

Virus d'Epstein-Barr et maladie de Hodgkin : l'exemple du centre Tunisien

Sadok Korbi ⁽¹⁾, Mounir Trimeche ⁽¹⁾, Badreddine Sriha ⁽¹⁾, Mohamed Tahar Yacoubi ⁽¹⁾, Sihem Hmissa ⁽¹⁾, Moncef Mokni ⁽¹⁾, Philippe Delvenne ⁽²⁾, Jacques Boniver ⁽²⁾, Soumaya Rammeh ⁽¹⁾

(1) Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, CHU Farhat Hached, 4000 Sousse, Tunisie.

(2) Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, CHU Sart-Tilman, Liège, Belgique.

Korbi S, Trimeche M, Sriha B, Tahar Yacoubi M, Hmissa S, Mokni M et al. Virus d'Epstein-Barr et maladie de Hodgkin : l'exemple du centre Tunisien. Ann Pathol 2002 ; 22 : 96-101.

Summary

Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease: the example of central Tunisia

The purpose of this study was to evaluate the prevalence of Epstein-Barr virus in Hodgkin disease in Tunisia through a series of 77 cases.

Association with Epstein-Barr virus was demonstrated by Epstein-Barr encoded early RNA transcripts (EBER) *in situ* hybridization in 70 % of cases and by

latent membrane protein 1 (LMP1) immunohistochemistry in 58.4 % of cases.

EBER positive cases were more frequent in extreme age classes (< 15 and > 54 years) there was no correlation with sex, histologic sub-type and clinical stage. Our findings show a high prevalence for EBV infection in Tunisian Hodgkin's disease particularly among extreme ages. ♦

Key words: Epstein-Barr virus, Hodgkin's disease, *in situ* hybridization, immunohistochemistry.

Résumé

Le but de ce travail a été l'évaluation de la prévalence du virus d'Epstein-Barr dans la Maladie de Hodgkin dans le centre tunisien, à travers l'étude d'une série de 77 cas.

Le virus d'Epstein-Barr a été mis en évidence par hybridation *in situ* avec les oligonucléotides EBER, complémentaires des deux transcrits primaires viraux EBER 1 et 2, dans 70 % des cas, et par immunohistochimie en utilisant un anticorps anti-LMP1 (latent membrane protein 1) dans 58,4 % des cas.

Une corrélation a été notée entre les cas EBER+ et les tranches d'âge extrêmes (< 15 et > 54 ans) ($p = 0,004$) mais non avec le sexe, le type histologique et le stade clinique.

En conclusion, nos résultats montrent une forte prévalence du virus d'Epstein-Barr dans la maladie de Hodgkin en Tunisie notamment chez les patients d'âges extrêmes. ♦

Mots-clés : Epstein-Barr virus, maladie de Hodgkin, hybridation *in situ*, immunohistochimie.

Introduction

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est un virus humain ubiquitaire appartenant à la famille des herpes viridae. Il est responsable d'une affection bénigne, la mononucléose infectieuse [1] et il est étroitement lié à deux proliférations cellulaires malignes, l'une d'origine lymphoïde, le lymphome de Burkitt endémique [2], et l'autre d'origine épithéliale, le carcinome indifférencié du nasopharynx [3].

Plus récemment, l'EBV a été impliqué dans les lymphoproliférations survenant chez des patients immunodéprimés [4, 5], et dans certaines proliférations malignes

observées chez des personnes apparemment immunocompétentes, telles que la maladie de Hodgkin (MDH) [6], certains lymphomes non hodgkiniens [7-10] et dans des carcinomes de type lympho-épithélial [11-15].

Toutefois, la signification pathogénique de la présence de l'EBV dans ces cancers est encore discutée. De plus, les mécanismes d'action de l'EBV dans la cancérisation sont mal élucidés.

Dans la MDH, la détection de l'EBV et l'étude de l'expression de ses gènes et notamment du gène codant pour LMP1, considérée comme un oncogène à cause de son effet transformant *in vitro* [16, 17], sont inconstantes et varient qualitativement

Accepté pour publication le 7 janvier 2002.

Tirés à part : S. Korbi, voir adresse en début d'article.
e-mail : sadok.korbi@uc.rnu.tn

vement et quantitativement selon plusieurs paramètres relatifs à la tumeur, à l'hôte, à l'environnement et probablement à la souche virale [18].

Le but de ce travail a été d'évaluer la prévalence de l'EBV dans la MDH en Tunisie par immunohistochimie (IHC) et par hybridation *in situ* (HIS) dans une série de 77 cas et de préciser les caractéristiques de cette association.

Matériel et méthodes

Notre étude a concerné 77 cas de MDH, inventoriés au Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques du CHU Farhat Hached de Sousse entre 1988 et 1998.

Ces cas ont été sélectionnés sur la base d'un diagnostic anatomopathologique confirmé, de la disponibilité de tissu tumoral fixé en formol ou en Bouin, enrobé en paraffine et sur l'absence d'une infection connue par le virus de l'immunodéficience humaine (HIV).

Les données cliniques concernant l'âge, le sexe, la présentation clinique et le stade clinique selon la classification d'Ann-Arbor ont été analysées.

Au terme de l'étude morphologique et immunohistochimique, les cas ont été classés dans les sous-types histologiques selon la classification de RYE. Un prélèvement sanguin a également été effectué pour 9 patients avant le début du traitement afin de pratiquer un examen sérologique de l'EBV.

Immunohistochimie

L'étude IHC de l'EBV a été effectuée avec l'anticorps anti-LMP1 (clone CS1-4, DAKO) sur des coupes de tissu enrobé en paraffine en utilisant le protocole LSAB (labelled streptavidin biotin, DAKO).

Après déparaffinage, réhydratation et neutralisation des peroxydases endogènes par le peroxyde d'hydrogène à 3 %, un démasquage des antigènes a été réalisé par traitement au four micro-onde (750 W) pendant 5 minutes dans un tampon citrate pH6. Après incubation de 30 minutes avec l'anticorps primaire, un anti-anticorps biotinylé a été appliqué sur les coupes durant 30 minutes suivi du conjugué streptavidine/ peroxydase.

L'activité peroxydasique a été révélée en utilisant le diamino-benzidine (DAB) comme chromogène. Enfin, les coupes ont été contre-colorées à l'hématoxyline.

Seul le marquage cytoplasmique a été considéré positif et non le marquage non spécifique des noyaux.

Hybridation *in situ*

La détection de l'EBV par HIS a été effectuée avec les oligonucléotides EBER, complémentaires des deux transcrits primaires nucléaires EBER 1 et 2 de l'EBV, conjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine (DAKO). La technique d'HIS a été réalisée en suivant les instructions du fournisseur. Les coupes ont été dépa-

raffinées, réhydratées puis digérées par la protéinase K (1 µg/ml dans un tampon TE, pH8) 30 minutes à température ambiante. Après incubation avec la sonde pendant une nuit à 42 °C dans une chambre humide, les coupes ont été soumises à des lavages dans un tampon TBS pH7,6.

La révélation a été réalisée à l'aide du Kit de détection DAKO. L'anticorps anti-FITC conjugué à la phosphatase alcaline a été appliqué sur les coupes pendant 30 minutes ; puis, les coupes ont été lavées dans deux bains de TBS pH6 pendant 3 minutes ; ensuite, le chromogène BCIP/NBT (5 bromo-4 chloro-3-indolyl phosphate avec le nitrobleu tetrazolium) a été appliqué pendant 30 minutes. Après lavage à l'eau, les coupes ont été contre colorées à l'hématoxyline et montées dans le glycergel.

La lecture a été réalisée par microscopie optique et la positivité a été évaluée qualitativement.

Sérologie de l'EBV

Cette partie de l'étude a concerné 9 patients pour lesquels un prélèvement sanguin a été effectué avant le début du traitement.

Le titre sérologique des immunoglobulines IgG et IgM anti-EBV a été évalué par une technique immuno-enzymatique à l'aide du Test Enzygnost anti-EBV/IgM et anti-EBV/IgG (BEHRING). Les antigènes viraux de la plaque-test correspondent à un cocktail des antigènes de capsid (VCA), antigènes associés aux noyaux (EBNAs) et les « early antigens » (EA-D).

La mesure de la densité optique a été effectuée à une longueur d'onde de 450 nm grâce à un lecteur ELISA, Lab-System Multiscan.

Ce test permet de distinguer quatre profils sérologiques : sérologie négative (IgG < 0,1 DO et IgM < 0,1 DO), infection ancienne par EBV (IgG > 25 U/ml et IgM < 0,1 DO), infection récente par EBV (IgG > 25 U/ml et IgM > 0,2 DO) et infection de réactivation (IgG > 650 U/ml et IgM < 0,1 DO).

Analyse statistique

La comparaison des variables a été réalisée par le test du χ^2 , le test du χ^2 corrigé de Yates et le test exact de Fisher. Le seuil de signification retenu a été de 0,05.

Résultats

L'âge des patients variait de 4 à 69 ans avec une médiane de 32 ans. La répartition par tranches d'âge a montré deux pics de fréquence, l'un est situé avant l'âge de 15 ans (23,7 %) et l'autre entre 45 et 54 ans (17,1 %) ; toutefois, 43,4 % des cas étaient âgés de moins de 25 ans. 67,5 % des patients étaient de sexe masculin et 32,5 % de sexe féminin avec un *sex-ratio* à 2.

61 % des patients ont été diagnostiqués aux stades cliniques I/II et 39 % aux stades III/IV.

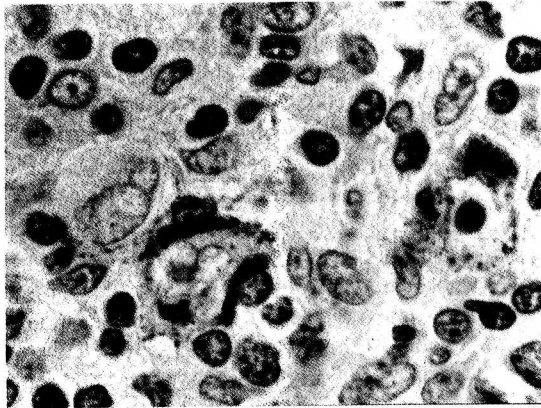


FIG. 1. — Détection de LMP1 par immunohistochimie dans les cellules de Reed-Sternberg et de Hodgkin (X 1 000).

FIG. 1. — LMP1-immunostaining in Reed-Sternberg and Hodgkin cells (X 400).

La sclérose nodulaire était le type histologique le plus fréquent (84,4 %) suivi par la cellularité mixte (10,3 %), la prédominance lymphocytaire (2,6 %) et la déplétion lymphocytaire (2,6 %). Le *tableau I* regroupe les résultats de l'IHC et de l'HIS. L'étude IHC a montré l'expression de la protéine virale LMP1 par les cellules de Reed-Sternberg et de Hodgkin (RS-H) dans 45cas/77 (58,4 %). LMP1 a été détecté dans les cellules de RS-H et non dans les cellules stromales (*figure 1*).

L'HIS a montré la présence de l'EBV dans 70,1 % des cas de MDH. Nous n'avons pas constaté de cas HIS - / IHC (LMP1)+.

Dans les cas HIS+, le marquage a été noté dans les noyaux de la quasi-totalité des cellules de RS-H (*figure 2*). D'autre part, dans 13 cas EBER+, en plus des cellules de RS-H, un marquage a été noté dans des lymphocytes du stroma.

En tenant compte du type histologique, l'EBV a été mis en évidence dans 45/65 cas (69,2 %) de sclérose nodulaire, 7cas /8 de cellularité mixte et les deux cas de déplétion lymphocytaire, mais non dans les 2 cas de type à prédominance lymphocytaire. La différence n'était pas statistiquement significative ($p = 0,08$).

L'étude comparative des groupes EBV+ et EBV- (*Tableau II*) a montré une corrélation entre la

TABLEAU I. — Résultats de l'immunohistochimie et de l'hybridation *in situ*.

TABLE I. — Immunohistochemistry and *in situ* hybridization results.

Types histologiques	LMP1+		EBER+	
	N cas	%	N	%
Prédominance lymphocytaire	2	2,6	0	0
Sclérose nodulaire	65	84,4	37	60
Cellularité mixte	8	10,4	6	75
Déplétion lymphocytaire	2	2,6	2	100
Total	77	100,0	45	58,4

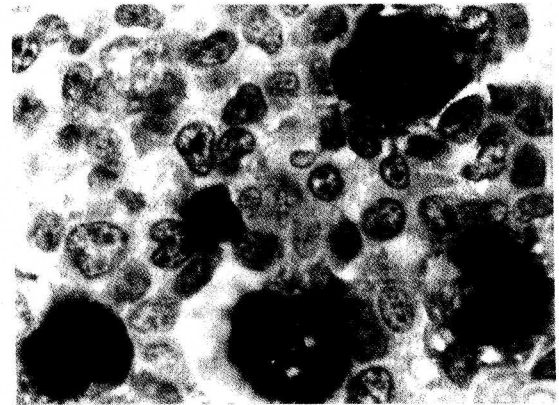


FIG. 2. — Positivité des cellules de Reed-Sternberg et de quelques cellules stromales à l'hybridation *in situ* (EBER) (X 1 000).

FIG. 2. — *In situ* hybridization (EBER) positivity in Reed-Sternberg cells and within some stromal cells (X 1 000).

présence de l'EBV dans le tissu tumoral et les patients âgés de moins de 15 ans (90 %) et de plus de 54 ans (100 %) comparativement aux adultes (58 %) ($p = 0,004$; *figure 3*).

Nous n'avons pas trouvé de corrélation significative entre la détection de l'EBV dans les cellules tumorales et le sexe et le stade clinique des patients.

L'étude sérologique pratiquée chez 9 patients a montré un profil de réactivation virale dans 6 cas (dont 5 HIS+). Les autres cas ont montré les traces d'une infection ancienne. Aucun cas d'infection récente n'a été décelé.

Discussion

La MDH se caractérise par une épidémiologie complexe et une distribution bimodale selon l'âge avec deux pics d'incidence, chez les adultes jeunes et les personnes âgées dans les pays

TABLEAU II. — Caractéristiques des cas de maladie de Hodgkin.

Caractéristiques	EBV+	EBV-	P
Age :			$p = 0,004$
< 15 ans	16	2	
15-54 ans	28	20	
> 54 ans	10	0	
Sexe :			0,27
Masculin	39	13	
Féminin	15	10	
Types histologiques			0,42
Cellularité mixte	7	1	
Autres	47	22	
Stade clinique :			0,45
I/II	31	16	
III/IV	23	7	
Sérologie EBV :			
Réactivation	5	1	
Séquelle	2	1	
Infection aiguë	-	-	
Négative	-	-	

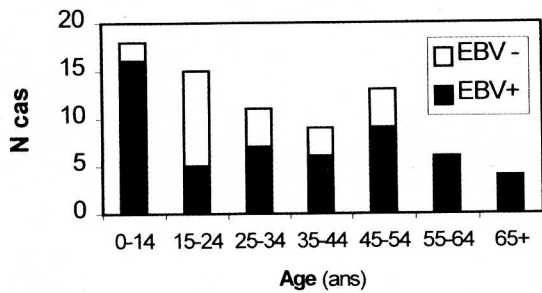


FIG. 3. — Association du virus d'Epstein-Barr (EBER) avec les patients âgés de moins de 14 ans et de plus de 54 ans dans la maladie de Hodgkin ($p = 0,004$).

FIG. 3. — Association of Epstein-Barr virus (EBER) and patients aged younger than 14 and older than 54 years in Hodgkin's disease ($p = 0,004$).

industrialisés et chez les enfants et les personnes âgées dans les pays en développement. La sclérose nodulaire représente le type histologique le plus fréquent chez les adultes dans les pays développés. Le type cellularité mixte est plus fréquent chez les enfants et les personnes âgées dans les pays en développement [18].

En Tunisie la MDH montre un profil intermédiaire avec deux pics de fréquence, chez les patients de moins de 15 ans et entre 45 et 54 ans, avec une prédominance du type histologique sclérose nodulaire (84,4 % des cas).

L'association de l'EBV avec la MDH est bien établie. Cependant la détection du virus dans les cellules de RS-H est souvent limitée à une proportion limitée de cas, variant significativement avec l'origine géographique, la race, l'âge, le sexe et le niveau socio-économique des patients [19]. En Europe et aux États-Unis, l'EBV a été mis en évidence dans 32 à 58 % des cas [20, 21] avec une association significative avec le type cellularité mixte dans plus de 50 % des cas comparativement à la sclérose nodulaire [20, 22, 23]. Dans les pays en développement, l'EBV a été détecté dans des proportions plus importantes allant jusqu'à 94 % au Pérou [24] et 100 % en Honduras [25]. En revanche, l'association de l'EBV avec le type histologique est moins évidente et tous les types histologiques semblent être fortement associés à l'EBV dans ces pays [26, 27]. Le profil de l'association de l'EBV avec la MDH en Tunisie se rapproche de celui observé dans les pays en développement puisque dans notre série, l'EBV a été détecté par HIS dans les cellules de RS-H dans plus de deux tiers des cas étudiés (70,1 %) sans différence significative entre les types histologiques.

De plus, nous avons trouvé une corrélation significative entre la présence de l'EBV dans les cellules de RS-H et les tranches d'âge de moins de 15 ans (90 %) et de plus de 54 ans (100 %) comparativement aux adultes (58 %) ($p = 0,004$). Ceci est en accord avec les données de la littérature [20, 22, 24, 28].

Certaines études ont suggéré une corrélation entre la primo-infection précoce par l'EBV dans

les pays en développement et la forte prévalence des cas de MDH EBV+ dans l'enfance [25]. Ceci est vraisemblablement le cas également pour la Tunisie. Toutefois, cette hypothèse mérite d'être étayée par une étude prospective dans ce pays.

La faible détection de l'EBV dans la MDH chez les adultes jeunes qui représentent une proportion assez élevée des cas de MDH notamment dans les pays développés et la variation de la distribution des types histologiques selon l'âge et le sexe ont suggéré l'hypothèse de l'existence d'entités de MDH différentes selon l'association ou non à l'EBV. Dans les MDH EBV-, un autre virus ou d'autres facteurs pourraient être impliqués [29, 30].

Dans notre étude nous n'avons pas trouvé de corrélation entre les cas EBV+ et le stade clinique ($P = 0,4$). L'implication pronostique de la présence de l'EBV dans les cellules de RS-H est encore controversée. Certaines études n'ont pas trouvé de corrélation entre l'EBV et le stade clinique ou la survie [23, 31] ; d'autres études ont constaté une corrélation significative entre les cas EBV+ et la survie globale plus favorable [32], la survie sans rechute [33], la survie dans le groupe des patients jeunes (âgés de moins de 30 ans) aux stades I et II comparativement aux patients âgés [34]. Une autre étude a noté un mauvais pronostic pour les cas de MDH EBV+ chez les femmes âgées comparativement aux femmes-jeunes [35].

L'étude sérologique effectuée chez 9 de nos patients a montré la présence d'IgG anti-EBV chez tous ces cas avec un profil de réactivation dans 6 cas dont 5 sont HIS+ témoignant que l'infection par l'EBV était active avant le diagnostic de la MDH.

La protéine virale LMP1 a été détectée dans 83 % des cas HIS+ chez nos patients. Cette protéine est un oncogène de l'EBV dont le pouvoir transformant a été confirmé *in vitro* [16]. Dans la littérature, la détection de l'expression de LMP1 par IHC dans la MDH a été notée chez 34 à 78 % des patients immunocompétents [22, 36]. Cette forte expression de LMP1 a suggéré l'hypothèse de l'implication de l'EBV dans la pathogénèse de la MDH. Cependant, les conséquences de l'expression de LMP1 dans les cellules de RS-H sont encore mal élucidées. Les études réalisées sur la MDH n'ont pas, jusqu'à présent, trouvé des corrélations significatives entre la présence de LMP1 dans les cellules de RS-H et l'expression des gènes cellulaires inductibles par LMP1, particulièrement Bcl-2 (inhibiteur de l'apoptose), CD23 (marqueur d'activation des lymphocytes B) et la molécule d'adhésion ICAM1 [37, 38].

En conclusion, nos résultats ont montré une forte association de l'EBV avec la MDH en Tunisie notamment chez les classes d'âges extrêmes. ■

Références

- [1] Henle G, Henle W, Diehl V. Relation of Burkitt's tumor associated herpes-type virus to mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968 ; 59 : 94-9.
- [2] Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particules in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1964 ; i : 702-3.
- [3] Zur Hausen H, Schulte-Holthausen H, Klein G, Henle W, Henle G, Clifford P et al. Epstein-Barr virus DNA in biopsies of Burkitt's tumors and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature* 1970 ; 228 : 1056.
- [4] Saemundsen AK, Purtilo DT, Sakamoto K, Sullivan JL, Synnerholm AC, Hanto D et al. Documentation of Epstein-Barr virus infection in immunodeficient patients with life-threatening lymphoproliferative diseases by Epstein-Barr virus complementary RNA/DNA and viral DNA/DNA hybridization. *Cancer Res* 1981 ; 41 : 4237-42.
- [5] Ross R, Dworsky R, Paganini-Hill A, Levine A, Mack T. Non-Hodgkin's lymphomas in never married men in Los Angeles. *Br J Cancer* 1985 ; 52 : 785-7.
- [6] Weiss L, Strickler JG, Warnke PA, Purtilo DT, Sklar J. Epstein-Barr virus-DNA, in tissues of Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 1987 ; 129 : 86-91.
- [7] Harabuchi Y, Yamanaka N, Kataura A, Imai S, Kinoshita T, Mizuno F et al. Epstein-Barr virus in nasal T-cell lymphomas in patients with lethal midline granuloma. *Lancet* 1990 ; 335 : 128-30.
- [8] Hummel M, Anagnostopoulos I, Korbjuhn P, Stein H. Epstein-Barr virus in B-cell non Hodgkin's lymphomas : unexpected infection patterns and different infection incidence in low and high grade types. *J Pathol* 1995 ; 175 : 263-71.
- [9] D'amore F, Johanson P, Houmand A, Weisenburger DD, Mortensen LS. Epstein-Barr virus genome in non-Hodgkin's lymphomas occurring in immunocompetent patients : highest prevalence in nonlymphoblastic T-cell lymphoma and correlation with a poor prognosis. *Blood* 1996 ; 87 : 1045-55.
- [10] De Bruin PC, Jiwa NM, van der Valk, van Heerde P, Gordijn R, Ossenkuppele GJ et al. Detection of Epstein-Barr virus nucleic acid sequences and protein in nodal T-cell lymphomas : relation between latent membrane protein-1 positivity and clinical course. *Histopathology* 1993 ; 23 : 509-18.
- [11] Chan JK, Yip TT, Tsang WY, Poon YF, Wong CS, Ma VW. Specific association of Epstein-Barr virus with lymphoepithelial carcinoma among tumors and tumorlike lesions of the salivary gland. *Arch Pathol Lab Med* 1994 ; 118 : 994-7.
- [12] Butler AE, Colby TV, Weiss L, Lombard C. Lymphoepithelioma-like carcinoma of the lung. *Am J Surg Pathol* 1989 ; 13 : 632-9.
- [13] Shibata D, Tokunaga M, Uemura Y, Sato E, Tanaka S, Weiss LM. Association of Epstein-Barr virus with undifferentiated gastric carcinomas with intense lymphoid infiltration. *Am J Pathol* 1991 ; 139 : 469-74.
- [14] Yuen ST, Chung LP, Leung SY, Luk IS, Chan SY, Ho J. *In situ* detection of Epstein-Barr virus in gastric and colorectal adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol* 1994 ; 18 : 1158-63.
- [15] Ott G, Kirchner T, Muller-Hermelink HK. Monoclonal Epstein-Barr virus genomes but lack of EBV-related protein expression in different types of gastric carcinoma. *Histopathology* 1994 ; 25 : 323-9.
- [16] Wang D, Liebowitz D, Kieff E. An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* 1985 ; 43 : 831-40.
- [17] Fahraeus R, Rymo L, Rhim JS, Klein G. Morphological transformation of human keratinocytes expressing the LMP gene of Epstein-Barr virus. *Nature* 1990 ; 345 : 447-9.
- [18] Correa P, O'conor GT. Epidemiologic patterns of Hodgkin's disease. *Int J Cancer* 1971 ; 8 : 192-201.
- [19] Glaser L, Lin RJ, Stewart SL, Ambinder RF, Jarrett RF, Brousset P et al. A. Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease : epidemiologic characteristics in international data. *Int J Cancer* 1997 ; 70 : 375-82.
- [20] Khan G, Norton AJ, Slavin G. Epstein-Barr virus in Hodgkin disease relation to age and subtype. *Cancer* 1993 ; 71 : 3124-9.
- [21] Herbst H, Niedobitek G, Kneba M, Hummel M, Finn T, Anagnostopoulos I et al. High incidence of Epstein-Barr virus genomes in Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 1990 ; 137 : 13-8.
- [22] Tomita Y, Ohsawa M, Kanno H, Hashimoto M, Ohnishi A, Nakanishi H et al. Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease patients in Japan. *Cancer* 1996 ; 77 : 186-92.
- [23] Delsol G, Brousset P, Chittal S, Rigal-Huguet F. Correlation of the expression of Epstein-Barr virus-latent membrane protein and *in situ* Hybridization with biotinylated Bam HI-W probes in Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 1992 ; 140 : 247-53.
- [24] Chang KL, Albujar PF, Chen YY, Johnson RM, Weiss LM. High prevalence of Epstein-Barr virus in the Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease occurring in Peru. *Blood* 1993 ; 81 : 496-501.
- [25] Ambinder RF, Browning PJ, Lorenzana I, Leventhal BG, Cosenza H, Mann RB et al. Epstein-Barr virus and childhood Hodgkin's disease in Honduras and the United States. *Blood* 1993 ; 81 : 462-7.
- [26] Zarate-Osorno A, Roman LN, Kingma DW, Menezes-Garcia A, Jaffe ES. Hodgkin's disease in Mexico. Prevalence of Epstein-Barr virus sequences and correlations with histologic subtype. *Cancer* 1995 ; 75 : 1360-6.
- [27] Dirnhofer S, Angeles-Angeles A, Ortiz-Hidalgo C, Reyes E, Gredler E, Krugmann J et al. High prevalence of a 30-base pair deletion in the Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 1 gene and of strain type B EBV in Mexican classical Hodgkin's disease and reactive lymphoid tissue. *Human pathology* 1999 ; 30 : 781-7.
- [28] Jarrett RF, Gallagher A, Jones DB, Alexander FE, Krajewski AS, Kelsey A et al. Detection of Epstein-Barr virus genomes in Hodgkin's disease : relation to age. *J Clin Pathol* 1991 ; 44 : 844-8.
- [29] Anagnostopoulos I, Hummel M. Epstein-Barr virus in tumours. *Histopathology* 1996 ; 29 : 297-315.
- [30] Armstrong AA, Alexander FE, Cartwright R, Angus B, Krajewski AS, Wright DH et al. Epstein-Barr virus and

- Hodgkin's disease : further evidence for the three disease hypothesis. *Leukemia* 1998 ; 12 : 1272-6.
- [31] Murray PG, Billingham LJ, Hassen HT, Flavell JR, Nelson PN, Scott K *et al.* Effect of Epstein-Barr virus infection on response to chemotherapy and survival in Hodgkin's disease. *Blood* 1999 ; 94 : 442-7.
- [32] Morente MM, Piris MA, Abaira V, Acevedo A, Aguilera B, Bellas C *et al.* Adverse clinical outcome in Hodgkin's disease is associated with loss of retinoblastoma protein expression, high Ki67 proliferation index, and absence of Epstein-Barr virus-latent membrane protein 1 expression. *Blood* 1997 ; 90 : 2429-36.
- [33] Naresh KN, Johnson J, Srinivas V, Soman CS, Saikia T, Advani SH *et al.* Epstein-Barr virus association in classical Hodgkin's disease provides survival advantage to patients and correlates with high expression of proliferation markers in Reed-Sternberg cells. *Ann Oncol* 2000 ; 11 : 91-6.
- [34] Glavina-Durdov M, Jakic-Razumovic J, Capkun V, Murray P. Assessment of the prognostic impact of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 expression in Hodgkin's disease. *Br J Cancer* 2001 ; 84 : 1227-34.
- [35] Clarke CA, Glaser SL, Dorfman RF, Mann R, Diguiseppe JA, Prehn A *et al.* Epstein-Barr Virus and survival after Hodgkin disease in a population-based series of women. *Cancer* 2001 ; 91 : 1579-87.
- [36] Herbst H, Raff T, Stein H. Phenotypic modulation of Hodgkin and Reed-Sternberg with Epstein-Barr virus. *J Pathol* 1996 ; 179 : 54-9.
- [37] Armstrong AA, Gallagher A, Krajewski AS, Jones DB, Wilkins BS, Onions DE *et al.* The expression of the EBV Latent Membrane Protein (LMP1) is independent of CD23 and bcl2 in Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Histopathology* 1992 ; 21 : 72-3.
- [38] Sandvej KB, Hamilton-Dutoit SJ, Pallesen G. Influence of Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 on the expression of CD23 antigen, ICAM-1 and LFA-3 in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. A morphometric analysis. *Leuk Lymphoma* 1993 ; 9 : 95-101.