

Déficit de l'immunité antivirale : EBV, CMV, adénovirus

M. Cavazzana-Calvo^{1, 2}, A. Durandy² et F. Le Deist²

¹ E.T.S. Site Necker

² INSERM U429, Hôpital Necker-Enfants Malades, 149, rue de Sèvres, F-75015 Paris, France

Key words: Immunodeficiency Viral complications Adenovirus CMV EBV

Correspondence to: M. Cavazzana-Calvo

Antivirus immunodeficiency

Abstract

Patients undergoing bone marrow transplantation are susceptible to many different bacterial, fungal and viral infections. Among the viral pathogens, cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV), and adenovirus cause the greatest morbidity and mortality and have been the most common infectious causes of death following the grafting of allogeneic marrow. This great susceptibility to viral infections is due to the immunodeficiency in cellular and humoral immune responses lasting for months to years. Contributing factors are high-dose chemo/radiotherapy, graft-versus-host disease (GVHD) prophylaxis/treatment, GVHD itself, the degree of HLA disparity between donor and recipient and the underlying disease. Defects of T cell helper and cytotoxic functions contribute to the great incidence of viral infections. We described here the kinetic of immunological reconstitution and the role of T cell immunodeficiency. At day 30 to 40 after BMT, a minority of patients had recovery of virus-specific CD8+ T-cell response. Between day 40 and day 90 recovery of deficient CD8+ and CD4+ T cell responses occurred in the majority of the recipients of HLA identical BMT but only in the minority of the recipients of HLA partially incompatible BMT. New approaches should therefore be envisaged either to preserve donor T-cell-mediated immunity or to accelerate immune reconstitution. Add-back of unmanipulated T-cells, or virus-specific T cells could improve antimicrobial defenses after BMT.

La greffe de moelle osseuse allogénique, bien que largement utilisée dans le traitement des patients atteints de pathologies bénignes ou malignes du système lympho-hématopoïétique, reste un procédé lourd par la morbidité et la mortalité qui y sont associées. En effet, malgré une reconstitution hématologique relativement rapide après la greffe, le risque d'infection virale persiste plusieurs mois et ce, jusqu'à ce qu'un nouveau système immunitaire compétent se mette en place. Les infections virales observées au cours de cette période de déficit immunitaire sont liées aux herpès virus (cytomégalovirus, l'herpès simplex et zoster, virus d'Epstein-Barr). D'autres virus sont occasionnellement identifiés : adénovirus, rotavirus et entérovirus [1, 2].

Les principaux facteurs qui influencent le développement de la reconstitution immunitaire après greffe de moelle osseuse sont :

- le degré d'incompatibilité HLA entre donneur et receveur,
- le type de conditionnement,
- la pathologie initiale,
- la manipulation du greffon et, la survenue d'une réaction du greffon contre l'hôte aigu et/ou chronique (GVH).

Le cytomégalovirus, le virus d'Epstein Barr et l'adénovirus humain sont responsables d'infections bénignes, mais persistantes chez les individus immunocompétents, qui impliquent une balance extrêmement fine entre

la surveillance immunologique et la mise en place de stratégies virales pour y échapper.

Les cellules T cytotoxiques jouent un rôle majeur dans la défense contre ces infections virales.

Le but de cet exposé est d'essayer de faire le point sur la cinétique de la reconstitution immunitaire après greffe de moelle osseuse et le risque viral. Quelques données d'immunothérapie adoptive seront également rapportées.

Virus d'Epstein Barr

Le virus d'Epstein Barr (EBV) est un virus ubiquitaire appartenant à la famille des Herpès viridae capable d'infecter et d'immortaliser *in vitro* les lymphocytes B d'un sujet sain. La primo-infection par ce virus peut être responsable d'une infection aiguë symptomatique (mononucléose infectieuse), mais reste asymptomatique dans la plupart des cas. Après une primo-infection, ce virus persiste dans les lymphocytes B, sous une forme latente non répliquative durant toute la vie de l'individu. Au contraire, l'infection par ce virus des cellules épithéliales de l'oropharynx, entraîne une production de virions responsables de la transmission horizontale du virus par l'intermédiaire de la salive.

Les cellules B infectées par l'EBV sous forme latente expriment les six antigènes nucléaires EBNA (EBV nuclear antigens) 1,2,3A,3C et LP et les deux protéines LMPs (latent membran proteins) 1 et 2. Chez un individu immuno-compétent, l'infection latente est sous le contrôle des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de l'EBV qui sont détectables à une fréquence de l'ordre de 1/1000 cellules T circulantes et qui peuvent être réactivés *in-vitro* par stimulation à l'aide d'une lignée lymphoblastoïde B autologue. L'activité cytotoxique (EBV-CTL) mémoire est préférentiellement dirigée contre les antigènes EBNA 3A, 3B et 3C [3-5]. La réponse humorale ne joue qu'un rôle mineur dans le contrôle de la phase latente de l'EBV alors que, au contraire, les lymphocytes T cytotoxiques semblent jouer un rôle essentiel. En effet, les sujets porteurs d'un déficit de l'immunité cellulaire présentent un risque extrêmement élevé de développer des proliférations incontrôlées de lymphocytes B infectés par l'EBV polyclonales dans un premier temps, mais pouvant évoluer vers une prolifération monoclonale, de pronostic très péjoratif.

Le développement récent des allogreffes de moelle osseuse en situation non complètement HLA compatible et des greffes d'organes, a entraîné une recrudescence des syndromes lymphoprolifératifs B induits par l'EBV, conséquence directe soit du retard à la reconstitution immunitaire au décours des greffes de moelle osseuse soit de l'immuno-suppression requise pour éviter ou traiter les phénomènes de rejet. Cette complication rare dans certains types de greffes, (rein, moelle osseuse en situation HLA identique) peut être beaucoup plus fréquente (environ 10 %) dans d'autres types de transplantation (coeur, poumon, moelle osseuse HLA partiellement incompatible) [6- 8].

Dans le cadre des transplantation médullaires partiellement incompatibles intra-familiales [9, 10] ou HLA identiques non apparenté [11, 12], plusieurs facteurs de risque ont été identifiés :

- Le degré de disparité HLA entre le donneur et le receveur,
- L'utilisation d'une déplétion en lymphocyte T du greffon à titre de prophylaxie de la GVH,
- Le traitement de la survenue d'une GVH aiguë de grade IV par administration du sérum anti-lymphocytaire,
- La pathologie initiale indication de la greffe médullaire, en particulier le syndrome de Wiskott-Aldrich et les leucémies aiguës lymphoblastiques [13],
- Une deuxième greffe après échec de la première transplantation.

Dans le cadre de transplantation HLA géno-identique intra-familiale, la déplétion T du greffon représente le principal facteur risque.

Ainsi, l'incidence des syndromes lymphoprolifératifs EBV-induits n'est que de 0,2 % chez les patients greffés avec une moelle osseuse non T-déplétée issue d'un donneur HLA-génoidentique. Elle atteint 1-5 % des patients greffés en situation HLA phénoidentique non apparentée, et 10-20 % des sujets greffés avec une moelle HLA partiellement incompatible déplétée en lymphocytes T.

Ces lymphoproliférations induites par l'EBV se présentent le plus souvent sous forme de lymphomes diffus à grandes cellules B qui peuvent être oligoclonaux ou monoclonaux. Ces lymphomes expriment outre EBNA 1, également EBNA 2, EBNA 3 et LMP 1. Leur découverte clinique est souvent suivie d'un décours fatal. Dans plus de 80 %, ces lymphoproliférations se développent à partir de cellules B du donneur chez les transplantés de moelle osseuse. Au contraire, chez les transplantés d'organe, elles se développent le plus souvent à partir des lymphocytes B du receveur. L'EBV sous sa forme épisomale est détecté dans plus de 90 % des lymphoproliférations. Le pronostic est très sombre puisque dans certaines études le taux de mortalité

dépasse les 70 %.

Une autre caractéristique de ces lymphomes, survenant après greffes de moelle osseuse, est leur apparition précoce, c'est à dire, entre le deuxième et le quatrième mois après greffe. En effet, plus de 50 % des lymphoproliférations EBV-induites sont détectées pendant les quatre mois qui suivent la transplantation mais le pourcentage décroît successivement et on ne retrouve plus de lymphomes EBV au delà du huitième mois. Cette pathologie maligne est donc le résultat de l'émergence de clones de cellules B transformées du donneur quand les cellules lymphoïdes potentiellement capables de limiter leur croissance sont à leur valeur la plus basse.

Tout récemment, il a été conduit une étude visant à analyser et quantifier la réponse cellulaire T spécifiquement dirigée contre l'EBV après greffe allogénique déplétée ou non en cellules T. Cette étude corrèle ce défaut de l'immunité cellulaire avec la susceptibilité à développer une lymphoprolifération EBV. Les cellules effectrices étudiées dans ce travail étaient essentiellement des lymphocytes T, les cellules natural-killer étant sélectivement déplétées dans la préparation de cellules effectrices.

Sur les 26 patients évalués dans cette étude, trois mois après la greffe, aucun d'entre eux ne montrait une réponse cytotoxique MHC restreinte spécifiquement dirigée contre l'EBV. C'est au bout de six mois qu'une fréquence de précurseurs cytotoxiques (CTLp) dirigés contre la lignée EBV autologue transformée, comparable à celle que l'on détecte chez des adultes séropositifs sains [14]. Ces résultats corroborent ceux que nous avons rapporté dans une étude multicentrique française, concernant des greffes HLA partiellement compatibles, pour des enfants atteints de leucémie aiguë lymphoblastique à haut risque. Dans cette étude, nous avons vu que le nombre de 500 lymphocytes T CD3+/mm³ est atteint dans un délai variable de trois à six mois après greffe. Dans ce même groupe de patients, une réponse aux mitogènes est détectable sept mois après réalisation de la greffe et la réponse aux antigènes en moyenne neuf mois avec une variabilité de six à quatorze mois. Un nombre de lymphocytes CD4+ supérieur à 500/mm³ est observé dans l'année qui suit la greffe. Pendant cette période de profond déficit T on observe une absence de réponse cytotoxique contre l'EBV, ce qui correspond exactement à la période durant laquelle les patients peuvent développer une lymphoprolifération EBV-induite [13].

Le point surprenant qui émerge de l'étude de Lucas et al. [9] est l'absence de différence dans la cinétique de restauration de la réponse cellulaire anti-EBV que la moelle osseuse soit ou non T déplétée. En effet, les receveurs d'une moelle osseuse T déplétée reçoivent une dose de lymphocytes T clonables variant entre 2×10^4 et 1×10^5 /kg, dose qui est 500 à 1000 fois moins importante que celle transférée avec une moelle osseuse non manipulée. La conséquence est une diminution drastique du nombre des clones T anti-EBV infusés aux receveurs d'une greffe déplétée. Ce résultat doit donc être évalué avec prudence compte tenu du faible nombre des effectifs étudiés par ces auteurs. D'autres paramètres doivent probablement être pris en considération.

Deux approches ont été récemment évaluées pour diminuer l'incidence des infections à EBV : la déplétion du greffon en lymphocytes B [15] et l'infusion des clones T anti-EBV [16].

Adénovirus

Il existe environ cinquante stéréotypes d'adénovirus humain qui sont divisés en six familles sous la base de leurs caractéristiques immunologiques, moléculaires et fonctionnelles [17]. D'un point de vue physique, les adénovirus sont des virus contenant un génome à double bras d'ADN linéaire d'environ trente cinq Kb. L'adénovirus se lie à un récepteur cellulaire dont l'identité n'est pas connue et, il est internalisé après liaison avec une protéine secondaire récemment identifiée comme récepteur de la vitronectine [18]. Le virus est internalisé dans les lysosomes et le core viral libéré migre dans le noyau où la transcription de l'adénovirus peut commencer. La plus grande partie de la population adulte (plus de 85 %) présente des anticorps sériques dirigés contre de nombreux séréotypes d'adénovirus communément diffusés. Les individus infectés développent une immunité anti-adénovirus qui perdure toute leur vie ; ce virus reste dans l'organisme sous forme latente.

Les affections produites par l'adénovirus sont rarement graves chez les enfants et les adultes sains, mais elles peuvent être sévères et compromettre le pronostic vital des individus immuno-déprimés.

On sous-estime le rôle de l'adénovirus dans les infections après greffe. En effet, dans une étude rétrospective chez 201 receveurs d'une greffe phénoïdétique non apparentée ou partiellement incompatible, l'adénovirus a été détecté chez 21 % des sujets adultes, par culture dans les liquides biologiques et, chez 31 % des sujets

d'âge pédiatrique [19w].

Cinq des six sous groupes d'adénovirus ont été détectés. L'association entre l'infection sévère à adénovirus et l'immunodéficiência de type cellulaire suggère que l'adénovirus est normalement contrôlé par la réponse immunitaire cellulaire. Il n'existe pas à l'heure actuelle de médicaments efficaces contre les affections d'adénovirus, mais il est possible que le transfert adoptif d'une réponse cellulaire et humorale, puisse contrôler chez ces sujets immuno-déprimés l'infection adénovirale comme il a été décrit pour le virus d'Epstein Barr [16].

On connaît très peu de choses sur la réponse cellulaire à l'adénovirus. Une étude récente indique que les sujets normaux séropositifs pour l'adénovirus, ont des réponses cellulaires de type mémoire comme il a été démontré *in vitro* grâce à la prolifération des cellules Tauxilliaires en réponse à des virions d'adénovirus purifiés.

Une deuxième étude démontre que les protéines de capsid virale purifiées peuvent stimuler la prolifération de cellules mononucléées périphériques *in vitro*, mais l'identité des cellules effectrices n'a pas encore été déterminée [20, 21].

Les cellules NK ne jouent pas un rôle déterminant dans l'élimination des cellules humaines infectées par l'adénovirus. En effet, après infection, il n'y a pas de diminution de l'expression membranaire des antigènes majeurs d'histo-compatibilité (MHC) de classe I, comme on observe chez les rongeurs [22].

Dans un modèle *in vitro* d'infection de cellules dendritiques par l'adénovirus, il a été montré l'existence d'une réponse MHC restreinte et d'une réponse liée à la présence de cellules NK CD56+.

Une cross-réactivité existe entre les clones T dirigés contre des sérotypes différents et les principales cibles de cette cytotoxicité sont les protéines de la capsid virale.

D'une façon analogue, les clones T isolés du sang périphérique des individus immunisés sont essentiellement dirigés contre les protéines du capsid.

La reconnaissance de l'Antigène capsidique peut amener à la cytolysse rapide des cellules infectées sans qu'il y ait besoin d'assemblage des virions comme pour d'autres virus humains à ADN (ex cytomégalo virus et herpès simplex). Les infections à adénovirus se développent après greffe, plus tôt chez les enfants (< 30 jours) que chez les adultes (> 90 jours). La raison de cette différence est mal comprise.

Les données concernant la cross-réactivité entre clones cytotoxiques dirigés contre les différents sérotypes ont une importante conséquence clinique, surtout en ce qui concerne le développement des clones T cytotoxiques spécifiques de l'adénovirus utilisables en thérapeutique humaine. Dans un cas, des lymphocytes T du donneur non manipulés ont été utilisés avec succès pour traiter une infection adénovirale après greffe de moelle osseuse, dans un cas [23].

Cytomegalovirus

L'histoire naturelle de l'infection à cytomégalo virus a fait l'objet de nombreuses études.

Après une infection primaire, les sujets immuno-compétents développent une pathologie modeste ou sub-clinique et le virus rentre dans une phase latente. Bien que les sujets sains CMV séropositifs ne présentent aucune évidence d'infection active, la fréquence des précurseurs cytotoxiques (CTLp) CMV-spécifiques reste très élevée et comprise entre 1/5000 et 1/20000 des lymphocytes T du sang périphérique.

Cette fréquence persistant tout au long de la vie, suggère que la réponse Tet plus particulièrement CD8 joue un rôle actif dans la protection de l'hôte vis à vis d'une réactivation virale [24].

Un mois après une greffe HLA géno-identique, les CTL anti-CMV CD8 (+) classe I restreints sont indécélables chez 70 % des malades évalués [25].

Une activité cytotoxique anti-CMV commence à être présente à partir de trois mois chez 50 % des malades greffés et devient quantitativement comparable à celle du donneur avant greffe dans un délai variable de trois à huit mois post-greffe [25-26].

Cette variabilité multi-factorielle est liée d'une part, à la survenue d'une GVH aiguë et d'autre part, au déficit de fonctions auxilliaires. Bien qu'il n'y ait pas de corrélations entre prolifération *in vitro* et protection anti-infectieuse *in vivo*, une corrélation existe entre la présence ou l'absence d'une prolifération T auxilliaires CMV spécifique et le développement d'une activité T cytotoxique. Ceci est en accord avec les résultats récemment publiés par Riddel où la persistance *in vivo* des clones T CD8 + est augmentée par l'apparition des cellules CD4 + proliférantes contre ce virus [27]. Dans le travail ici rapporté, l'absence de CTL anti-CMV s'accompagne chez 60% des receveurs du développement d'une pneumopathie interstielle au decours fatal.

Par contre, la présence d'une réponse cytotoxique spécifique semble protéger des formes sévères d'infection. Ces résultats concordent avec ceux obtenus dans un modèle murin de maladie à CMV et nous incitent à proposer des protocoles d'immunothérapie adoptive.

Conclusions et perspectives

Après une greffe de moelle osseuse, un profond déficit immunitaire caractérise les premiers six mois. Au cours de cette période, l'absence presque totale de réponse de l'immunité cellulaire a pour conséquence une fréquence élevée d'infections virales à pronostic réservé. Des efforts sont actuellement mis en oeuvre par différentes équipes pour essayer de diminuer le risque viral. L'immunothérapie adoptive avec infusion des clones de lymphocytes T dirigés contre les virus en cause, représente une approche envisageable dans les toutes prochaines années.

Références

1. Meyers JD, Atkinson K (1983) Infection in bone marrow transplantation. *Clin Haematol* 12: 791-811
2. Goodrich JA, Boeckh M, Bowden R (1994) Strategies for the prevention of cytomegalovirus after marrow transplantation. *Clin Infect Dis* 19: 287-298
3. Murray RJ, Kurilla MG, Brooks JM, et al (1992) Identification of target antigens for the immune control of EBV-positive malignancies. *J Exp Med* 176: 157-163
4. Khanna R, Burrows SR, Kurilla MG, Jacob CA, Misko IS, Sculley TB, Kieff E, Moss DJ (1992) Localization of Epstein-Barr virus cytotoxic T cell epitopes using recombinant vaccinia: implications for vaccine development. *J Exp Med* 176: 169-176
5. Tamaki H, Beaulieu BL, Somasunderan M, Sullivan JL (1995) Major histocompatibility complex class I - restricted cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus in children. *J Infect Dis* 172: 739-746
6. Hanto DW, Frizzera G, Gajl-Peczalska KJ, et al (1985) Epstein-Barr virus, immunodeficiency and B-cell lymphoproliferation. *Transplantation* 39: 461-472
7. Ho M, Jaffe R, Miller G (1988) The frequency of Epstein-Barr virus infection and associated lymphoproliferative syndrome after transplantation and its manifestations in children. *Transplantation* 45: 719-727
8. Shapiro RS, Mc Clain K, Frizzera G, et al (1988) Epstein-Barr virus associated B-cell lymphoproliferative disorders following bone marrow transplantation. *Blood* 71: 1234-1243
9. Fischer A, Griscelli C, Frieiderich W, et al (1986) Bone marrow transplantation for immunodeficiencies and osteopetrosis: European survey, 1968-1985. *Lancet* 2: 1080-1083
10. Fischer A, Landais P, Friedrich W, et al (1994) Bone marrow transplantation in Europe for primary immunodeficiencies other than severe combined immunodeficiency: an EBMT/EGID report. *Blood* 83: 1149-1154
11. Ash RC, Casper JT, Chitambar CR, et al (1990). Successful allogeneic transplantation of T-cell depleted bone marrow from closely HLA - matched unrelated donors. *N Engl J Med* 322: 485-494
12. Kernan NA, Bartsch G, Ash RC, et al (1993) Analysis of 462 transplantations from unrelated donors facilitated by the national marrow donor program. *N Engl J Med* 328: 593-602
13. Cavazzana-Calvo M, Bordignon P, Michel G, et al (1996) A phase II trial of partially incompatible bone

marrow transplantation or high-risk acute lymphoblastic leukaemia in children. Prevention of graft rejection with anti-LFA-1 and anti CD2 antibodies. *Br J Haematol* 93: 131-138

14. Lucas KG, Small TN, Heller G, Dupont B, O'Reilly R (1996) The Development of cellular immunity to Epstein-Barr Virus after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 87: 2594-2603

15. Cavazzana-Calvo M, Jabado N, Haddad E, et al (1996) Ex vivo B and T lymphocyte depletion of partially incompatible marrow graft. *Blood* 88 [Suppl 1]: 420a

16. Rooney CM, Smith CA, CYC Ng, et al (1995) Use of gene - modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr virus related lymphoproliferation. *Lancet* 385: 9-13

17. Wadell G, Hammarskjold ML, Winberg G, et al (1980) Genetic variability of adenoviruses. *Aun NY Acad Sci* 354: 16-42

18. Wickham TJ, Mathias P, Cheresh DA, Nemerow GR (1993) Integrins avb3 and avb5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 73: 309-319

19. Flomenberg P, Babbitt J, Drobyski WR, Ash RC, et al (1994) Increasing incidence of adenovirus disease in Bone Marrow Transplant recipients. *J Infect Dis* 169: 775-781

20. Flomenberg P, Piaskowski V, Tuitt RL, Casper JT (1995) Characterization of human proliferative T cell responses to adenovirus. *J Infect Dis* 171: 1090-1096

21. Sonberbielle BE, Russell WC (1995) Human T cell proliferative response to polypeptides from adenovirus type 2. *J Infect Dis* 172: 1421-1422

22. Routes JM, Cook JL (1995) E1A gene expression induces susceptibility to killing by NK cells following immortalization but not adenovirus infection of human cells. *Virology* 210: 421-428

23. Hromas RK, Cornetta E, Srour C, Blanke C, Broun ER (1994) Donor leukocyte infusion as therapy of life-threatening adenoviral infections after T-cell-depleted bone marrow transplantation *Blood* 84: 1689-1690

24. Borysiewicz LK, Graham S, Hickling JK, Mason PD, Sissous J GP (1988) Human cytomegalovirus specific cytotoxic T cells: their precursor frequency and stage specificity. *Eur J Immunol* 18: 269-278

25. Reusser P, Riddel S, Meyers J, Greenberg P (1991) Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* 78: 1373-1380

26. Li CR, Greenberg PD, Gilbert M, Goodrich JM, Riddel SR (1994). Recovery of HLA-restricted cytomegalovirus (CMV) - specific T-cell responses after allogeneic bone marrow transplant correlation with CMV disease and effect of ganciclovir prophylaxis. *Blood* 83: 1971-1979

27. Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ, Finch RJ, Watanabe KS, Thomas ED, Riddel SR (1995) Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med* 333: 1038-104

Hematol Cell Ther (1997) 39 : 269-273

© Springer-Verlag France 1997