapie mais de nombreuses études tentent de démontrer l'intérêt de cibler l'infection virale dans la prise en charge de ce cancer.

Des essais de phase 1 d'immunothérapie ont débuté avec des cellules dendritiques chargées en peptides dérivés de la protéine LMP2 pour tenter de stimuler les CTL cytotoxiques capables de détruire les cellules tumorales exprimant la protéine virale. Des essais *in vitro* montrent l'intérêt de stimuler la réplication virale à l'intérieur de ces cellules pour exprimer des enzymes virales du cycle lytique capables d'activer des drogues cytotoxiques. Des essais de thérapie génique chez l'animal ont montré la possibilité d'introduire dans les cellules tumorales un facteur apoptotique dans un vecteur adénovirus qui se répliquera uniquement sous le contrôle de EBNA1. Bien que la plupart des études portant sur un vaccin anti-EBV soient actuellement décevantes, la prévalence importante de ce cancer en Asie et le rôle probable de l'EBV constituent deux excellentes justifications pour poursuivre ces études.

En résumé, voici les types prédominants de latence retrouvés dans les principales maladies malignes associées à l'EBV.

lymphome de Burkitt endémique	latence I
lymphome de Burkitt chez le sujet VIH-positif	latence I/II
maladie de Hodgkin	latence II
carcinome du nasopharynx	latence II
lymphome immunoblastique ou à grandes cellules chez le sujet VIH-positif	latence II/III
syndrome lymphoprolifératif post-transplantation	latence III
lymphome du système nerveux central chez le sujet VIH-positif	latence III

Diagnostic biologique et marqueurs de l'infection

*du diagnostic étiologique jusqu'au
suivi thérapeutique, et au-delà vers
le dépistage et
les marqueurs d'association*

CHAPITRE III

On peut schématiquement regrouper les objectifs du diagnostic virologique de l'infection à EBV dans quatre catégories. 1. Diagnostiquer, dans un contexte d'infection aiguë, une mononucléose infectieuse et plus généralement une primo-infection à EBV. 2. Apporter des arguments étiologiques en cas de pathologie tumorale : cancers associés au virus chez le sujet immunocompétent (lymphome de Burkitt, carcinome du nasopharynx, lymphome de Hodgkin ...). 3. Prédire l'émergence d'un lymphome à EBV chez l'immunodéprimé, et suivre l'évolution de la charge virale. 4. Dépister l'infection à EBV lors d'un don d'organes ou de cellules, dans un contexte plus général de transmission d'une souche virale d'un donneur à un receveur. Selon ces différents contextes, l'exploration EBV reposera plutôt sur des tests sérologiques, ou plutôt sur des méthodes moléculaires.

Méthodes sérologiques

tout est dans le profil !

Le diagnostic sérologique repose sur la détection ou le titrage des anticorps (Ac) dirigés contre plusieurs types d'antigènes (Ag) EBV : des antigènes du cycle productif comme les VCA et les EA, des antigènes du cycle de latence comme les EBNA.

1. les lignées lymphoblastoïdes comme sources d'antigènes EBV dès l'origine

Depuis plus de 30 ans, on utilise des lignées lymphoïdes comme sources d'antigènes EBV pour des réactions d'immunofluorescence ([Tableau VII](#)). Des lymphocytes B malins provenant de lymphome de Burkitt se sont établis en lignées continues : un petit pourcentage des cellules produit des Ag VCA. On pourra donc détecter sur les cellules fixées les Ac anti-VCA présents dans le sérum des patients. La lignée la plus utilisée dans ce but est appelée P3HR-1. On se sert souvent aussi de la lignée B95-8, cellules de singe infectées à l'origine par une souche d'EBV de MNI : 10 à 15 % des cellules produisent

des Ag VCA. Une autre lignée de lymphome de Burkitt, la lignée Raji, est utilisée pour détecter les Ac anti-EBNA. Ces cellules, qui ne produisent pas d'Ag VCA, synthétisent les Ag EBNA. Mais on ne peut visualiser en immunofluorescence les Ag EBNA qu'en ajoutant une étape à la réaction : une source de complément humain réagit avec le complexe Ag-Ac et c'est un anti-complément conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine qui révèle la réaction. Chacune des cellules Raji exprime les Ag EBNA. La présence d'Ac anti-EBNA dans le sérum sanguin est mise en évidence sous forme d'une fluorescence homogène du tapis cellulaire puisque toutes les cellules sont positives. Dans certains cas, il est utile de détecter les Ac anti-EA. Pour cela, on utilise ces mêmes cellules Raji que l'on va stimuler en culture à l'aide de substances chimiques comme des esters de phorbol : 10 à 20 % des cellules synthétisent alors les Ag EA, Ag précoces signant l'entrée de l'infection virale en cycle lytique. Ces Ag sont révélés dans une réaction d'immunofluorescence

Tableau VII : Quelques lignées lymphoïdes utilisées au laboratoire, en particulier pour le diagnostic sérologique par immunofluorescence.

Nom	Origine	Ag (ou virus) produits	Applications
B95-8	Lymphocytes de singe immortalisés par l'EBV de MNI	<ul style="list-style-type: none"> • Ag VCA dans les cellules • virions immortalisants dans le milieu de culture 	<ul style="list-style-type: none"> • détection des Ac anti-VCA • établissement de nouvelles lignées lymphoblastoïdes
P3HR-1	lymphome de Burkitt	<ul style="list-style-type: none"> • Ag VCA dans les cellules • virions non immortalisants dans le milieu de culture 	<ul style="list-style-type: none"> • détection des Ac anti- VCA
Raji	lymphome de Burkitt	<ul style="list-style-type: none"> • Ag EBNA dans les cellules • Ag EA après induction 	<ul style="list-style-type: none"> • détection des Ac anti-EBNA • détection des Ac anti-EA
BJAB	lymphome de Burkitt probable	Lignée EBV-négative	<ul style="list-style-type: none"> • contrôle pour réaction d'EBNA
Namalwa	lymphome de Burkitt	Infection latente 2 copies de génome EBV par cellule	Lignée la plus utilisée comme gamme étalon pour la quantification génomique

classique, par une anti-IgG conjuguée par exemple. Comme les Ag EBNA ne sont pas révélés par l'immunofluorescence indirecte classique, la lecture des cellules positives en EA est facile. Depuis longtemps donc, on avait pu détecter séparément les IgG, les IgM et éventuellement les IgA contre les Ag VCA et contre les Ag EA.

Tableau VIII : Principales trousse d'immunofluorescence indirecte EBV commercialisées en France.

Distributeur	Fabricant	Nom du réactif
AES	VIRION	Epstein-Barr Virus IF Antigène
BIOADVANCE	EUROIMMUN	Epstein-Barr Virus antigène
BMD	IMMUNO- CONCEPT	EBV
BIOTRIN	PANBIO	EBV
EUROBIO	MRL	EBV
EUROBIO	VIRGO	
MERIDIAN	MERIDIAN BIOSCIENCE	Merifluor EBV

IF : immunofluorescence indirecte ACIF: immunofluorescence anti-Complément

De plus, le titrage de ces Ac, par dilutions successives des sérums a permis pendant des années de définir des profils sérologiques adaptés à chaque circonstance pathologique.

Aujourd'hui, cette méthode, bien que lourde et fastidieuse, est parfois encore utilisée dans le quotidien. Elle demeure pourtant la méthode de référence et sert à vérifier dans certains cas les résultats obtenus par d'autres méthodes ([Tableau VIII](#)).

VCA lignée P3HR1 : IF recombinant : RIFA*	EBNA lignée Raji ACIF ou recombinant ACIF**	EA (D+R) lignée Raji stimulée IF
VCA IgM VCA IgG	Ac EBNA-1 Ac EBNA-2 **lignée exprimant le recombinant EBNA-1 ou EBNA-2	
antigène de la capsid EBV-CA IgM, EBV-CA IgG et EBV-CA IgA	antigène nucléaire EBNA anticorps fixant le Complément	antigène précoce EBV EA IgG et EBV EA IgA
EBV-CA IgG test d'avidité		antigène précoce EBV EA test d'avidité
"Séquence de Biochips EBV", ces différents Ag sont dans les puits d'une même lame : test classique ou test d'avidité		
VCA IgM VCA IgG	cellules Raji (Ag EBNA) mélangées à des cellules BJAB négatives en EBV Ac EBNA	EA IgG
VCA IgM VCA IgG	Ac EBNA	EA IgG
*cellules de mammifères exprimant l'antigène recombinant : r-VCA IgM VCA IgG	Ac EBV-NA	EA IgG
VCA IgG		
VCA IgM VCA IgG	Ac EBNA IgG	EA IgG

Les méthodes immuno-enzymatiques ont commencé à être appliquées à la sérologie EBV dès les années 1980. La qualité des antigènes, qui étaient extraits des cellules lymphoïdes et purifiés, s'est lentement améliorée. Les Ag extraits de cellules lymphoïdes productrices de virions sont purifiés par gradient de saccharose ou par immunoaffinité avec le plus souvent un anticorps monoclonal anti-gp125. On peut stimuler les cellules lymphoïdes pour obtenir de plus grandes quantités d'Ag, notamment des EA. Ce procédé de purification permet d'obtenir des mélanges d'Ag, comme par exemple VCA + EA + EBNA.

Les protéines recombinantes sont de plus en plus utilisées, telles quelles ou modifiées en gardant la partie la plus immunogène ou en enlevant des éléments pouvant entraîner une moins bonne spécificité (p18, p23...). Les peptides synthétiques (p18...) sont également utilisés. Il existe aujourd'hui sur le marché une grande variété de trousse pour détection des anticorps sur microplaques ; on utilise beaucoup plus souvent des automates ouverts que fermés.

Par analogie avec les méthodes d'immunofluorescence mises au point anciennement, les trousse ELISA en microplaques ont été développées en général pour détecter les anticorps anti-VCA, anti-EBNA et parfois anti-EA.

La configuration la plus classique de ces trousse associe la détection des IgG anti-VCA, des IgM anti-VCA et des IgG anti-EBNA. C'est en effet la configuration la plus utile pour établir un profil sérologique interprétable dans les principales situations cliniques de primo-infection. Il faut remarquer que certains réactifs permettent de détecter les IgM anti-EA. En revanche, les trousse permettant de détecter les IgM anti-EBNA1 ne sont pas utilisées pour le diagnostic précoce de la MNI. La détection des IgA anti-VCA a, semble-t-il, été validée pour quelques trousse, mais ce test n'est employé en France que dans le carcinome du nasopharynx. Les IgA anti-EA sont rarement commercialisées et non validées par rapport à l'immunofluorescence en France.

Les IgG anti-EA n'apparaissent pas dans tous les cas de MNI ; elles servent surtout à confirmer un titre d'IgG anti-VCA élevé lors des cancers associés à l'EBV. Selon l'intensité du signal coloré, le titre des anticorps est plus ou moins élevé : on dispose ainsi d'un résultat semi-quantitatif ou même quantitatif, qui sera parfois utilisé en situation de maladie chronique associée à l'EBV.

Quelques rares trousse d'ELISA en plaques contiennent non pas des antigènes séparés, mais des mélanges d'antigènes ; on parlera ainsi d'Ag EBV (et non plus d'Ag VCA ou EA, ou d'Ag EBNA). D'autres trousse plus nombreuses utilisent des Ag recombinants ou des peptides synthétiques. Les résultats peuvent être très bons, mais il faut valider ces trousse en situation clinique. En effet, les spécificité, sensibilité et cinétique des Ac au début de la MNI doivent être connues de l'utilisateur ([tableau IX](#)).

Les tests d'ELISA sur membranes, sous forme de bandelettes, sont très utilisés car, unitaires, ils permettent d'analyser rapidement un sérum ([tableau X](#)). On détecte séparément les IgG et les IgM. Les spots colorés sont parfois discrets, et la lecture peut se révéler délicate.

Enfin, il existe des automates d'analyse permettant d'effectuer les tests EBV :

- ① déjà sur le marché comme le Liaison de Diasorin (chimio-luminescence) :
IgM VCA p18, IgG VCA p18, IgG EBNA1 (peptide), IgG EA-D (recombinant 47 kDa)
- ② disponibles prochainement (technologie Luminex) :
AtheNA multi-Lyte (Ingen/Zeus)
Bioplex 2200 (Biorad)
FIDIS (BMD)

Tableau IX : Principales trousse ELISA EBV commercialisées en France.

Distributeur	Fabricant	Nom du réactif
AES	VIRION	Epstein-Barr Virus kit EIA
BIOMERIEUX	DIASORIN	Vironostika EBV
BIOADVANCE	EUROIMMUN	EBV
BIORAD	TRINITY BIOTECH	Platelia® EBV
BIOTEST	BIOTEST	Biotech Anti-EBV
BIOTRIN	PANBIO	Epstein-Barr
BMD	GENBIO	EBV LISA
DIASORIN	DIASORIN	ETI-EBV-
DIASORIN	NOVATEC IMMUNO-DIAGNOSTICA	Epstein-Barr Virus ELISA
FUMOUCHE	DIESSE	Enzywell Epstein Barr
INGEN	IBL	Epstein-Barr Virus
INGEN	QUEST INTERNATIONAL	SeraQuest® EBV
INGEN	VIROTECH	Epstein-Barr
INGEN	TRINITY BIOTECH	Captia™anti-EBV
ELITECH FRANCE	SERION VIRION	Serion elisa classic EBV test kit
MAST DIAGNOSTIC	MAST DIAGNOSTICA	MASTAZYME EBV
MERIDIAN	ZEUS	Premier EBV elisa
MP BIOMEDICALS	MP BIOMEDICALS	Epstein-Barr ELISA
		Bioelisa EBV
R. BIOPHARM	R. BIOPHARM	RIDASCREEN EBV
SERVIBIO	VIRAMED	Servizyme EBV
DADE BEHRING	DADE BEHRING	Enzygnost anti-EBV

* sans copolymère Alanine-Glycine donnant des réactions croisées avec les auto-antigènes

IgM test d'immuno-capture : I.capture ou M reverse.

Ces tests sont qualitatifs, semi-quantitatifs ou quantitatifs.

La sensibilité, la spécificité, la valeur prédictive positive et la valeur prédictive négative de ces tests sont marquées sur les notices.

Antigènes EBV et anticorps recherchés			
VCA	VCA VCA p18	EBNA EBNA-1	EA EA-D
VCA IgM et VCA IgG		EBNA-1 IgG	
	peptide p18 VCA IgM (i.capture), VCA IgG	peptide EBNA-1* 56 acides aminés EBNA IgG	
Ag natif purifié /Ac gp125 EBV-CA IgM, IgG et IgA		recombinant EBNA-1 EBNA-1 IgG	recombinant EA-D EA-D IgM, IgG et IgA
Ag natif purifié /Ac gp125 : VCA IgM et Ag VCA purifié : VCA IgG		recombinant EBNA-1 EBNA-1 IgG	recombinant EA-D EA-D IgG
recombinant p23 entier / p18 incomplet VCA IgM et VCA IgG		recombinant EBNA-1 p72 EBNA IgG	recombinant EA p54/p138 EA IgM et EA IgG
Ag natif purifié /Ac gp125 VCA IgM et VCA IgG	peptide p18 VCA p18 IgG	recombinant EBNA-1* EBNA-1 IgM et IgG	recombinant EA-D IgG
Ag natif purifié /Ac gp125 VCA IgM et VCA IgG		recombinant EBNA-1 EBNA IgG	recombinant EA-D IgG
	peptide p18 IgM : M reverse IgG : VCA-G	peptide EBNA-1 IgG EBNA-G	
	peptide p18 IgM VCA		
Ag natif purifié VCA IgM et VCA IgG		recombinant EBNA IgG	
Ag natif purifié /Ac gp125 IgM, IgG et IgA		EBNA-1 IgM, IgG et IgA	EA IgM, IgG et IgA
Ag natif purifié /Ac gp125 VCA IgM	recombinant p18 VCA IgG	recombinant EBNA-1 EBNA IgG	
VCA IgM et IgG		EBNA-1 IgG	EA-D IgG
Ag natif purifié /Ac gp125 VCA IgM	recombinant p18 47 kDa et IgG VCA (p-18)	recombinant EBNA-1 EBNA-1 IgG	recombinant EA-D EA-D IgG
VCA IgM et IgG		EBNA-1 IgG	EA-D IgG
VCA IgM, IgG et IgA		EBNA-1 IgM, IgG et IgA	EA IgM, IgG et IgA
Ag natif purifié /Ac gp125 IgM anti-VCA Ag natif purifié IgG anti-VCA		peptide EBNA-1 IgG anti-EBNA-1	EA IgG
Ag natif (extrait P3HR1) IgM, IgG et IgA		recombinant EBNA-1 IgM, IgG et IgA	recombinant EA IgM, IgG et IgA
VCA IgM et IgG			
VCA IgM et IgG		EBNA-1 IgG	
Ag natif purifié /Ac gp125 IgM (immuno-capture) et IgG			EA IgM et IgG
Lignée B95-9 stimulée, Ag natif (mélange VCA, EA-D, EA-R, EBNA) IgM II, IgG et IgA			

Tests d'avidité IgG EBV en elisa

Bioadvance (Euroimmun) : EBV-CA (capside) détection des IgG de faible avidité

Dade Behring : réactif d'avidité pour test Enzygnost®

Tableau X : Principales trousse d'immunodot EBV commercialisées en France.

Immunodot EBV			VCA p18 recombinant	VCA p 23 recombinant
			BFRF3	BLRF2
			<i>Ag natif VCA p18</i>	
Réactifs	origine	fourni par		
ImmunoDot EBV mono M	GenBio	BMD		
ImmunoDot EBV mono G				
EBV CHECK IgM EBV CHECK IgG	MIKROGEN GmbH	ALL. DIAG.	VCA p18	VCA p23
recomLine EBV IgM recomLine EBV IgG	MIKROGEN GmbH	AbCys S.A.	VCA p18	VCA p23
Euroline EBV profil 2 IgM et IgG	Euroimmun GmbH	BIOadvance	VCA p19	VCA p22
ViraStripe® Test Kit IgM ViraStripe® Test Kit IgG ViraStripe® Test Kit IgM et IgG conjugué IgA disponible	Viramed GmbH	ServiBio	<i>VCA p18 Ag natif purifié par affinité</i>	
Epstein-Barr Virus IgM Dot Blot IgG Dot Blot	Virion	AES	<i>VCA p18 Ag natif purifié par affinité</i>	
EBV Ecoline IgM EBV EcoLine IgG	Virotech	Ingen	VCA p18	
EBV IgM / IgG blot 3.0	Genelabs	M P Diagnostics		VCA p23
recomBlot EBV IgG recomBlot EBV IgM/ IgA	MIKROGEN GmbH	AbCys S.A.	VCA p18	VCA p23

protéines recombinantes (écriture normale)

extraits purifiés de cellules productrices (italiques)

Monolert 2™ EBNA IgG et IgM	Meridian	EBNA-1 peptide
-----------------------------	----------	----------------

Western-blot				
Epstein-Barr Virus (EBV) IgM et IgG	Euroimmun GmbH	BIOadvance	divers Ag p27	VCA p22 VCA p33
Test sur bandelettes Marblot® du virus Epstein-Barr IgM et IgG	Trinity Biotech	Ingen	VCA p18	

Antigènes du support					
VCA gp 125 Ag natif purifié / immunochromato d'affinité BALF4	VCA	EA-D p54 recombinant BMRF1	EA p138 recombinant BALF2	EBNA-1 p72 recombinant BKRF1	MA gp 250/350 recombinant BLLF1
		<i>ou Ag EA-D p54 purifié</i>		<i>ou Ag EBNA-1 p76 purifié</i>	
<i>extrait P3HR1 purifié par affinité</i>				EBNA-1 p72	
	<i>extrait P3HR1 purifié par affinité</i>			EBNA-1 p72	
		EA-D p54	EA p138 partie la plus immunogène PM 40 kDa	EBNA-1 partie la plus immunogène PM 45 kDa	
		EA-D p54	EA p138 partie la plus immunogène PM 40 kDa	EBNA-1 partie la plus immunogène PM 45 kDa	
VCA gp 125 Ag natif purifié par affinité		EA-D		EBNA-1	
VCA gp 125 Ag natif purifié par affinité		EA-D p54 Ag natif purifié par affinité		EBNA-1 p76 Ag natif purifié par affinité	
VCA gp 125 Ag natif purifié par affinité				EBNA-1 p76 Ag natif purifié par affinité	
VCA gp 125		EA-D		EBNA-1	
		EA-D p54	EA p138	EBNA-1 p72	
		EA-D p54	EA p138 partie la plus immunogène PM 40 kDa	EBNA-1 partie la plus immunogène PM 45 kDa	MA gp 250/350 PM 70 kDa

Antigène EBV extrait traité au SDS - électrophorèse et transfert (PM en kDa)					
VCA p40/p41/p42	EA-D p43 EA-D p45	VCA p 65	EBNA-1 p 79	EA-R p93	VCA p 125
VCA p40 VCA p52	EA-D p49		EBNA-1 p76		VCA p112

2. anticorps hétérophiles

Les anticorps hétérophiles sont des anticorps non spécifiques de l'EBV qui apparaissent souvent au cours de la MNI typique. C'est donc un bon test diagnostique pour cette maladie. Il n'est bien entendu d'aucune utilité dans les cancers associés à l'EBV par exemple. Une première méthode pour les détecter avait été mise au point par Paul et Bunnell et optimisée ensuite par Davidsohn.

Ces anticorps hétérophiles spécifiques de la MNI, appelés également anticorps PBD, sont des IgM qui agglutinent différentes sortes de globules rouges animaux. Les anciennes hématies de mouton ont été remplacées par celles de cheval qui augmentent la sensibilité de la réaction sans faire perdre de sa spécificité. Comme il peut exister d'autres anticorps qui agglutinent aussi ces hématies (par exemple les anticorps de Forssman), il est nécessaire de faire des absorptions différentielles avant l'agglutination équine ([tableau XI](#)). Des anticorps PBD agglutinant des hématies de cheval, après absorption sur extrait de rein de cobaye, à un titre $\geq 1 :64$ ou $1 :80$, signent une MNI à EBV. A l'inverse les Ac de Forssman sont absorbés par les extraits de cobaye et pas par ceux de bœuf.

Malgré sa simplicité, la réaction de PBD utilise un certain nombre de tubes (ou puits) et reste donc laborieuse. Pour cette raison, de nombreux tests d'agglutination sur lames à lecture rapide ont vu le jour. Tout en conservant globalement le principe du PBD, ces tests sur lames qualitatifs ("MNI test") et utilisables en diluant le sérum combinent souvent absorption sur extrait de rein de cobaye et sur stroma de globules rouges de bœuf, et agglutination de globules rouges de cheval. On voit des agglutinats d'hématies à l'œil nu au bout de quelques minutes. D'autres tests rapides plus récents utilisent des particules de latex recouvertes d'antigènes érythrocytaires de bœuf purifiés. Enfin on trouve aussi des tests de type immunodot ou immunochromatographie ([Tableau XI](#)). Cette recherche des anticorps hétérophiles PBD fait également partie des tests unitaires sur bandelettes révélés par une anti-IgM, à côté des VCA.

Tableau XI : Tests de détection des anticorps hétérophiles associés à la MNI (liste non exhaustive).

Principes et exemples

I Agglutination de globules rouges de mouton ou de cheval, avec absorptions différentielles

- 1. réaction de Paul-Bunnell et Davidsohn**, en tubes (dilutions)
technique historique, quantitative, excellente, mais laborieuse ces tests ne semblent plus disponibles sur le marché actuellement
- 2. tests de dépistage rapide sur lames**
 - Mono-diff (Fumouze)
 - Monospot (Meridian)
 - Monoslide-test (bioMérieux)

II Agglutination de globules rouges de cheval traités et/ou modifiés

- a. spécificité augmentée, absorptions inutiles
 - MNI-test (Fumouze)
 - Cellognost-Mononucleose (Dade-Behring)
- b. avec absorptions différentielles
 - Servitex MNI color Slide II (Servibio)

III Réactions utilisant des extraits des membranes de globules rouges de bœuf (sauf *)

support sur latex

- Monolater (Biokit)
- Monospot latex (Meridian)
- IM test (Oxoid)
- IM Dryspot (Oxoid)
- Servitex MNI (Servibio)
- Spinreact (Elitech)

Immunodot ou Enzyme ImmunoAssay

- Immuno EBV Mono IgM (BMD)

Tests immunochromatographiques

- MNITOP (All Diag)
- ImmunoCard STAT Mono Test (Meridian)
- MNI SIGN (Servibio)* (cheval ?)

Remarque :

La spécificité et la sensibilité respectives de ces tests sont souvent signalées dans les notices. Bien entendu, on ne peut pas parler de "sensibilité" dans l'absolu par rapport à un diagnostic de MNI à EBV, puisque ces anticorps hétérophiles ne sont détectables en début de MNI que dans 60 à 80 % des cas.

Diagnostic moléculaire

il repose aujourd'hui avant tout sur la PCR en temps réel

La détection de l'EBV et l'estimation de sa quantité se basaient initialement sur des techniques de culture cellulaire. Plus tard, le génome EBV a été recherché par des méthodes d'hybridation moléculaire telles que le dot blot ou le Southern blot, prenant en compte la complémentarité des bases nucléotidiques des acides nucléiques. La détection de ces acides nucléiques viraux se fait grâce à une sonde nucléotidique marquée qui se fixe spécifiquement sur la partie de l'acide nucléique dont elle est complémentaire. Les acides nucléiques sont extraits de l'échantillon à analyser puis immobilisés sur une membrane de nitrocellulose. La fixation de la sonde sur le support est révélée radioactivement ou chimiquement, selon que la sonde est marquée par un isotope radioactif ou par une substance chimique. Ces techniques fastidieuses ont cédé la place à d'autres techniques comme l'hybridation *in situ* et la PCR.

La technique d'hybridation *in situ* offre l'avantage de pouvoir identifier le type et le pourcentage des cellules infectées. En effet, elle permet de détecter des acides nucléiques viraux dans des cellules reconnaissables. En matière d'EBV, ce sont essentiellement les ARNs EBER produits en très grande quantité qui sont détectés par cette technique, par ailleurs pas extrêmement sensible.

La PCR repose sur l'amplification puis la détection de séquences du génome EBV. Essentiellement qualitative avec une réponse positive ou négative, elle a été remplacée ces dernières années par des techniques de quantification moléculaire pour évaluer la charge virale dans un tissu ou dans un liquide biologique. Cette quantification est effectuée après amplification de séquences nucléotidiques conservées et si possible uniques dans le génome. Elle permet de suivre la dynamique du virus dans le sang périphérique, de détecter une éventuelle réactivation avant l'apparition de signes cliniques, et d'instaurer une thérapeutique pré-emptive.

Les premières PCR quantitatives développées étaient en réalité des méthodes semi-quantitatives, où la quantification de la cible était effectuée par comparaison avec une

gamme d'un étalon externe, sur gel d'agarose ou par southern blot (PCR en dilutions limites). Ces techniques, bien que parfois très sensibles étaient fastidieuses et pouvaient poser des problèmes de reproductibilité. Elles sont actuellement abandonnées au profit de techniques quantitatives plus fiables en termes de précision et de reproductibilité. On distingue les PCR quantitatives compétitives et les PCR en temps réel. Ces dernières possèdent généralement un plus large spectre dynamique de mesure, et l'absence de manipulations post-PCR les rend à la fois plus rapides et plus maniables (cf paragraphe suivant). Les PCR quantitatives compétitives sont basées sur la co-amplification de la cible et d'un standard interne. Le standard interne est souvent un produit ayant le même nombre de bases que la cible, avec des extrémités (zone de fixation des amorces) identiques à celles de la cible. Seule la région interne diffère entre les deux fragments, ce qui permettra, lors de la révélation, de distinguer la cible du standard interne. La quantification est mesurée par des techniques immunoenzymatiques, par densitométrie sur gel d'agarose ou par southern blot. Le risque de contamination lors de l'ouverture des tubes PCR au moment de la révélation et la longueur de la technique (6 heures) représentent les principales limites des PCR quantitatives compétitives.

1. différents principes

PCR en temps réel :

Le développement de la PCR en temps réel au cours de ces dernières années a révolutionné les applications des techniques de biologie moléculaire en matière de diagnostic virologique et de suivi thérapeutique. A l'opposé de la PCR quantitative conventionnelle où les amplicons ne sont détectés qu'à la fin du processus, la PCR en temps réel est basée sur le suivi de la fluorescence émise pendant la réaction avec un indicateur (*reporter*) de la production des amplicons durant chaque cycle. La quantification est effectuée pendant la phase exponentielle de la PCR, où la première augmentation significative de la quantité d'amplicons est en corrélation directe avec la quantité initiale de la matrice originale cible, ce qui offre ainsi une meilleure reproductibilité. Plusieurs instruments de PCR en temps réel existent actuellement sur le marché. Ces appareils utilisent généralement un système en tubes fermés, et la

quantification ne requiert aucune manipulation post-amplification, ce qui minimise ou élimine les problèmes de contamination et réduit le temps d'analyse.

Différentes technologies de détection et de quantification de fluorescence sont applicables à la PCR quantitative en temps réel. On distingue deux principes généraux :

- les molécules se liant à l'ADN double brin de manière non spécifique (sonde SYBR® Green),
- les sondes fluorescentes spécifiques à la cible amplifiée (sondes d'hydrolyse, sondes d'hybridation, balises moléculaires et amorces scorpion).

Sonde SYBR® Green :

La molécule SYBR Green est un agent intercalant qui émet de la fluorescence une fois lié à l'ADN double brin. Avant l'étape d'amplification, le SYBR Green libre en solution est très peu fluorescent. Durant l'étape d'élongation, une augmentation de la fluorescence est associée à la quantité de SYBR Green fixée à l'ADN double brin naissant. La mesure s'effectue donc à la fin de chaque étape d'élongation pour chacun des cycles PCR. Cette technologie ne nécessite aucune sonde fluorescente. Elle n'est donc pas affectée par les mutations éventuelles de l'ADN cible. Cependant, la spécificité de cette technique est faible, elle ne tient pas compte des mis-appariements de l'ADN, et il peut en résulter des faux positifs ou une surestimation de la quantité d'ADN cible. De plus, l'émission de fluorescence peut être biaisée par la masse moléculaire de l'ADN amplifié par un amplicon plus long qui fixera plus de molécules fluorescentes qu'un amplicon plus court dans la même réaction.

Sondes d'hydrolyse de type TaqMan® :

La technologie Taqman est basée sur l'activité 5'- exonucléasique de la Taq polymérase qui hydrolyse une sonde hybridée à sa séquence complémentaire sur l'ADN cible durant l'étape d'hybridation/extension de la PCR. La sonde utilisée est marquée à son extrémité 5' par un fluorophore émetteur (*reporter*) (ex. FAM : 6-carboxy-fluoresceine) ; son émission de fluorescence est inhibée par un second fluorophore suppresseur (*quencher*) présent à l'extrémité 3' (ex . TAMRA : 6-carboxy-tetramethyl, rhodamine). Quand le *reporter* est stimulé, il transfère son énergie au *quencher* par le système de FRET (Fluorescence

Resonance Energy Transfer), et celui-ci dissipe cette énergie sous forme de chaleur : il n'y a donc pas d'émission de fluorescence. Pendant l'étape d'hybridation/extension, la sonde et les amorces se fixent à leurs séquences complémentaires respectives dans un premier temps. Dans un 2ème temps, la Taq polymérase débute l'élongation du nouveau brin d'ADN à partir de l'amorce jusqu'à ce qu'elle rencontre la sonde hybridée qu'elle hydrolyse avec son activité 5'-exonucléasique. Le *reporter* est alors libéré et peut ainsi émettre de la fluorescence qui sera mesurée. Cette fluorescence augmente à chaque cycle proportionnellement au taux d'hydrolyse de la sonde et donc au nombre de copies d'ADN amplifiées au cours de la PCR.

La technologie Taqman présente une spécificité accrue grâce à l'utilisation de sonde spécifique. L'émission de fluorescence non spécifique, liée à des mauvais appariements ou à des dimères d'amorces, est donc significativement réduite. La facilité de mise au point et la possibilité d'élaborer des PCR multiplexes avec plusieurs fluorophores dans une même réaction en font une technologie de choix. Sa principale limite est liée à la Taq polymérase elle-même, car l'activité 5'-exonucléasique varie selon la marque de l'enzyme utilisée et est sensible aux inhibiteurs.

Sondes d'hybridation : Le système LightCycler® :

Cette technique utilise deux sondes linéaires différentes qui s'hybrident à une séquence interne du produit amplifié. La première sonde est marquée en 3' par un fluorophore donneur (FITC) qui émet une lumière fluorescente verte après excitation. La deuxième sonde est marquée en 5' par un fluorophore accepteur qui émet dans le rouge (Red 640 ou Red 705), et pour éviter l'extension, cette sonde est modifiée en 3' par une phosphorylation. En solution, les deux sondes sont libres et éloignées l'une de l'autre, seul un bruit de fond dû au FITC existe. Quand les deux sondes s'hybrident à l'ADN complémentaire, elles sont assez proches pour donner lieu à un transfert d'énergie (FRET) grâce à leurs fluorophores. Durant le FRET, le fluorophore donneur est excité par une source lumineuse. L'énergie émise est transférée au fluorophore accepteur, et c'est la fluorescence rouge émise par celui-ci qui est mesurée par l'appareil. Pendant l'étape de polymérisation, les deux sondes retournent en solution de façon indépendante, ce qui supprime l'émission de fluorescence rouge.

La technologie des sondes d'hybridation présente une grande spécificité. De plus, comme les sondes ne sont pas hydrolysées, elles sont réutilisées à chacun des cycles, ce qui optimise sa sensibilité.

Les balises moléculaires ou le système *Molecular Beacons* :

Ce système utilise une sonde d'hybridation en forme d'épingle à cheveux. La boucle est complémentaire de l'ADN cible et le tronc de la balise moléculaire est formé de 2 bras ayant des séquences complémentaires. Un fluorophore émetteur est fixé à l'extrémité d'un des bras (ex . FAM, TAMRA, ROX) et un suppresseur est fixé à l'extrémité de l'autre bras (ex. DABCYL). En solution, la sonde libre adopte une structure en épingle à cheveux, et le suppresseur très proche de l'émetteur permet la dissipation de la fluorescence sous forme de chaleur. Pendant l'étape d'hybridation, la sonde se linéarise et se fixe à sa séquence complémentaire. Cette conformation éloigne les deux fluorophores du tronc, et restaure ainsi la fluorescence du fluorophore émetteur. C'est cette fluorescence qui est mesurée par l'appareil, elle est proportionnelle à la quantité d'ADN amplifiée.

La particularité de cette technologie est que l'hybridation de la sonde nécessite une complémentarité parfaite de celle-ci avec l'ADN cible. Ceci est dû principalement aux propriétés thermodynamiques de la structure de la balise moléculaire qui favorisent surtout la formation de l'épingle à cheveux sauf en cas d'hybridation parfaite des séquences. Ces propriétés confèrent à la technologie de balise moléculaire une très grande spécificité qui permet de détecter les différences de séquences au nucléotide près. Mais sa limite tient à la difficulté que représente le dessin des sondes d'hybridation.

2. extraction

Cette étape préalable à la PCR est importante pour la qualité du rendu des résultats. Actuellement, il existe 2 principales méthodes d'extraction.

- La méthode basée sur le principe de purification de l'ADN par centrifugation sur des membranes de silice intégrées dans des colonnes. C'est une méthode très sensible, qui permet l'élimination d'une grande partie des inhibiteurs présents dans le prélèvement.

Cependant, les membranes de silice sont susceptibles de se colmater en présence de grandes quantités d'ADN. Cette méthode existe en format manuel (ex : Qiagen Mini kit, Roche High Pure System...), ou semi-automatique (ex : Extractor NucliSens de BioMerieux).

- La seconde méthode d'extraction est basée sur la capture de l'ADN sur des billes magnétiques recouvertes de silice. Elle présente une très bonne linéarité, en particulier pour les quantités de génomes élevées, mais le rendement d'extraction de cette méthode est moins élevé que celui de la méthode précédente, surtout pour les quantités faibles. La majorité des automates notamment les modèles réduits sont basés sur ce principe (ex : MagNAPure et MagNAPure Compact de Roche ; EZ 1 de Qiagen...).

3. trousse commercialisées

La PCR EBV a été et est encore effectuée par des techniques "maison" dans la majorité des laboratoires de Virologie nationaux et internationaux. Cependant, l'inflation des demandes et la nécessité de standardisation des résultats entre les différents laboratoires tendent vers l'utilisation progressive de kits commercialisés ([tableau XII](#)).

Tableau XII : PCR quantitative en temps réel : les kits EBV commercialisés en France

Dénomination	Fabricant	Sonde (s) de quantification	Contrôle interne	Appareils*
Affigene® EBV trender	Sangtec Molecular Diagnostics	NC	oui	Stratagene
EBV R-gene™ Quantification kit	Argene	Sonde d'hydrolyse type TaqMan®	oui	ABI, LC I et II, SmartCycler
RealArt™ EBV PCR kit	Artus	Sondes d'hybridation type LC	oui	ABI, LC, Rotorgene
ReSSQ® EBV assay spec	Light-Up	Sonde PNA light-up	oui	ABI, LC, Rotorgene
The LightCycler®-EBV quantification kit	Roche Diagnostics	Sondes d'hybridation type LC	oui	LC

NC : non communiqué ; LC : LightCycler

* : Appareils sur lesquels le kit a été validé

Le type de prélèvements :

La PCR EBV peut être effectuée sur tous les types de prélèvements, notamment le sang total, le plasma ou sérum, les cellules mononucléées sanguines, la moelle osseuse, le LCR, les biopsies tissulaires. Le traitement et la conservation de ces prélèvements sont différents (tableau XIII).

Tableau XIII : Les différents types de prélèvements pour le diagnostic d'une infection à EBV.

Examen	Prélèvement	Conditionnement	Volume	Acheminement	Conservation
Sérologie	Sang (sérum)	Tube sec	2 -5 mL	T° ambiante /+4 °C	-20 °C
PCR quantitative (ADN)	Sang total*	Tube EDTA	5 mL	T° ambiante	-80 °C
	LCR	Tube sec stérile	0,2-0,5 mL	+4 °C/ -20 °C	
	Salive		1 mL		
	Autres liquides biologiques		0,2-0,5 mL		
	Biopsie				
Hybridation <i>in situ</i> Immunohistochimie	Biopsie	Formaldéhyde	Fragment tissulaire	T° ambiante/+4° C selon les cas	-20°/-80°C

Prise minimale d'essai pour la PCR quantitative: 500 µL de sang total

* Homogénéisation préalable par retournement avant l'étape de congélation

Quantification des ARN messagers :

En plus de la quantification de l'ADN EBV, l'analyse quantitative des ARN messagers (ARNm) codant les protéines de latence ou celles du cycle lytique a été proposée comme un moyen de préciser le type du cycle de multiplication de l'EBV (lytique ou latent) dans un prélèvement donné. Nous avons mis au point des techniques de quantification par PCR en temps réel d'un ARNm de la latence (LMP1) et de 2 ARNm "tardifs" du cycle lytique (gp350 et protéase) (22). La lourdeur de la technique et la mauvaise stabilité des ARNm limitent pour l'instant cette analyse.

Culture du virus

comment un virus extrêmement banal dans la bouche se comporte en agent extrêmement transformant dans les cellules in vitro

- La mise en évidence de l'EBV en culture de cellules repose sur la propriété qu'il a d'immortaliser les lymphocytes B et de les faire proliférer à l'infini *in vitro*. Le virion infectieux est très souvent présent dans la salive. On peut donc mettre en culture cet échantillon sur des lymphocytes B humains (de cordon ombilical ou de sujet EBV-séronégatif). Au bout de 1 à 3 semaines, de petits amas de cellules infectées se forment, et une lignée lymphoblastoïde s'établit, ce qui indique la présence d'EBV dans l'inoculum. Il est rare d'avoir à mettre en évidence des virions dans d'autres prélèvements que la salive. Les conditions de transport des prélèvements sont capitales, puisque le virus, fragile, perd rapidement son infectiosité s'il n'est pas conservé à - 80° C.

- On peut mettre en culture les cellules mononucléées sanguines du patient : si certains lymphocytes B ont déjà été infectés *in vivo* par l'EBV et contiennent donc le génome viral, ils vont peu à peu réussir à proliférer *in vitro* et donner naissance en quelques semaines à une lignée lymphoblastoïde. Avant l'ère de la PCR quantitative, on employait cette méthode pour se faire une idée du nombre de cellules infectées *in vivo* par l'EBV : en effet, plus la lignée s'établissait rapidement, plus les cellules positives dans le sang étaient nombreuses...

Bien que très spécifique et sensible, cette culture de l'EBV reste une méthode lourde qui nécessite un grand savoir-faire. Elle est pratiquée aujourd'hui dans de très rares laboratoires, plutôt dans un but de recherche épidémiologique, pour démontrer la transmission d'un virus infectieux par exemple.

Remarque : la détection directe d'antigènes EBV dans l'organisme est très rarement utilisée aujourd'hui. L'Ag LMP1 est parfois mis en évidence par immunohistochimie dans des biopsies de tumeurs malignes. Avant l'apparition des méthodes d'hybridation

moléculaire et de PCR, l'Ag EBNA était mis en évidence par immunofluorescence anti-complément sur des appositions de biopsies de lymphome de Burkitt ou de carcinome du nasopharynx (figure 9).

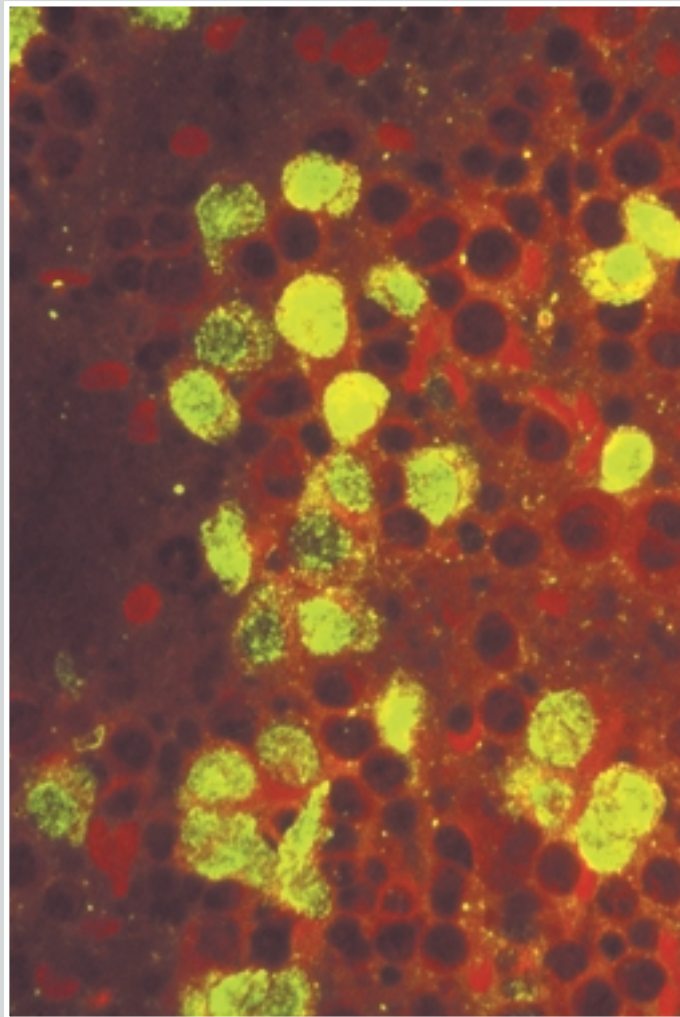


Figure 9 : Cellules EBNA-positives sur une apposition de biopsie de NPC (réaction d'immunofluorescence anti-complément)

cliché J.M. Seigneurin

Applications

des anticorps et des génomes

Diagnostic de la MNI

un diagnostic positif qui doit rassurer

La sérologie EBV est indispensable pour attribuer au virus la responsabilité d'un syndrome infectieux aigu, de type mononucléosique ou non. La possibilité de titrer, dans un même sérum, les anticorps contre plusieurs antigènes EBV conduit à établir pour chaque individu un profil sérologique. Selon la présence ou l'absence de ces différents anticorps et selon la valeur des titres en cas de positivité, l'interprétation est différente. C'est la seule sérologie virale qui, aujourd'hui, sur un seul sérum précoce, permet d'affirmer une infection actuelle ou de l'infirmer catégoriquement, de constater qu'un enfant n'a encore jamais rencontré le virus, ou au contraire qu'il est immunisé et ne fera donc pas une nouvelle primo-infection à EBV, tout cela grâce à la combinaison des résultats des différents marqueurs ([tableau XIV](#)).

Lors de la MNI aiguë, les anticorps IgM anti-VCA sont présents dès le début des signes cliniques, alors que les IgG anti-EBNA-1 ne sont en général détectables qu'à la convalescence, plusieurs semaines après. Les IgG anti-VCA ne sont retrouvés dès le début qu'avec les tests ELISA les plus sensibles. Les IgG anti-EA(D) apparaissent également dès le début de la maladie, mais de façon inconstante et ne sont donc pas un marqueur fiable de la primo-infection. IgM anti-VCA et IgG anti-EA tendent à disparaître à la guérison, au bout de 1 à 3 mois ; IgG anti-VCA et IgG anti-EBNA-1 au contraire persistent toute la vie ([figure 10](#)).

La présence d'anticorps IgM dirigés contre les antigènes viraux du cycle lytique signe en général la primo-infection à EBV. Mais comme ces IgM réapparaissent parfois lors des réactivations, il est utile de rechercher les IgG anti-EBNA-1 qui doivent être absents au cours de la primo-infection aiguë.

Par ailleurs, des positivités faibles ou même nettes en IgM anti-VCA peuvent être causées par la présence d'IgM dirigées contre d'autres virus lors d'autres primo-infections virales ([tableau XV](#)).

Tableau XIV : Exemples de profils sérologiques EBV au cours de quelques situations cliniques précises (titrages effectués par immunofluorescence)

	VCA IgG	VCA IgM	VCA IgA	EA IgG	EBNA
Sujet séronégatif (non infecté)	- (1)	-	-	-	-
MNI aiguë	- ou + (2)	+ (2)	- ou +	++ ou -	-
Sujet séropositif (= infection ancienne)	+ ou ++	-	-	-	+ ou ++ (3)
Lymphome de Burkitt associé à l'EBV	+++	-	-	+++ (R)	+ ou -
Lymphome de Burkitt non associé à l'EBV	1er cas	-	-	-	-
	2e cas	+ ou ++	-	-	+ ou ++
Carcinome indifférencié du cavum (nasopharynx)	+++	-	+++ ou ++	+++ (D)	++ ou +++

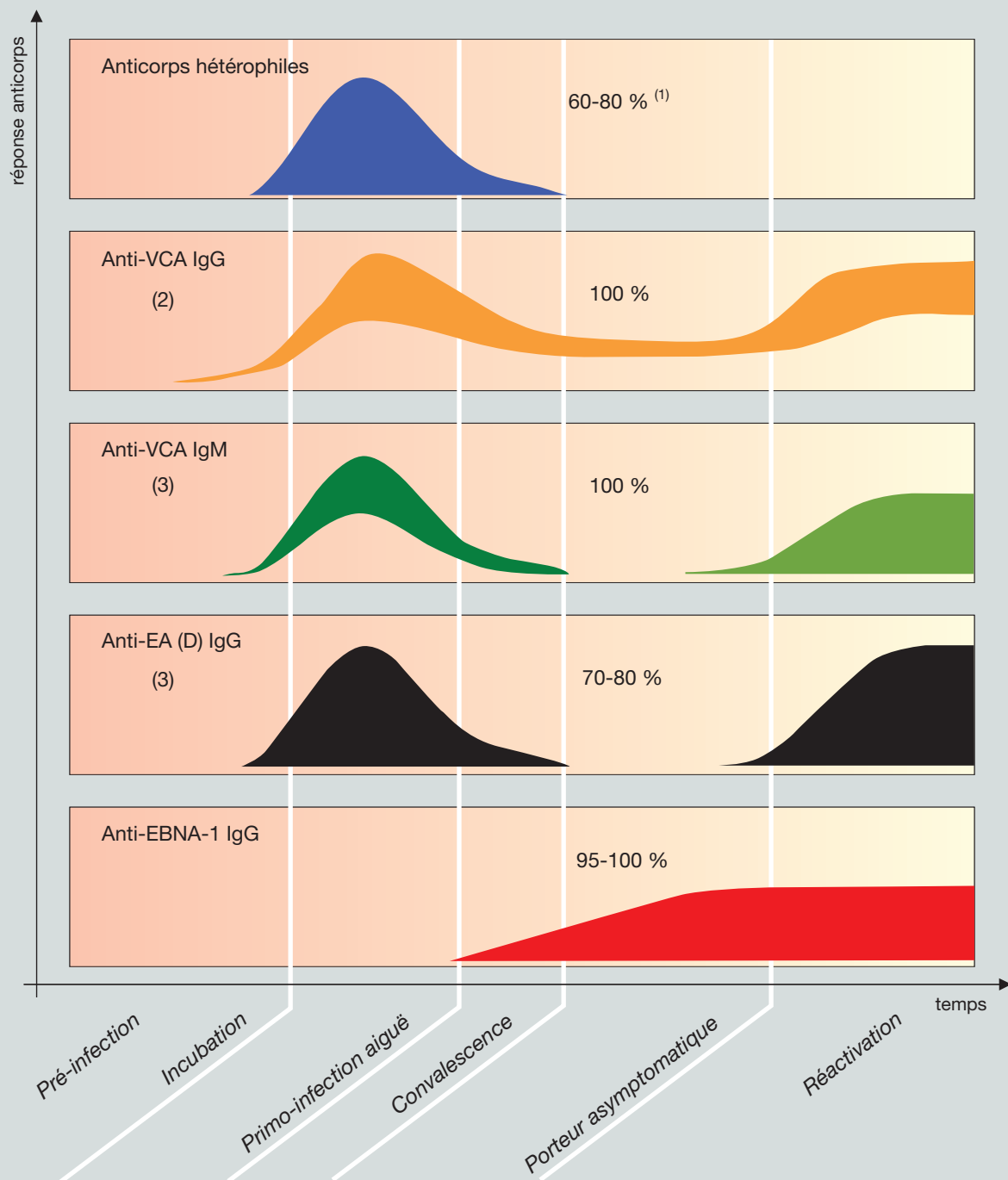
(1) - signifie absence d'anticorps (inférieur à la dilution 1:10)

(2) + à +++ signifie présence d'Ac à des titres normaux (+), élevés (++), très élevés (+++) : voir ci-dessous

(3) Dans de rares cas, on ne détecte pas d'Ac anti-EBNA chez le sujet séropositif ayant eu une infection ancienne.

	VCA IgG	VCA IgM	VCA IgA	EA IgG	EBNA
+	≥ 40	≥ 10	≥ 10	≥ 10	≥ 5
++	≥ 640		≥ 80	≥ 80	≥ 160
+++	≥ 1280		≥ 320	≥ 320	≥ 640

Figure 10 : Cinétique classique des anticorps au cours de la MNI (d'après des études faites par immunofluorescence pour les anti-VCA, EA, et EBNA)



1. Signifie pourcentage des réactions positives.

2. Les IgG anti-VCA sont détectées plus tardivement avec certaines trousse ELISA.

3. Les IgM réapparaissent parfois au cours de la réactivation, les IgG anti-EA souvent.

Tableau XV : Croisements IgM

A Anticorps IgM pouvant induire des réactions croisées avec les IgM anti-VCA, dans des tests utilisant des antigènes extraits de cellules productrices

IgM anti-CMV
 IgM anti-HAV
 IgM anti-parvovirus B 19
 beaucoup plus rarement les IgM contre d'autres virus (HSV1, VZV, HHV6, rubéole ...)

B Résultats d'une étude ponctuelle faisant apparaître des croisements IgM dans les sérologies virales (Grenoble, 2005)

Primo-infection virale (< 15 jours)	Nombre de sérums testés	Positivité de la réaction IgM VCA	
		avec test utilisant des Ag extraits purifiés	avec test utilisant des Ag recombinants
HIV	4	0	0
HAV IgM +	7	3	1
HCV	2	0	0
parvovirus B 19 IgM +	4	3	2
HSV IgM +	8	1	0
VZV IgM +	7	0	0
CMV IgM +	16	9	0
rubéole IgM +	4	0	0

Remarques :

1. les trousseaux utilisant des antigènes recombinants posent moins de problèmes en matière de croisements IgM
2. la stimulation polyclonale des lymphocytes B induite par l'EBV lui-même peut faire apparaître des IgM spécifiques d'autres virus ou agents pathogènes dans le sang en phase de MNI aiguë

Les anticorps hétérophiles, des IgM agglutinant certains globules rouges animaux, apparaissent très spécifiquement au cours de la MNI à EBV, bien qu'ils ne soient pas dirigés contre des antigènes du virus. On les détecte aujourd'hui essentiellement par des tests unitaires, simples, rapides et économiques, qu'il s'agisse de tests d'agglutination sur lame (MNI tests, Monospot tests...) ou de spots sur les bandelettes. Mais leur portée est partiellement limitée puisque 20 à 30 % des véritables MNI à EBV ne sont pas diagnostiquées par ce test, surtout en dehors de la fourchette des 15-25 ans. Il faut ajouter que le diagnostic de "syndrome mononucléosique" repose sur la présence dans le sang circulant d'un grand nombre de lymphocytes "atypiques", à l'aspect hyperbasophile.

La primo-infection à EBV, en dehors de la MNI elle-même, est prouvée par le profil sérologique EBV (IgM anti-VCA positifs + IgG anti-EBNA négatifs ± IgG anti-VCA selon la sensibilité du test ELISA utilisé) associé parfois à la détection du génome viral.

Le diagnostic d' "infection chronique active à EBV", syndrome rare qui fait suite à une MNI parfois sévère, repose sur la grande quantité de génome viral dans les cellules mononucléées sanguines ou dans le sang total, mais aussi sur la présence de titres élevés d'IgG anti-EA et souvent d'anti-Zebra.

Marqueurs viraux et cancers associés à l'EBV

anticorps, génome, charge virale : en association ou non

Le lymphome de Burkitt endémique chez l'enfant africain est très souvent associé à l'EBV. Le profil sérologique caractéristique montre des titres d'IgG anti-VCA et anti-EA(R) très élevés ([tableau XIV](#)).

Mais la preuve définitive de l'association à l'EBV est apportée par la détection de marqueurs viraux dans les lymphocytes B malins. On a longtemps recherché l'antigène EBNA-1 par immunofluorescence anti-complément sur des appositions effectuées à partir de biopsies. Cette analyse était fiable, mais peu sensible et laborieuse. Il est plus courant aujourd'hui de détecter les ARN EBERs par hybridation *in situ* ou bien le génome viral par PCR dans des extraits de tissu cancéreux. Le sang circulant peut contenir de très grandes quantités de copies de génome.

Rappelons que, dans les pays occidentaux, la plupart des cas de lymphome de Burkitt chez les enfants ne sont pas associés à l'EBV et que les cellules malignes ne contiennent donc aucun marqueur viral. La sérologie dans ce cas est celle du sujet sain, séropositif si l'enfant a déjà été infecté auparavant par l'EBV, ou séronégatif.

Dans le carcinome du nasopharynx (cavum) indifférencié, on retrouve les mêmes preuves de l'association à l'EBV, en particulier la présence du génome viral dans les cellules épithéliales malignes. En revanche, le profil sérologique se distingue de celui du lymphome de Burkitt par l'existence de titres élevés d'anticorps IgA anti-VCA et -EA. On détecte souvent des IgG anti-Zebra, et dans plus de 70 % des cas des IgG anti-LMP-1 dont le titre corrèlerait avec l'évolution de la tumeur, en plus d'IgA anti-LMP-1 qui n'existent que dans ces cancers. Tous les titres d'anticorps sont globalement plus élevés qu'au cours du lymphome de Burkitt ([tableau XIV](#)) (IgG anti-VCA, IgG anti EA (D), et même IgG anti-EBNA).

Pour les syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation, la mesure de la charge virale dans le sang représente le marqueur essentiel, tant pour le diagnostic de lymphome associé à l'EBV et pour le suivi de l'efficacité thérapeutique, que pour la mise en évidence d'un facteur de risque avant l'apparition du lymphome.

Récapitulatif

ou dans la pratique quotidienne

La sérologie EBV demeure l'analyse de première intention dans de nombreux cas, notamment pour les primo-infections et la mononucléose infectieuse d'une part (IgG anti-VCA et IgM anti-VCA et/ou anti-EA, IgG anti-EBNA), pour le lymphome de Burkitt et le carcinome du nasopharynx d'autre part (IgG et IgA anti-VCA et -EA) (Tableau XVI). La quantification du génome viral dans le sang est indispensable dans le cas des lymphomes du transplanté pour suivre leur apparition, leur développement et leur régression sous thérapeutique.

Tableau XVI : Les différents types d'examens virologiques en fonction du contexte clinique

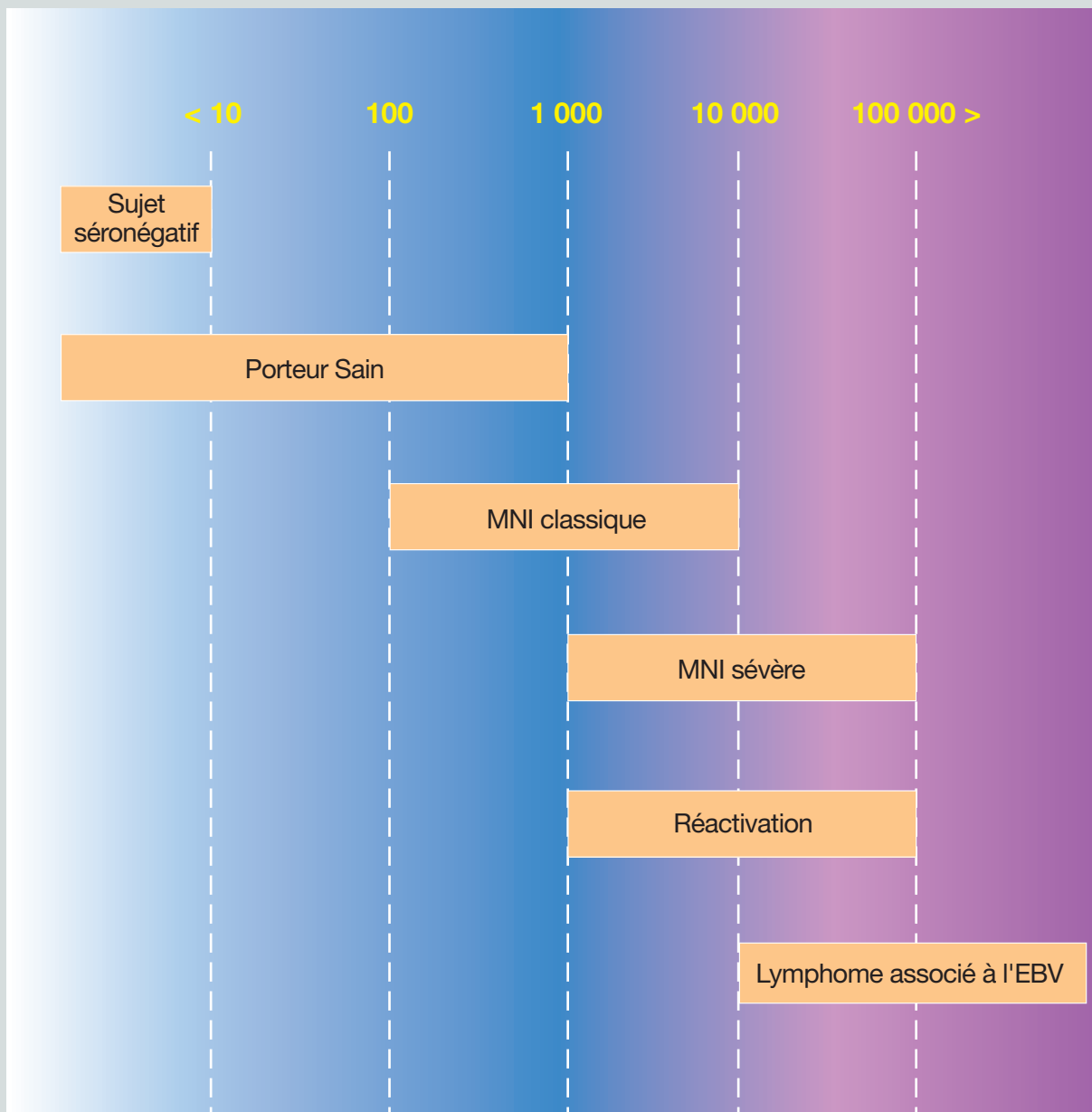
Contexte clinique	Examens de 1ère intention	Examens de 2ème intention (si problème diagnostique et après discussion)
MNI	<ul style="list-style-type: none"> → Ac hétérophiles → Sérologie EBV* 	Charge virale (salive ou sang)
Primo-infection chez l'ID	<ul style="list-style-type: none"> → Charge virale/ sang → Sérologie EBV* 	/
Atteintes neurologiques	<ul style="list-style-type: none"> → Sérologie EBV → Charge virale/ LCR, sang 	/
SLPT	<ul style="list-style-type: none"> → Charge virale/ sang → Si biopsie : charge virale (plus quantifiable que EBER ou LMP) 	Mise en évidence des protéines de latence, ou du cycle lytique dans les tissus atteints
NPC	<ul style="list-style-type: none"> → Sérologie classique + IgA VCA + IgG et IgA EA 	Charge virale (sérum ou plasma)

MNI : mononucléose infectieuse ; ID : immunodéprimé ; SLPT : syndrome lymphoprolifératif post-transplantation ; NPC : carcinome du rhinopharynx

* 2ème prélèvement éventuellement nécessaire

Nous proposons pour conclure une interprétation de la charge virale EBV dans le sang (tableau XVII).

Tableau XVII : Interprétation de la charge virale EBV dans le sang total (en copies/mL)



Cas biocliniques

c'est difficile !

1. cas sérologiques QCM

CS QCM 1

Quelle(s) conclusion(s) donnez-vous dans le cas sérologique suivant :

VCA IgM +, VCA IgG -, EBNA IgG -

- a) présence d'IgM, début de primo-infection
- b) réaction non spécifique des IgM
- c) trousse VCA IgG peu sensible pour détecter les VCA IgG dès le début de la primo-infection aiguë

CS QCM 2

En dehors de tout contexte clinique, quelle(s) conclusion(s) pourriez-vous donner dans le cas sérologique suivant :

VCA IgM -, VCA IgG -, EBNA IgG +

- a) infection ancienne
- b) faux positif de la trousse EBNA IgG
- c) trousse VCA IgG manquant de sensibilité

CS **QCM 3**

Quelles propositions faites-vous ou quelles conclusions donnez-vous dans le cas suivant :
la détection d'anticorps hétérophiles ("MNI test" prescrit uniquement) est négative chez un enfant de 5 ans qui présente plusieurs signes cliniques de MNI.

- a** refaire la recherche des anticorps hétérophiles par un autre test
- b** conseiller de prescrire une sérologie EBV
- c** ce n'est pas une MNI à EBV

CS **QCM 4**

Un jeune adolescent, sans signe clinique particulier pouvant faire penser à une MNI, présente le profil sérologique EBV suivant :

VCA IgM -, VCA IgG +, EBNA IgG -

Quelles sont vos propositions ou vos conclusions ?

- a** c'est un profil "déséquilibré"
- b** la primo-infection date de plusieurs semaines ou de quelques mois
- c** il faut tout de suite rechercher les anticorps EA IgG

CS **QCM 5**

Dans le cadre du bilan sérologique annuel effectué chez un greffé de rein, on trouve le profil sérologique EBV suivant :

VCA IgM -, VCA IgG élevées, EBNA IgG +

Quelles propositions faites-vous ou quelles conclusions donnez-vous ?

- a** titrer les EA IgG
- b** il s'agit d'une réactivation EBV avec risque de lymphoprolifération
- c** demander une charge virale EBV dans le sang

Un enfant de 2 ans est hospitalisé dans un tableau d'encéphalite infectieuse. Les principales étiologies virales sont écartées ; seul l'EBV pose problème. La sérologie EBV dans le sang est la suivante :

VCA IgM + faible, VCA IgG -, EBNA IgG -

Quelles propositions faites-vous ou quelles conclusions donnez-vous ?

- a** faire un nouveau prélèvement sanguin 15 jours plus tard et refaire la sérologie EBV
- b** vérifier la spécificité des VCA IgM détectés et donc leur présence à l'aide de tous les autres tests VCA IgM disponibles au laboratoire
- c** demander la prescription d'une charge virale EBV dans le sérum sanguin déjà disponible au laboratoire
- d** demander la prescription d'une charge virale EBV dans un échantillon de salive à prélever dès que possible

2. cas clinicovirologiques

CCV 1

Une étudiante donne son sang le 15 octobre. Elle n'a aucun antécédent particulier, et aucun signe clinique actuel. Les sérologies hépatite B et hépatite C sont négatives. On lui trouve des transaminases moyennement élevées (3N). Le 5 novembre, elle fait contrôler ses transaminases dans un laboratoire d'analyses médicales : elles ont diminué (1,5N). La sérologie EBV montre le profil suivant en ELISA : VCA IgG +, VCA IgM +, EBNA IgG +. La sérologie CMV (ELISA) est positive en IgG et en IgM ; l'avidité IgG CMV est faible (<20 %).

Quelle interprétation donnez-vous ?

CCV 2

En septembre 2003, un adulte jeune présente les signes cliniques d'une MNI typique. Le laboratoire d'analyses reçoit aussitôt un sérum pour confirmer le diagnostic. La détection des anticorps hétérophiles par un test rapide sur lame donne les résultats suivants :

- agglutination franche des globules rouges (cheval)
- agglutination franche après absorption sur extraits de rein de cobaye et sur globules rouges de bœuf

Quelle est votre interprétation ? que proposez-vous ?

CCV 3

Un petit garçon de 20 mois est hospitalisé le 7 janvier 2003 car il a développé depuis 3 semaines le tableau clinique suivant : forte fièvre, angine, adénopathies axillaires et inguinales, hépatosplénomégalie, épanchement pleural et péricardique, et asthénie. La formule sanguine montrait une lymphocytose importante (76 %). Pas d'amélioration par les antibiotiques. Une sérologie EBV avait été trouvée négative en septembre 2002.

- 1** Quelle est la conduite sérologique à tenir, dès son hospitalisation, afin d'écartier l'hypothèse d'une maladie hématologique maligne ?
- 2** Il ne s'agit pas d'une leucémie aiguë : quels sont les résultats attendus des examens précédemment demandés ?
- 3** Devant la gravité du tableau clinique (il existe aussi des signes d'activation macrophagique), un traitement corticoïde est instauré, et des analyses de charge virale EBV sont demandées le jour de son arrivée à l'hôpital :

Résultats sur les prélèvements du 7 janvier :

- cellules mononucléées sanguines (PBMC) :	400 copies/ μ g ADN
- plasma sanguin :	325 copies/mL
- liquide pleural :	55 000 copies/mL
- biopsie ganglionnaire :	6 500 copies/ μ g ADN

Ces résultats peuvent-ils être en faveur d'une MNI ?

- 4** Dix jours plus tard, la charge virale plasmatique s'est négativée, la charge virale dans les PBMC est revenue à des valeurs normales, et les signes cliniques se sont améliorés.

Un an après, l'enfant est considéré comme guéri, malgré un léger retard de croissance. La charge virale dans le sang total est de 11 000 copies/mL. Que peut-on proposer comme conduite à tenir ?

CCV 4

Mme B. 66 ans, est hospitalisée le 24 juin 2005 dans le service d'hépatologie pour une hyperthermie évoluant depuis 15 jours, associée à une asthénie croissante, un ictère, et un syndrome cérébelleux. Le bilan biologique montre une hyperbilirubinémie et une cholestase avec des phosphatases alcalines à 8N. L'échographie abdominale et l'IRM cérébrale sont normales. Le diagnostic envisagé est une hépatite choléstatique d'origine infectieuse.

Q1 Quelles sont les principales analyses virologiques à demander ?

Q2 Parmi ces analyses qui sont négatives ou témoignent d'une infection ancienne, la sérologie EBV ELISA donne les résultats suivants :

IgG anti-VCA : 920 UA/mL (positif fort)

IgM anti-VCA : 0,222 (positif)

IgG anti-EBNA : 2,3 (positif)

Quelle est votre interprétation ?

Q3 Quels examens virologiques supplémentaires pourraient être nécessaires pour caractériser cette infection à EBV ?

3. réponses

Réponses **CS** **QCM**

QCM 1 Réponses justes : **a b c**

- a** oui, car certaines trousse EBV détectent les VCA IgM avant les VCA IgG en début de primo-infection
- b** oui, car on peut trouver chez un EBV-séronégatif un test VCA IgM faussement positif (réaction non spécifique)
- c** oui, même raison que **a**

QCM 2 Réponses justes : **a b c**

- a** oui, car certains tests VCA IgG manquent de sensibilité
- b** oui, certains tests EBNA IgG n'ont pas une spécificité à 100 %, bien que ce soit peu probable
- c** oui, voir réponse **a**

QCM 3 Réponse juste : **b**

- a** non, un autre test sera probablement aussi négatif
- b** oui, la sérologie EBV est absolument indispensable chez un petit enfant qui peut présenter une MNI typique sans apparition d'anticorps hétérophiles
- c** non, voir réponse **b**

QCM 4Réponses justes : **a** **b**

- a** oui, un petit pourcentage de personnes en bonne santé, immunocompétentes, n'élaborent pas d'anticorps EBNA IgG et gardent donc toute leur vie un profil "déséquilibré", c'est-à-dire VCA + EBNA-
- b** oui, il est possible que l'on se trouve juste au moment où les VCA IgM ont disparu et où les EBNA IgG ne sont pas encore détectables (entre 1 et 5 mois après le début des signes cliniques)
- c** non, les EA IgG seront au mieux faiblement positifs et n'apporteront aucun élément supplémentaire pour une interprétation

QCM 5Réponse juste : **c**

- a** non, la présence d'EA IgG (ou même un titre élevé) confirmerait au maximum une réponse anticorps élevée contre les antigènes du cycle lytique
- b** non, un titre élevé de VCA IgG ne suffit pas à affirmer qu'on est en présence d'une réactivation ; avant tout, il faut vérifier le profil sérologique et le titre des anticorps sur un sérum antérieur : ils peuvent être stables depuis longtemps
- c** oui, une charge virale élevée dans le sang peut être un facteur de risque pour le développement d'une lymphoprolifération B chez un immunodéprimé

QCM 6Réponses justes : **c** **d**

- a** non, car 1) l'étiologie d'une encéphalite aiguë ne peut attendre 15 jours !
2) on hésite à faire une nouvelle prise de sang chez un tout petit enfant si elle ne présente pas un intérêt capital
en revanche, 15 jours plus tard, la sérologie serait plus facile à interpréter (VCA IgM + net, VCA IgG +, EBNA IgG -)
- b** non, le laboratoire d'analyses ne dispose pas nécessairement d'autres tests VCA IgM, et selon les tests, ils ne seraient pas forcément plus sensibles que celui utilisé
- c** oui, le sérum étant déjà disponible, on peut l'envoyer pour demander une charge virale EBV : s'il s'agit d'une primo-infection symptomatique à EBV, on détectera du génome viral dès le début de l'infection
- d** oui, un échantillon de salive est très facile à prélever et en cas de primo-infection symptomatique à EBV, il contiendra de grandes quantités de génome EBV

Réponses **CCV**

CCV 1

C'est une primo-infection à CMV. En effet, la sérologie CMV est en faveur d'une infection récente (IgM +, avidité des IgG faible). Le profil sérologique EBV correspond à une infection ancienne (VCA IgG + et EBNA IgG +) ; la positivité des VCA IgM est probablement due à un croisement avec les CMV IgM. Il s'agit d'une primo-infection à CMV asymptomatique avec signes biologiques d'atteinte hépatique transitoire. A noter qu'une hépatite A aiguë peut faire apparaître des réactions IgM (EBV, CMV...) faussement positives. Mais dans ce cas précis, les transaminases moyennement élevées ne sont pas en faveur d'une hépatite A.

CCV 2

Interprétation : présence d'agglutinines à la fois dans la réaction "spécifique", et dans le contrôle (après absorption)

A ce stade, on ne peut ni affirmer ni infirmer la MNI à EBV

Propositions :

- effectuer des dilutions successives du sérum et retester les agglutinines (le sérum devrait être encore positif à une dilution donnée pour les agglutinines hétérophiles de la MNI, alors que le contrôle sera devenu négatif à cette même dilution)
- et surtout demander une sérologie EBV qui confirmera le diagnostic de MNI à EBV

CCV 3

1 Sérologie EBV (en particulier VCA IgM, VCA IgG, EBNA IgG)

2 VCA IgM +, VCA IgG + ou – selon les troupes, EBNA IgG –

C'est un profil de MNI

Rq : il est inutile de rechercher les Ac hétérophiles qui seront probablement absents à cet âge

3 Dans chacun de ces compartiments biologiques, la charge virale est élevée ou même très élevée (liquide pleural)

C'est une forme sévère de MNI

4 En l'absence d'autres renseignements, il faut suivre la sérologie (en particulier pour vérifier que les EBNA IgG apparaissent) et la charge virale dans le sang qui reste un peu élevée. Chez l'enfant ou l'adulte normal ayant eu une infection passée à EBV, la charge virale dans le sang total est souvent comprise entre 0 et 1 000 copies/mL .

CCV 4

R1 Toutes les sérologies correspondant aux virus pouvant provoquer une hépatite : HAV, HBV, HCV, HIV, CMV, HSV, EBV, VZV, en première intention

R2 La présence d'IgM associée à un taux fort d'IgG anti-VCA en présence d'IgG anti-EBNA fait suspecter une réactivation EBV

R3 Mesurer la charge virale EBV dans les liquides biologiques ou tissus atteints : sang, salive, foie, LCR

Les résultats de ces charges virales dans les jours qui suivent l'hospitalisation sont les suivants :

dans la salive : 10 000 000 copies/mL

dans le sang total : 8 000 copies/mL

dans le tissu hépatique (biopsie) : 944 copies/ μ g ADN

dans le LCR : 275 copies/mL (à noter que les PCR HSV, VZV, CMV et entérovirus sont négatives)

Conclusion :

La PCR EBV et la sérologie sont donc en faveur d'une réactivation EBV avec signes cliniques, d'autant plus que, le 12 juillet, l'évolution clinique était favorable avec toutefois persistance de l'asthénie. Une réactivation à EBV a été retenue comme étiologie de l'hépatite et de la cérébellite.

C'est un cas rare, car en général les réactivations à EBV ne sont pas symptomatiques chez l'immunocompétent.

4. une MNI fatale (sans questions)

Il s'agit d'un adolescent de 17 ans hospitalisé (J1) avec un tableau clinique de mononucléose infectieuse (MNI) (fièvre, angine, polyadénopathies, asthénie) associé à un test d'agglutination sur lame et une sérologie EBV confirmant la primo-infection à EBV. Les hémocultures et le prélèvement bactériologique de gorge sont négatifs. La numération formule sanguine (NFS) montre une hyperleucocytose avec hyperlymphocytose et présence de lymphocytes activés sans autre anomalie. Le diagnostic de MNI non compliquée posé, le patient quitte l'hôpital à J3 avec des conseils de repos, un hémogramme de contrôle à J5 et une prescription de paracétamol. A J11, le patient est ré-hospitalisé en urgence dans un tableau de choc septique. La NFS montre une agranulocytose majeure (tableau) et les hémocultures sont toutes positives à *Staphylococcus aureus*. Malgré une prise en charge rapide en réanimation, le patient meurt 12 heures après son admission. Les biopsies post-mortem de foie et de moelle osseuse ne révèlent aucun signe en faveur d'une hémopathie maligne ou d'un syndrome d'activation macrophagique mais une complète absence de la lignée granuleuse. La PCR quantitative EBV effectuée a posteriori montrera une charge virale très élevée dans le sérum sanguin dès les premiers jours de l'hospitalisation et une charge élevée dans la biopsie hépatique le jour du décès.

Tableau : évolution des marqueurs hématologiques et virologiques

	J1	J5	J11
Hémogramme			
Leucocytes x 10 ⁹ /L	29	12,4	3,2
Neutrophiles x 10 ⁹ /L	7,3	1,2	0
Anticorps hétérophiles (MNI-Test)	pos		pos
Sérologie EBV			
IgM VCA	pos	pos	pos
IgG VCA	pos		pos
IgG EBNA	neg		neg
PCR EBV quantitative			
Sérum (copies/mL)	13 300		
biopsie hépatique (copies/μg ADN)			14 200

La grande majorité des MNI à EBV guérissent spontanément sans complication ni séquelle chez les patients immunocompétents. En effet, même si la littérature médicale rapporte un large éventail de complications possibles, celles-ci restent rares chez l'immunocompétent et les décès sont donc heureusement exceptionnels ([Tableau](#)). Les cas mortels rapportés sont le plus souvent dus à des syndromes d'activation macrophagique, des complications neurologiques, des ruptures spléniques ou des insuffisances respiratoires aiguës par obstruction pharyngée.

Cette observation, bien qu'exceptionnelle, est informative à plusieurs titres.

Elle rappelle que l'agranulocytose isolée, sans autre complication hématologique, est un symptôme "dangereux", car imprévisible, de la MNI. Les neutropénies modérées (1000-1800 neutrophiles/mm³) sont présentes dans 50 à 80 % des cas de MNI mais les neutropénies sévères (< 1000 neutrophiles/mm³) sont beaucoup plus rares (0,7 à 3 % des cas de MNI) et moins de 100 cas d'agranulocytose < 200/mm³ ont été rapportés dans la littérature. L'agranulocytose survient en général après la deuxième semaine de la MNI. Le plus souvent elle semble progressive, compliquant une neutropénie modérée, mais transitoire. Dans cette observation, la numération des neutrophiles est normale à J1 et montre une neutropénie modérée à J5. Les biopsies médullaires, en général normales dans les neutropénies modérées, montrent uniquement un blocage de la maturation des granuleux au stade promyélocytes ou myélocytes. Le mécanisme de ce blocage est inconnu. La mortalité, liée le plus souvent aux complications bactériennes, concernerait environ 50 % de ces agranulocytoses. Aucun traitement, autre que celui de la prise en charge rapide et spécifique de l'agranulocytose fébrile, n'est rapporté dans la littérature. Le rôle bénéfique éventuel des antiviraux et des corticoïdes n'a pas été évalué.

Dans cette observation, le rôle de la PCR peut également être discuté. Elle n'a pas sa place en général dans le diagnostic de la MNI, qui doit rester sérologique. Néanmoins nous avons montré au laboratoire que toutes les MNI au début sont positives en PCR dans le sérum et nous avons quelques observations préliminaires de MNI sévères où la charge virale sérique (ou dans les cellules mononucléées sanguines ou le sang total) était plus élevée que dans des MNI "bénignes". Le sérum étant en général prélevé et

conservé en cas de suspicion de MNI (contrairement au sang total ou aux cellules mononucléées), la PCR sérique pourrait être utile dans des cas de MNI hospitalisées, non pas en se substituant à la sérologie, mais en distinguant rapidement les MNI les plus sévères méritant une surveillance plus grande, voire une intervention thérapeutique (qui reste à définir). Cela demanderait à être validé par un suivi prospectif des MNI, en étudiant les critères virologiques, immunologiques et génétiques différenciant éventuellement les MNI sévères des MNI bénignes.

Références

Jenson HB. Acute complications of Epstein-Barr virus infectious mononucleosis. *Curr Opin Pediatr.* 2000 ; 12 : 263-8

Penman HG. Fatal infectious mononucleosis : a critical review. *J Clin Pathol.* 1970 ; 23 : 765.



Références bibliographiques

1. **Abu-Elmagd, K., J. Reyes, S. Todo, A. Rao, R. Lee, W. Irish, H. Furukawa, J. Bueno, J. McMichael, A. T. Fawzy, N. Murase, J. Demetris, J. Rakela, J. J. Fung, and T. E. Starzl.** 1998. Clinical intestinal transplantation: new perspectives and immunologic considerations. *J Am Coll Surg.* 186:512-25.
2. **Amyes, E., C. Hatton, D. Montamat-Sicotte, N. Gudgeon, A. B. Rickinson, A. J. McMichael, and M. F. Callan.** 2003. Characterization of the CD4+ T cell response to Epstein-Barr virus during primary and persistent infection. *J Exp Med.* 198:903-11.
3. **Andersson, J.** 2000. An Overview of Epstein-Barr Virus: from Discovery to Future Directions for Treatment and Prevention. *Herpes.* 7:76-82.
4. **Andersson, J., S. Britton, I. Ernberg, U. Andersson, W. Henle, B. Skoldenberg, and A. Tisell.** 1986. Effect of acyclovir on infectious mononucleosis: a double-blind, placebo-controlled study. *J Infect Dis.* 153:283-90.
5. **Armitage, J. M., R. L. Kormos, R. S. Stuart, F. J. Fricker, B. P. Griffith, M. Nalesnik, R. L. Hardesty, and J. S. Dummer.** 1991. Posttransplant lymphoproliferative disease in thoracic organ transplant patients: ten years of cyclosporine-based immunosuppression. *J Heart Lung Transplant.* 10:877-86.
6. **Axelrod, D. A., R. Holmes, S. E. Thomas, and J. C. Magee.** 2003. Limitations of EBV-PCR monitoring to detect EBV associated post-transplant lymphoproliferative disorder. *Pediatr Transplant.* 7:223-7.
7. **Baudouin, V., A. Dehee, B. Pedron-Grossetete, H. Ansart-Pirenne, E. Haddad, A. Maisin, C. Loirat, and G. Sterkers.** 2004. Relationship between CD8+ T-cell phenotype and function, Epstein-Barr virus load, and clinical outcome in pediatric renal transplant recipients: a prospective study. *Transplantation.* 77:1706-13.
8. **Bender, C. E.** 1967. The value of corticosteroids in the treatment of infectious mononucleosis. *JAMA.* 199:529-31.
9. **Borer, A., J. Gilad, H. Haikin, K. Riesenber, A. Porath, and F. Schlaeffer.** 1999. Clinical features and costs of care for hospitalized adults with primary Epstein-Barr virus infection. *Am J Med.* 107:144-8.

10. **Borza, C. M., and L. M. Hutt-Fletcher.** 2002. Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nat Med.* 8:594-9.
11. **Chang, R. S., and H. D. Golden.** 1971. Transformation of human leucocytes by throat washing from infectious mononucleosis patients. *Nature.* 234:359-60.
12. **Clave, E., F. Agbalika, V. Bajzik, R. P. de Latour, M. Trillard, C. Rabian, C. Scieux, A. Devergie, G. Socie, P. Ribaud, L. Ades, C. Ferry, E. Gluckman, D. Charron, H. Esperou, A. Toubert, and H. Moins-Teisserenc.** 2004. Epstein-Barr virus (EBV) reactivation in allogeneic stem-cell transplantation: relationship between viral load, EBV-specific T-cell reconstitution and rituximab therapy. *Transplantation.* 77:76-84.
13. **Collins, M., G. Fleisher, J. Kreisberg, and S. Fager.** 1984. Role of steroids in the treatment of infectious mononucleosis in the ambulatory college student. *J Am Coll Health.* 33:101-5.
14. **Curtis, R. E., L. B. Travis, P. A. Rowlings, G. Socie, D. W. Kingma, P. M. Banks, E. S. Jaffe, G. E. Sale, M. M. Horowitz, R. P. Witherspoon, D. A. Shriner, D. J. Weisdorf, H. J. Kolb, K. M. Sullivan, K. A. Sobocinski, R. P. Gale, R. N. Hoover, J. F. Fraumeni, Jr., and H. J. Deeg.** 1999. Risk of lymphoproliferative disorders after bone marrow transplantation: a multi-institutional study. *Blood.* 94:2208-16.
15. **Dalpke, A. H., R. Thomssen, and K. Ritter.** 2003. Oxidative injury to endothelial cells due to Epstein-Barr virus-induced. *J Med Virol.* 71:408-16.
16. **Downey, A.-M., C.A.** 1923. Acute lymphadenosis compared with acute lymphatic leukemia. *Arch Intern Med.* 32:82-112.
17. **Epstein, M. A., B. G. Achong, and Y. M. Barr.** 1964. Virus Particles in Cultured Lymphoblasts From Burkitt'S Lymphoma. *Lancet.* 15:702-3.
18. **Fafi-Kremer, S., K. Brengel-Pesce, G. Barges, M. J. Bourgeat, O. Genoulaz, J. M. Seigneurin, and P. Morand.** 2004. Assessment of automated DNA extraction coupled with real-time PCR for measuring Epstein-Barr virus load in whole blood, peripheral mononuclear cells and plasma. *J Clin Virol.* 30:157-64.

- 19. Fafi-Kremer, S., P. Morand, J. P. Brion, P. Pavese, M. Baccard, R. Germi, O. Genoulaz, S. Nicod, M. Jolivet, R. W. Ruigrok, J. P. Stahl, and J. M. Seigneurin.** 2005. Long-term shedding of infectious epstein-barr virus after infectious mononucleosis. *J Infect Dis.* 191:985-9.
- 20. Faulkner, G. C., A. S. Krajewski, and D. H. Crawford.** 2000. The ins and outs of EBV infection. *Trends Microbiol.* 8:185-9.
- 21. Gartner, B. C., H. Schafer, K. Marggraff, G. Eisele, M. Schafer, D. Dilloo, K. Roemer, H. J. Laws, M. Sester, U. Sester, H. Einsele, and N. Mueller-Lantzsch.** 2002. Evaluation of use of Epstein-Barr viral load in patients after allogeneic stem cell transplantation to diagnose and monitor posttransplant lymphoproliferative disease. *J Clin Microbiol.* 40:351-8.
- 22. Germi, R., P. Morand, K. Brengel-Pesce, S. Fafi-Kremer, O. Genoulaz, C. Ginevra, M. Ballout, G. Bargues, and J. M. Seigneurin.** 2004. Quantification of gp350/220 Epstein-Barr virus (EBV) mRNA by real-time reverse transcription-PCR in EBV-associated diseases. *Clin Chem.* 50:1814-7.
- 23. Gottschalk, S., C. M. Rooney, and H. E. Heslop.** 2005. Post-transplant lymphoproliferative disorders. *Annu Rev Med.* 56:29-44.
- 24. Grant, D.** 1999. Intestinal transplantation: 1997 report of the international registry. *Intestinal Transplant Registry. Transplantation.* 67:1061-4.
- 25. Haan, K. M., W. W. Kwok, R. Longnecker, and P. Speck.** 2000. Epstein-Barr virus entry utilizing HLA-DP or HLA-DQ as a coreceptor. *J Virol.* 74:2451-4.
- 26. Hallee, T. J., A. S. Evans, J. C. Niederman, C. M. Brooks, and H. Voegtly.** 1974. Infectious mononucleosis at the United States Military Academy. A prospective study of a single class over four years. *Yale J Biol Med.* 47:182-95.
- 27. Henle, G., and W. Henle.** 1970. Observations on childhood infections with the Epstein-Barr virus. *J Infect Dis.* 121:303-10.
- 28. Henle, W., and G. Henle.** 1985. Epstein-Barr virus and blood transfusions. *Prog Clin Biol Res.* 182:201-9.

29. Hjalgrim, H., J. Askling, K. Rostgaard, S. Hamilton-Dutoit, M. Frisch, J. S. Zhang, M. Madsen, N. Rosdahl, H. B. Konradsen, H. H. Storm, and M. Melbye. 2003. Characteristics of Hodgkin's lymphoma after infectious mononucleosis. *N Engl J Med.* 349:1324-32.
30. Hoagland, R. J. 1955. The transmission of infectious mononucleosis. *Am J Med Sci.* 229:262-72.
31. Hochberg, D., T. Souza, M. Catalina, J. L. Sullivan, K. Luzuriaga, and D. A. Thorley-Lawson. 2004. Acute infection with Epstein-Barr virus targets and overwhelms the peripheral memory B-cell compartment with resting, latently infected cells. *J Virol.* 78:5194-204.
32. Hoshino, Y., H. Kimura, K. Kuzushima, T. Tsurumi, K. Nemoto, A. Kikuta, Y. Nishiyama, S. Kojima, T. Matsuyama, and T. Morishima. 2000. Early intervention in post-transplant lymphoproliferative disorders based on Epstein-Barr viral load. *Bone Marrow Transplant.* 26:199-201.
33. Kimura, H., Y. Hoshino, H. Kanegane, I. Tsuge, T. Okamura, K. Kawa, and T. Morishima. 2001. Clinical and virologic characteristics of chronic active Epstein-Barr virus infection. *Blood.* 98:280-6.
34. Levine, S. M., L. Angel, A. Anzueto, I. Susanto, J. I. Peters, E. Y. Sako, and C. L. Bryan. 1999. A low incidence of posttransplant lymphoproliferative disorder in 109 lung transplant recipients. *Chest.* 116:1273-7.
35. Lucas, K. G., R. L. Burton, S. E. Zimmerman, J. Wang, K. G. Cornetta, K. A. Robertson, C. H. Lee, and D. J. Emanuel. 1998. Semiquantitative Epstein-Barr virus (EBV) polymerase chain reaction for the determination of patients at risk for EBV-induced lymphoproliferative disease after stem cell transplantation. *Blood.* 91:3654-61.
36. Meij, P., J. W. van Esser, H. G. Niesters, D. van Baarle, F. Miedema, N. Blake, A. B. Rickinson, I. Leiner, E. Pamer, B. Lowenberg, J. J. Cornelissen, and J. W. Gratama. 2003. Impaired recovery of Epstein-Barr virus (EBV)--specific CD8+ T lymphocytes after partially T-depleted allogeneic stem cell transplantation may identify

patients at very high risk for progressive EBV reactivation and lymphoproliferative disease. *Blood*. 101:4290-7.

37. Mettre, M. G. G., D. Abramowitch, J. M. Mosnier, and A. Cohen. 1992. Incidence de la mononucléose infectieuse diagnostiquée en médecine générale en France. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*. 13:57-58.

38. Morris, M. C., and W. J. Edmunds. 2002. The changing epidemiology of infectious mononucleosis? *J Infect*. 45:107-9.

39. Nalesnik, M. A., R. Jaffe, T. E. Starzl, A. J. Demetris, K. Porter, J. A. Burnham, L. Makowka, M. Ho, and J. Locker. 1988. The pathology of posttransplant lymphoproliferative disorders occurring in the setting of cyclosporine A-prednisone immunosuppression. *Am J Pathol*. 133:173-92.

40. Ohga, S., E. Kubo, A. Nomura, H. Takada, N. Suga, E. Ishii, A. Suminoe, T. Inamitsu, A. Matsuzaki, N. Kasuga, and T. Hara. 2001. Quantitative monitoring of circulating Epstein-Barr virus DNA for predicting the development of posttransplantation lymphoproliferative disease. *Int J Hematol*. 73:323-6.

41. Paul, J. R.-B., W. 1932. The presence of heterophile antibodies in infectious mononucleosis. *Am J Med Sci*. 183:90.

42. Pegtel, D. M., J. Middeldorp, and D. A. Thorley-Lawson. 2004. Epstein-Barr virus infection in ex vivo tonsil epithelial cell cultures of asymptomatic carriers. *J Virol*. 78:12613-24.

43. Pereira, M. S., A. M. Field, J. M. Blake, F. G. Rodgers, L. A. Bailey, and J. R. Davies. 1972. Evidence for oral excretion of E.B. virus in infectious mononucleosis. *Lancet*. 1:710-1.

44. Preiksaitis, J. K. 2004. New developments in the diagnosis and management of posttransplantation lymphoproliferative disorders in solid organ transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 39:1016-23.

45. **Purtilo, D. T., C. K. Cassel, J. P. Yang, and R. Harper.** 1975. X-linked recessive progressive combined variable immunodeficiency (Duncan's disease). *Lancet*. 1:935-40.
46. **Randhawa, P. S., S. A. Yousem, I. L. Paradis, J. A. Dauber, B. P. Griffith, and J. Locker.** 1989. The clinical spectrum, pathology, and clonal analysis of Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders in heart-lung transplant recipients. *Am J Clin Pathol*. 92:177-85.
47. **Rea, T. D., J. E. Russo, W. Katon, R. L. Ashley, and D. S. Buchwald.** 2001. Prospective study of the natural history of infectious mononucleosis caused by Epstein-Barr virus. *J Am Board Fam Pract*. 14:234-42.
48. **Rooney, C. M., S. K. Loftin, M. S. Holladay, M. K. Brenner, R. A. Krance, and H. E. Heslop.** 1995. Early identification of Epstein-Barr virus-associated post-transplantation lymphoproliferative disease. *Br J Haematol*. 89:98-103.
49. **Sawyer, R. N., A. S. Evans, J. C. Niederman, and R. W. McCollum.** 1971. Prospective studies of a group of Yale University freshmen. I. Occurrence of infectious mononucleosis. *J Infect Dis*. 123:263-70.
50. **Sayos, J., C. Wu, M. Morra, N. Wang, X. Zhang, D. Allen, S. van Schaik, L. Notarangelo, R. Geha, M. G. Roncarolo, H. Oettgen, J. E. De Vries, G. Aversa, and C. Terhorst.** 1998. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature*. 395:462-9.
51. **Schooley, R. T.** 1988. Etiology of infectious mononucleosis, p. 1-7. In D. Schlossberg (ed.), *Infectious mononucleosis*, Second edition ed. Praeger Publishers, New York.
52. **Seigneurin, J. M., C. Desgranges, D. Seigneurin, J. Paire, J. C. Renversez, B. Jacquemont, and C. Micouin.** 1983. Herpes simplex virus glycoprotein D: human monoclonal antibody produced by bone marrow cell line. *Science*. 221:173-5.
53. **Sixbey, J. W., S. M. Lemon, and J. S. Pagano.** 1986. A second site for Epstein-Barr virus shedding: the uterine cervix. *Lancet*. 2:1122-4.

- 54. Sprunt, T. P.-E., F.A.** 1920. Mononuclear leukocytosis in reaction to acute infections (infectious mononucleosis). *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 31:410-17.
- 55. Tattevin, P., A. C. Cremieux, D. Descamps, and C. Carbon.** 2002. Transfusion-related infectious mononucleosis. *Scand J Infect Dis.* 34:777-8.
- 56. Thorley-Lawson, D. A.** 2005. EBV the prototypical human tumor virus--just how bad is it? *J Allergy Clin Immunol.* 116:251-61.
- 57. Thorley-Lawson, D. A.** 2001. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol.* 1:75-82.
- 58. van Esser, J. W., B. van der Holt, E. Meijer, H. G. Niesters, R. Trensche, S. F. Thijsen, A. M. van Loon, F. Frassoni, A. Bacigalupo, U. W. Schaefer, A. D. Osterhaus, J. W. Gratama, B. Lowenberg, L. F. Verdonck, and J. J. Cornelissen.** 2001. Epstein-Barr virus (EBV) reactivation is a frequent event after allogeneic stem cell transplantation (SCT) and quantitatively predicts EBV-lymphoproliferative disease following T-cell--depleted SCT. *Blood.* 98:972-8.
- 59. Vaughan, J. H., M. D. Nguyen, J. R. Valbracht, K. Patrick, and G. H. Rhodes.** 1995. Epstein-Barr virus-induced autoimmune responses. II. Immunoglobulin G autoantibodies to mimicking and nonmimicking epitopes. Presence in autoimmune disease. *J Clin Invest.* 95:1316-27.
- 60. Wagner, H. J., M. Wessel, W. Jabs, F. Smets, L. Fischer, G. Offner, and P. Bucskey.** 2001. Patients at risk for development of posttransplant lymphoproliferative disorder: plasma versus peripheral blood mononuclear cells as material for quantification of Epstein-Barr viral load by using real-time quantitative polymerase chain reaction. *Transplantation.* 72:1012-9.
- 61. Williams, H., K. McAulay, K. F. Macsween, N. J. Gallacher, C. D. Higgins, N. Harrison, A. J. Swerdlow, and D. H. Crawford.** 2005. The immune response to primary EBV infection: a role for natural killer cells. *Br J Haematol.* 129:266-74.

62. Yancoski, J., S. Danielian, J. Ibanez, A. Turconi, M. Cuarterolo, M. Zelazko, and G. M. Niesters Hubert. 2004. Quantification of Epstein-Barr virus load in Argentinean transplant recipients using real-time PCR. *J Clin Virol.* 31:58-65.

63. Yao, Q. Y., P. Ogan, M. Rowe, M. Wood, and A. B. Rickinson. 1989. The Epstein-Barr virus:host balance in acute infectious mononucleosis patients receiving acyclovir anti-viral therapy. *Int J Cancer.* 43:61-6.

Pour en savoir plus

RICKINSON A.B. et KIEFF E.

Epstein-Barr Virus, in *Fields Virology*, Lippincott Williams et Wilkins, Philadelphia, 2001, pp 2575-2627.

ROBERTSON E.S.

Epstein-Barr Virus, Caister Academic Press, 2005, 770 p

Voir aussi en français

Dans le volume *Les Herpesvirus humains*, par V. Maréchal, M. Ségondy et J.C. Nicolas Elsevier, 1999 :

les revues générales sur l'EBV écrites par M.C. Meyohas, J.M. Seigneurin, A. Sergeant, M. Raphaël, I. Joab, D. Emilie, J.C. Nicolas et V. Leblond, pp 323-470.

ISSN : 1293-2892
ISBN : 2-913633-47-1
EGOPRIM
45, rue de la Glacière 75013 Paris
Dépôt légal : Avril 2006



CAHIER DE **Formation** Biologie médicale

Cahiers de formation déjà parus

- | | |
|--|--|
| N° 1 : Hématologie | N° 20 : Hémostase et thrombose |
| N° 2 : Immunoanalyse | N° 21 : Virus des hépatites B (VHB), Delta (VDH), C (VHC), autres |
| N° 3 : Parasitologie | N° 22 : Syndrome des anti-phospholipides |
| N° 4 : Bactériologie | N° 23 : Parasites sanguins |
| N° 5 : Hormonologie - Gazométrie | N° 24 : Biochimie pédiatrique |
| N° 6 : G.B.E.A | N° 25 : Les moisissures d'intérêt médical |
| N° 7 : Immuno-allergie (1) | N° 26 : Immuno-hématologie et groupes sanguins |
| N° 8 : Hémoglobines glyquées - Lipides | N° 27 : Les marqueurs cardiaques |
| N° 9 : Dosage des médicaments Tome I | N° 28 : Immunoglobulines monoclonales |
| N° 10 : Hématologie Cas illustrés | N° 29 : Mycobactéries - Mycobactérioses |
| N° 11 : Amibes et flagellés intestinaux | N° 30 : Exploration de la fonction de reproduction - versant féminin |
| N° 12 : Les maladies à Prions | N° 31 : Les dermatophytes |
| N° 13 : Autoimmunité et autoanticorps | N° 32 : Les marqueurs tumoraux sériques des tumeurs solides |
| N° 14 : L'exploration de la thyroïde | N° 33 : Sport et Biologie |
| N° 15 : Dépistage de la trisomie 21 | N° 34 : Borréliose de Lyme |
| N° 16 : Immuno-allergie (2) | N° 35 : L'Inflammation |
| N° 17 : Virus des hépatites A (VHA) et E (VHE) | |
| N° 18 : Dosage des médicaments Tome II | |
| N° 19 : Vaginites et vaginoses | |
-

BIOFORMA est la structure nationale qui gère et organise la formation continue conventionnelle des directeurs et directeurs adjoints de L.a.b.m privés.

Cette formation continue est financée par les trois Caisses Nationales de l'Assurance Maladie (C.N.A.M.T.S., C.C.M.S.A. et C.A.N.A.M.) dans le cadre de la convention passée entre elles et les trois syndicats de biologistes (S.d.B., S.N.M.B. et S.L.B.C.).

A ce titre, BIOFORMA édite des cahiers de formation comme celui-ci.

Ces ouvrages sont distribués à chaque laboratoire d'analyse de biologie médicale, privé ou hospitalier, aux inspecteurs des DRASS, aux pharmaciens et médecins conseils des CRAM, aux responsables de la DGS et du Ministère de la Santé. Les précédents numéros sont disponibles à la consultation sur le site Internet www.bioforma.net.

Ces livres ne sont pas en vente dans le commerce et le tirage est de 6500 exemplaires.

ISSN : 1293-2892
ISBN : 2-913633-46-3
Dépôt légal : MARS 2006