

# Thèse de Doctorat

Marina ILLIAQUER

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université de Nantes  
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

**École doctorale :** *Biologie-Santé*

**Discipline :** *Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie*

**Spécialité :** *Biologie des organismes*

**Unité de recherche :** *EA 4271 « Immunovirologie et polymorphisme génétique »*

**Soutenue le** 26 octobre 2015

**Thèse N° :**

## Interactions entre l'Herpesvirus Humain de type 6 et cellules effectrices de l'immunité

### JURY

Rapporteurs : Noël MILPIED, PU-PH, Service d'Hématologie et thérapie cellulaire, CHU de Bordeaux, Pessac  
Agnès GAUTHERET-DEJEAN, PU-PH, Service de Virologie, CHU La Pitié Salpêtrière-Charles Foix, Paris

Examineurs : Sylvie RANGER-ROGEZ, PU-PH, Service de Virologie, CHU Dupuytren, Limoges

Directeur de Thèse : Berthe-Marie IMBERT-MARCILLE, PU-PH, Service de Virologie, CHU Hôtel-Dieu, Nantes

Co-directeurs de Thèse : Patrice CHEVALLIER, PU-PH, Service d'Hématologie Clinique, CHU Hôtel-Dieu, Nantes  
Céline BRESSOLLETTE-BODIN, MCU-PH, Service de Virologie, CHU Hôtel-Dieu, Nantes

**A tous les membres du jury, qu'ils trouvent ici l'expression de mes sincères remerciements,**

**Madame le Professeur Berthe-Marie Imbert-Marcille,**

Pour avoir encadré mes travaux avec beaucoup de bonne humeur et d'enthousiasme, pour m'avoir accompagnée et soutenue lors de mes premiers pas « in english » dans différents congrès. Sois assurée de mon respect et de mon amitié,

**Madame le Docteur Céline Bressollette-Bodin,**

Pour m'avoir soutenue et conseillée dans mes débuts en tant qu'enseignante à la Faculté de Médecine, pour avoir encadré mes travaux, pour nos échanges toujours enrichissants (et comme on se l'est toujours dit : « CVLF » !). Partager ton bureau ces dernières années a été un réel plaisir. Sois assurée de mon admiration et de mon amitié,

**Monsieur le Professeur Patrice Chevallier,**

Pour avoir encadré mon travail avec un enthousiasme sans faille. Merci pour tes conseils et ton soutien. Ca a été un réel plaisir de collaborer avec toi et le personnel de ton service d'Hématologie Clinique, trouve ici l'expression de mon amitié,

**Madame le Professeur Agnès Gautheret-Dejean,**

Pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail et pour avoir accepté d'en être le rapporteur. Soyez assurée de ma profonde reconnaissance.

**Monsieur le Professeur Noël Milpied,**

Pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de ce travail. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

**Madame le Professeur Sylvie Rangez-Rogez,**

Pour avoir accepté de participer à ce jury. Soyez assurée de ma profonde gratitude.

J'adresse tous mes remerciements à l'ensemble des biologistes du laboratoire de Virologie du CHU de Nantes, pour la solidarité et le dynamisme qui règnent dans cette équipe. Mille mercis pour le soutien moral et logistique notamment au cours de cette dernière année et des remerciements plus particuliers à

Marianne,

Pour ta sagacité, tes encouragements et ta bonne humeur, ça a été un vrai plaisir de travailler à tes côtés,

Virginie,

Pour nos discussions toujours intéressantes, tes conseils et ta rigueur,

Babeth,

Pour ta bonne humeur et ton soutien,

Anne,

Pour t'être rendue disponible et me permettre de rédiger ma thèse les mois passés,

Je suis très heureuse d'avoir travaillé au sein de cette équipe, cela a constitué une expérience très enrichissante aussi bien sur le plan professionnel qu'humain.

J'adresse tous mes remerciements à l'ensemble du personnel du laboratoire de Virologie, pour leur soutien et leur bonne humeur et des remerciements particuliers à

Audrey,

Avec qui j'ai partagé beaucoup d'évènements personnels et professionnels au cours de ces dernières années. Merci pour ton dynamisme, ton humour et ta disponibilité (et pour les corrections orthographiques que tu as pris le temps d'apporter à mon manuscrit!), trouve ici l'expression de mon amitié sincère,

Bernard,

Pour m'avoir fait partager tes connaissances dans le domaine de la biologie moléculaire.

## *Remerciements*

---

A Nelly Robillard et à son équipe du laboratoire d'Hématologie pour leur accueil, leur aide et leurs conseils au cours de la réalisation de mes expériences de cytométrie en flux,

A Cécile Peltier pour son aide précieuse, sa bonne humeur et sa disponibilité. C'est un plaisir de travailler avec des personnes comme toi,

A Michèle Heslan de l'UMR 1064, pour son aide précieuse lors de la réalisation des expériences de tris cellulaires et sa gentillesse,

A monsieur le Docteur David Boutolleau pour son soutien et les remarques pertinentes qu'il a apporté au cours de mon travail de thèse,

Aux membres de l'équipe de l'EFS de l'EA4271 pour leurs conseils avisés prodigués pendant nos séances hebdomadaires du Journal Club et leur aide technique,

A Dorian McIlroy pour son soutien, ses conseils et son aide à la préparation de mes présentations en anglais,

A Amandine pour avoir relu de manière critique mon travail et pour son soutien,

A Anne-Gaëlle pour son aide à la mise en page de mon mémoire de thèse,

A ma mère et mon frère pour la confiance inébranlable qu'ils placent en moi et pour leur soutien indéfectible,

A Jérôme et Bidoo pour leur amitié si précieuse et leur soutien inconditionnel,

A Fabien,

A mes amis,

Merci.

Liste des abréviations.....	4
Liste des figures.....	7
Liste des tableaux.....	9
INTRODUCTION.....	10
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	13
1. Découverte des herpesvirus humains de type 6 et classification.....	14
2. Propriétés structurales et biologiques.....	17
2.1. Structure des virions.....	17
2.2. Organisation du génome viral et variabilité génétique.....	18
2.2.1. Organisation du génome.....	18
2.2.2. Variabilité inter-espèces.....	22
2.2.3. Variabilité intra-espèce.....	23
2.3. Capside, tégument et enveloppe.....	24
2.4. Cycle de multiplication de l'HHV-6.....	25
2.4.1. Entrée d'HHV-6 dans les cellules cibles.....	25
2.4.2. Réplication du génome viral.....	27
2.4.3. Morphogénèse et excrétion des particules virales.....	28
2.5. Tropismes cellulaire, tissulaire et spécificité d'hôte de l'HHV-6.....	29
2.6. Latence et réactivation.....	32
2.7. Intégration chromosomique de l'HHV-6.....	33
3. Epidémiologie.....	36
4. Pathogénèse de l'infection humaine.....	38
4.1. Histoire naturelle de l'infection HHV-6.....	38
4.2. Réponse immunitaire dirigée contre l'HHV-6.....	39
4.2.1. Réponse innée anti HHV-6.....	39
4.2.2. Réponse immunitaire adaptative humorale.....	40
4.2.3. Réponse immunitaire adaptative cellulaire T.....	40
4.3. Mécanismes d'échappement de l'HHV-6 au système immunitaire.....	45
4.3.1. Infection des cellules du système immunitaire.....	45
4.3.2. Modulation de la sensibilité à l'apoptose.....	48
4.3.3. Modulation des réponses cytokinique et chimiokinique.....	48
4.3.4. Analogues viraux de chimiokines et de récepteurs de chimiokines.....	50
4.3.5. Modulation de l'expression des molécules de surface cellulaire.....	51
5. Clinique.....	55
5.1. Primo-infection.....	55
5.2. Infections chez le sujet immunocompétent.....	56
5.2.1. Atteintes du système nerveux central.....	56

5.2.2. Pathologies autres .....	57
5.3. Infections chez le sujet immunodéprimé .....	58
5.3.1. Infections à HHV-6 après transplantation d'organe solide .....	59
5.3.2. Infections à HHV-6 après greffe de CSH.....	62
5.3.2.1. Fréquence, cinétiques et facteurs de risque des infections à HHV-6.....	62
5.3.2.2. Manifestations cliniques et biologiques chez les patients .....	66
6. Méthodes de diagnostic virologique .....	72
6.1. Diagnostic direct .....	72
6.1.1. Isolement viral en culture cellulaire .....	72
6.1.2. Détection des antigènes viraux .....	73
6.1.3. Détection et quantification du génome viral.....	73
6.1.4. Détection des transcrits viraux .....	74
6.2. Diagnostic indirect .....	75
6.3. Problématiques liées au diagnostic des infections à HHV-6 .....	76
7. Traitement antiviraux .....	77
7.1. Indications de traitement des infections à HHV-6.....	77
7.2. Traitements disponibles .....	78
PARTIE EXPERIMENTALE.....	83
1. Etude de l'impact de la nature du greffon sur la survenue d'infections virales précoces et la reconstitution immune après greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques chez l'adulte.....	87
1.1. Introduction.....	87
1.2. Patients et méthodes.....	88
1.3. Résultats.....	92
1.4. Discussion.....	107
2. Détection du génome d'HHV-6 sur différentes sous-populations leucocytaires au cours de la reconstitution immune après greffe de sang placentaire.....	114
2.1. Matériels et méthodes .....	114
2.2. Résultats.....	117
2.3. Discussion.....	120
3. Etude de la fréquence des infections à HHV-6 à distance de l'allogreffe de CSH.....	123
3.1. Caractéristiques des patients inclus .....	123
3.2. Résultats.....	125
3.3. Discussion.....	126
4. Etude de l'interaction entre l'HHV-6B et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) .....	129
4.1. Introduction.....	129

4.2. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) humaines : rappels bibliographiques.....	130
4.2.1. Ontogénie.....	130
4.2.2. Caractéristiques phénotypiques des pDCs.....	132
4.2.3. Fonctions des pDCs dans l'organisme.....	133
4.2.4. pDCs et infections virales <i>in vivo</i> .....	137
4.2.5. Interactions pDCs et herpesvirus <i>in vitro</i> .....	138
4.3. Matériels et méthodes .....	141
4.4. Résultats.....	144
4.5. Discussion et perspectives .....	155
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	160
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	164
ANNEXE 1 : PUBLICATIONS ISSUES DU TRAVAIL DE THESE.....	193
ANNEXE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES .....	228
Annexe 2A : Protocoles d'extraction des acides nucléiques.....	229
Annexe 2B : Quantification des acides nucléiques .....	232
Annexe 2C : Culture MS-5 et pDCs.....	238
Annexe 2D : Immunofluorescence indirecte .....	241
Annexe 2E : Culture cellules MT4 .....	242
Annexe 2F : Culture HHV-6 (souche HST) .....	244

AAV :	adenovirus-associated virus
AcMo :	anticorps monoclonal
ACV :	aciclovir
ADN :	acide désoxyribonucléique
ADV :	adénovirus
ARN :	acide ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
ATP :	adénosine triphosphate
BKPyV :	polyomavirus BK
bp :	paire de base
CBMC :	cord blood mononuclear cells (cellules mononucléées du sang placentaire)
CC :	chimiokine
CCL :	CC-motif ligand
CCR :	CC- motif receptor
CD :	cluster de différenciation
cDC :	conventionnal dendritic cell (cellule dendritique conventionnelle)
CDV :	cidofovir
ciHHV-6 :	chromosome intergated-HHV-6
CMF :	cytométrie en flux
CMVH :	cytomégalovirus humain
CSH :	cellules souches hématopoïétiques
CSP :	cellules souches périphériques
CTL :	cytotoxic T lymphocyte (lymphocyte T cytotoxique)
CV :	charge virale
CXCR :	CXC-motif receptor
DC :	cellule dendritique
DR :	direct repeat (séquence répétée direct)
DRESS :	drug rash with eosinophilia and systemic symptoms
E :	early (précoce)
EBV :	Epstein Barr virus
ECP :	effet cytopathogène
ELISA :	enzyme linked-immunosorbent assay
FSC :	forward scatter
G-CSF :	granulocyte colony-stimulating factor
GCV :	ganciclovir
GM-CSF :	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
gp :	glycoprotéine
GVHD:	graft-versus-host-disease (maladie du greffon contre l'hôte)



HBVL :	human B lymphotropic virus
HHV-6 :	herpesvirus humain de type 6
HHV-7 :	herpesvirus humain de type 7
HHV-8 :	herpesvirus humain de type 8
HLA :	human leucocyte antigen ou molécule du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité)
HSV :	herpesvirus simplex
ICTV :	International Committee on Taxonomy of Viruses
IE :	immediate early (très précoce)
IFI :	immunofluorescence indirecte
IFN :	interféron
Ig :	immunoglobuline
IL :	interleukine
IRF :	interferon-regulatory factor
ISGE :	IFN-stimulated gene
IV :	intraveineux
kb :	kilobases
L :	late (tardif)
LCR :	liquide céphalo-rachidien
LT :	latency-associated transcript
LTR :	long terminal repeat
MBP :	major basic protein
MCP-1 :	monocyte chemoattractant protein-1
MFI :	moyenne de fluorescence
MIP :	macrophage inflammatory protein
MyD88 :	myeloid differentiation primary-response gene 88
NFAT :	nuclear factor of activated T cells
NK :	natural killer
OAS :	oligoadénylate synthetase
ORF :	open reading frame (cadre ouvert de lecture)
PAMP :	pathogen-associated molecular pattern
pDC :	cellule dendritique plasmacytoïde (plasmacytoid dendritic cell)
PBMC :	cellules mononucléées du sang périphérique (peripheral blood mononuclear cells)
PFA :	acide phosphonormique (ou foscarnet)
PCR :	polymerase chain reaction
PHA :	phyto-hémagglutinine
PKR :	protéine kinase dépendante de l'ARN db

PTLD :	post-transplant lymphoproliferative disorder
RANTES :	regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (CCL5)
RNase L:	ribonuclease L
RT-PCR :	reverse transcriptase PCR
SAL :	sérum anti-lymphocytaire
SSC :	side scatter
SEP :	sclérose en plaque
SNC :	système nerveux central
SP :	sang placentaire
ST :	sang total
TCR :	T cell receptor (récepteur des lymphocytes T)
Th :	T helper
TLR :	toll-like receptor
TNF :	tumor necrosis factor
TRS :	telomeric repeat sequence (séquence télomérique répétées)
U :	gène situé dans la région unique
VIH :	virus de l'immunodéficience humaine
VZV :	virus de la varicelle et du zona

Figure 1 : Arbre phylogénique de la famille des Herpesviridae (Moore et al., 1996).....	15
Figure 2 : Structure du virion d'HHV-6. ....	17
Figure 3. Organisation du génome de l'HHV-6 (souche HST) (d'après Isegawa et al., 1999).....	20
Figure 4. Interactions entre les complexes glycoprotéiques d'HHV-6 et ses récepteurs cellulaires (Mori, 2009). ....	26
Figure 5. Représentation schématique du cycle de réplication de l'HHV-6 (d'après De Bolle et al., 2005).....	29
Figure 6. ECP de l'HHV6 sur cellules mononucléées sanguines périphérique .....	30
Figure 7. Hybridation in situ en fluorescence sur des PMBC provenant d'un patient avec un HHV-6 intégré dans les télomères du chromosome 22 (Arbuckle & Medveczky, 2011). ....	34
Figure 8. Modèle hypothétique du mécanisme d'intégration du génome de l'HHV-6 dans les régions télomériques des chromosomes humains avec la contribution probable de la protéine U94 dans les événements de recombinaison (Morissette & Flamand, 2010). ....	35
Figure 9. Séroprévalence de l'HHV-6 en fonction de l'âge (d'après Clark et al., 1993).....	37
Figure 10. Cibles de la réponse immunitaire adaptative anti HHV-6 (d'après Becerra et al., 2014)..	43
Figure 11. Mécanismes d'immunomodulation communs et spécifiques d'HHV-6A et HHV-6B (adapté de Dagna et al., 2013). ....	54
Figure 12. Eruption maculo-papuleuse au cours de la roséole infantile (Prober, 2005).....	56
Figure 13. Isolement de l'HHV-6 en culture cellulaire. ....	72
Figure 14. Structure chimique des molécules antivirales actives sur l'HHV-6. ....	79
Figure 15. Métabolisme et mécanismes d'action des antiviraux anti HHV-6.....	80
Figure 16. Principe de l'immunothérapie adoptive (Becerra et al., 2014).....	82
Figure 17. Probabilité d'être indemne d'infection à HHV-6 en fonction du type de greffe estimée par la méthode de Kaplan-Meier. ....	98
Figure 18. Pourcentage de patients positifs pour l'HHV-6 au cours du temps et en fonction du type de greffe.....	99
Figure 19. Pourcentage de patients présentant une réactivation à BKPyV au cours du temps et en fonction du type de greffe. ....	100
Figure 20. Pourcentage de patients positifs pour l'EBV au cours du temps et en fonction du type de greffe.....	102
Figure 21. Pourcentage de patients positifs pour le CMVH au cours du temps et en fonction du type de greffe.....	103
Figure 22. Comparaison de la reconstitution immune au cours du temps post-transplantation en fonction du type de greffe. ....	106
Figure 23. Comparaison des taux de lymphocytes à distance de l'allogreffe entre deux types de sources de CSH. ....	126
Figure 24. Développement des pDCs à partir du précurseur hématopoïétique commun aux pDCs et au cDCs (d'après Reizis et al., 2011).....	132

Figure 25. Phénotype des pDCs humaines.....	133
Figure 26. Reconnaissance et sécrétion d'IFN de type I après reconnaissance des motifs viraux par les pDCs et les mDCs (d'après Barchet et al., 2005).....	134
Figure 27. Activation de la réponse IFN suite à la reconnaissance des PAMPs viraux (d'après Bowie & Unterholzner, 2008).....	135
Figure 28. Fonctions des pDCs (d'après Swiecki & Collona, 2015).....	137
Figure 29. Exemple d'analyses réalisées en CMF pour caractériser les pDCs avant et après tri)....	145
Figure 30. Niveaux d'expression (% moyen) du CD80, du CD86 et du CD83 à la surface des pDCs à H0, H24 et H72 post-infection en fonction des différentes conditions de culture.....	148
Figure 31. Profils d'expression (MFI moyenne) du CD46 et des molécules de HLA de classe I et de classe II à la surface des pDCs à H0, H24 et H72 post-infection en fonction des différentes conditions de culture.....	149
Figure 32. Phénotype des pDCs issues de la lignée GEN2.2.....	150
Figure 33. Résultats des RT-PCR U90 et U100 réalisées à partir de cellules MT4 infectées par une souche d'HHV-6B (souche HST) dans les mêmes conditions que celles utilisées pour l'infection des pDCs.....	152
Figure 34. Cinétiques d'infections des pDCs GEN2.2 par une souche d'HHV-6B (n=4).....	153
Figure 35. Mesure de la sécrétion d'IFN- $\alpha$ par les pDCs au cours du temps post-infection et en fonction des conditions de culture.....	154

<i>Tableau 1 : Classification des herpesvirus humains en trois sous-familles en fonction de leurs caractéristiques</i> .....	16
<i>Tableau 2. Principaux gènes des variants HHV-6A et HHV-6B, leurs produits et leurs homologues sur le génome du CMVH (d'après Isegawa et al., 1999 et Dominguez et al., 1999).</i> .....	21
<i>Tableau 3. Epitopes T CD4+ et CD8+ identifiés pour l'HHV-6 (Becerra et al., 2014).</i> .....	44
<i>Tableau 4. Etudes prospectives sur l'incidence des réactivations HHV-6 après transplantation d'organe solide.</i> .....	61
<i>Tableau 5. Facteurs de risque de la survenue d'infections à HHV-6 au cours de la période post-greffe de CSH.</i> .....	65
<i>Tableau 6. Etudes sur l'incidence des réactivations HHV-6 après greffe de CSH</i> .....	70
<i>Tableau 7. Méthodes de diagnostic virologique des infections à HHV-6A et HHV-6B (adapté de Agut et al., 2015).</i> .....	76
<i>Tableau 8. Caractéristiques des patients allogreffés inclus dans l'étude.</i> .....	93
<i>Tableau 9. Comparaison des évènements liés à la greffe entre les 2 groupes de patients.</i> .....	95
<i>Tableau 10. Comparaison des données virologiques entre les deux groupes de patients.</i> .....	97
<i>Tableau 11. Caractéristiques des AcM utilisés pour le marquage des PBMCS avant tri cellulaire...</i>	115
<i>Tableau 12. Puretés des fractions cellulaires recueillies après tris pour les échantillons de PBMCSs PO/GH J150 et HA/CL J112.</i> .....	117
<i>Tableau 13. PBMCs sélectionnés pour les tris et résultats des PCR HHV-6 réalisées sur le sang total et sur les différentes sous-populations leucocytaires</i> .....	119
<i>Tableau 14. Caractéristiques des patients de la cohorte</i> .....	124
<i>Tableau 15. Marqueurs spécifiques permettant la distinction entre pDCs et cDCs chez l'homme</i> ....	133
<i>Tableau 16. Combinaisons d'anticorps utilisées pour les analyses en CMF pour l'étude phénotypique des pDCs à H0 et aux différents temps post-infections.</i> .....	143
<i>Tableau 17. Rendements et pureté des pDCs recueillies après tris.</i> .....	144
<i>Tableau 18. Résultats des RT-PCR U90 et U100 réalisées à partir des pDCs infectées par une souche d'HHV-6B (souche HST) en fonction du temps et des conditions de cultures</i> .....	151

---

**INTRODUCTION**

---

Les Herpesvirus humains de type 6 (HHV-6), HHV-6A et HHV-6B, sont des virus à ADN découverts dans les années 80. Les connaissances acquises depuis leur identification ont conduit récemment à les classer en deux espèces virales distinctes sur des critères épidémiologiques, phénotypiques, génotypiques et sur le plan de leur pouvoir pathogène. L'HHV-6B est responsable de l'exanthème subit en primo-infection et d'infections persistantes le plus souvent bénignes chez l'immunocompétent. Il exprime son pouvoir pathogène en cas de défaillance du système immunitaire, notamment dans le contexte des allogreffes de cellules souches hématopoïétiques (CSH). Ce cadre constitue un terrain privilégié pour le développement et l'étude des infections à HHV-6B, même si son pouvoir pathogène exact, reste débattu. En outre, il a été évoqué une contribution des HHV-6 dans le développement de maladies chroniques inflammatoires ou cancéreuses.

L'évolution des connaissances dans les domaines de la biologie cellulaire et de l'immunologie a permis d'identifier un grand nombre de mécanismes moléculaires d'interactions virus/cellules. Ainsi, certains des mécanismes responsables de la latence et de la réactivation virale et certains aspects complexes des interactions entre HHV-6A et HHV-6B avec les différents acteurs de la réponse immunitaire antivirale ont été caractérisés. Il reste cependant de nombreuses inconnues et la pathogénèse virale n'est pas encore clairement établie.

L'équipe EA4271 « Immunovirologie et polymorphisme génétique » mène une activité de recherche d'interface entre la clinique et la virologie fondamentale concernant l'étude des infections virales persistantes dues à des virus à ADN, en particulier chez les sujets immunodéprimés. Un des axes de recherche porte sur l'étude des infections virales chez les sujets allogreffés de CSH et plus particulièrement sur l'étude des infections à l'HHV-6 dans ce contexte. Le propos de ce travail de thèse s'intègre dans cette thématique.

La première partie de ce mémoire expose de façon concise les principaux aspects de la biologie, de l'histoire naturelle de l'infection, de la clinique, du diagnostic, et du traitement des infections à HHV-6, en insistant particulièrement sur les connaissances les plus récentes en matière d'interactions HHV-6/cellules hôtes.

Dans la partie expérimentale seront d'abord exposés les résultats d'études cliniques visant à mieux définir les caractéristiques et conséquences cliniques et/ou biologiques des infections à HHV-6 après allogreffe de CSH. Nos travaux se sont particulièrement focalisés sur les greffes de CSH provenant de sang placentaire, qui sont devenues ces 10 dernières années une

alternative de plus en plus utilisée chez les patients éligibles à l'allogreffe n'ayant pas de donneur vivant HLA (*human leucocyte antigens*) compatible. Une deuxième partie présentera un aspect expérimental concernant l'évaluation des conséquences d'une infection par une souche d'HHV-6B sur les cellules dendritiques plasmacytoïdes, qui jouent un rôle important dans l'histoire naturelle des infections virales.



---

**RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES**

## 1. Découverte des herpesvirus humains de type 6 et classification

L'Herpesvirus humain de type 6 (HHV-6) a été découvert fortuitement en 1986 par isolement, en culture primaire, de cellules périphériques sanguines mononucléées (PBMCs : *peripheral blood mononuclear cells*) prélevées chez 6 patients atteints de syndromes lymphoprolifératifs, un d'entre eux étant également infecté par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Salahuddin *et al.*, 1986). L'effet cytopathique (ECP) observé en culture primaire consistait en des cellules ballonnées et réfringentes, exprimant des antigènes viraux mis en évidence par immunofluorescence indirecte (IFI). Cet ECP était à nouveau observé après inoculation du surnageant issu des cultures primaires à des lymphocytes humains stimulés par de la phytohémagglutinine (PHA). Des études en microscopie électronique ont permis de confirmer la production de virus et ont mis en évidence la présence de particules virales ayant une morphologie typique des herpesvirus. Elles étaient constituées d'une capside à symétrie icosaédrique contenant une molécule d'acide désoxyribonucléique (ADN), entourée d'un tégument et d'une enveloppe, le tout formant un virion d'un diamètre de l'ordre de 200 nm (Biberfeld *et al.*, 1987). Néanmoins, le génome viral n'était pas reconnu par les sondes nucléotidiques de cinq herpesvirus humains connus alors, et une sonde spécifique de ce virus ne permettait pas de détecter les autres herpesvirus (Josephs *et al.*, 1986). Ainsi, plus de vingt ans après la découverte du virus Epstein Barr (EBV), un nouvel herpesvirus humain était identifié. Ce virus, initialement nommé HBLV (*Human B lymphotropic virus*) du fait d'un hypothétique tropisme pour les lymphocytes B, s'est rapidement avéré être un virus T-lymphotrope et acquit son nom définitif : HHV-6 (Ablashi *et al.*, 1987). En se basant sur ses propriétés biologiques (spécificité d'hôte, type de cellules infectées, durée du cycle de réplication, siège de latence) et sur les analyses génomiques, l'HHV-6 fut finalement classé selon les recommandations du Comité International de Taxonomie des Virus (ICTV : *International Committee on Taxonomy of Viruses*) au sein de l'ordre des *Herpesvirales*, dans la famille des *Herpesviridae* et la sous-famille des *Betaherpesvirinae*. Cette sous-famille, qui comprend également le Cytomegalovirus humain (CMVH) et l'herpesvirus humain de type 7 (HHV-7, un herpesvirus proche de l'HHV-6 découvert en 1990 (Frenkel *et al.*, 1990)), regroupe des virus de spécificité d'hôte étroite, se répliquant sur un nombre très restreint de systèmes cellulaires et caractérisés par leur cycle infectieux long (Tableau 1). Les HHV-6 et -7 appartiennent au genre *Roseolovirus* (Figure 1).

Suite à l'isolement initial de la souche GS (Salahuddin *et al.*, 1986), d'autres souches d'HHV-6 désignées U1102 (Downing *et al.*, 1987), Z29 (Lopez *et al.*, 1988), SIE (Agut *et al.*,

1988)ou encore HST (Yamanishi *et al.*, 1988)ont été isolées chez des patients infectés par le VIH, principalement d'origine africaine, mais également chez des patients japonais atteints d'exanthème subit.Jusqu'en 2011, les souches virales étaient réparties,au sein de l'espèce HHV-6, en deux variants (variants A et B), définis sur la base de caractères épidémiologiques, immunologiques et moléculaires propres à chacun(Ablashi *et al.*, 1991). Cependant, les différentes études menées sur l'HHV-6ces vingt dernières années,ont mis en évidence des divergences de plus en plus marquées entre les deux variants concernant leurs propriétés phénotypiques, génotypiques et épidémiologiquesmais égalementconcernant leurs pouvoirs pathogènes, ce qui a conduitl'ICTVà revoir la classification des HHV-6en 2011, et a recommandé de considérer l'HHV-6A et l'HHV-6B comme deux espèces distinctesau sein du genre *Roselovirus*(Ablashi *et al.*, 2014).

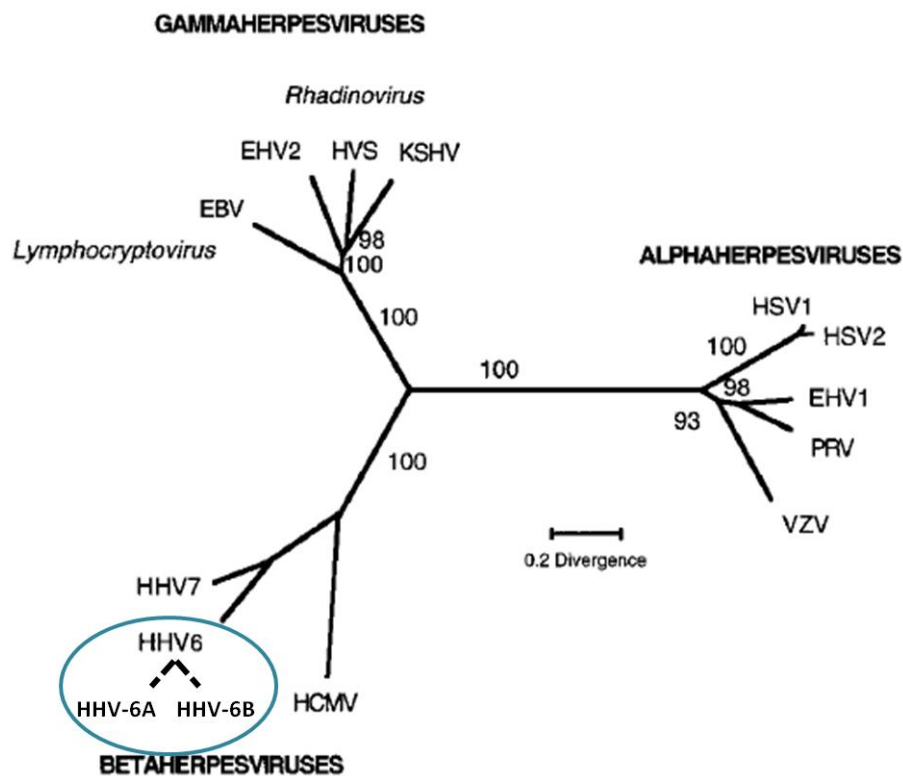


Figure 1 :Arbre phylogénique de la famille des *Herpesviridae*(Moore *et al.*, 1996).

**Tableau 1 : Classification des herpesvirus humains en trois sous-familles en fonction de leurs caractéristiques biologiques.**

Sous-famille	$\alpha$ -Herpesvirinae			$\beta$ -Herpesvirinae		$\gamma$ -Herpesvirinae	
Représentants	HSV-1 HSV-2	VZV	CMV	HHV-6A HHV-6B	HHV-7	EBV	HHV-8
Tropisme <i>in vivo</i>	Peau  Muqueuses  Système nerveux	Peau  Muqueuses  Système nerveux	Monocytes/ macrophages  Cellules épithéliales  Cellules endothéliales  Cellules musculaires lisses	Cellules épithéliales  Ly T  Monocytes/ macrophages	Cellules épithéliales  Ly T  Monocytes	Cellules épithéliales  Ly B  Ly B mémoires	Ly B  Cellules fusiformes du SK
Sites de latence	Ganglions nerveux sensitifs	Ganglions nerveux sensitifs	Monocytes  Progéniteurs hématopoïétiques  Cellules épithéliales  Cellules endothéliales?	Monocytes  Progéniteurs hématopoïétiques  Glandes salivaires	Cellules sanguines  Glandes salivaires	Ly B mémoires	Ly B
Cultures <i>in vitro</i>	FH  Lignées épithéliales	FH	FH	Ly T	Ly T CD4+	Ly B	Ly B transformés
Durée du cycle	Cycle court (< 48 heures)			Cycle long (> 48 heures)		Variable	
Primo-infection	Asymptomatique	Varicelle	Asymptomatique	Asymptomatique	Asymptomatique	Asymptomatique	?
	Atteinte orale, oculaire ou  génitale		Fièvre  Syndrome mononucléosique	Fièvre  Exanthème subit (HHV-6B)	Fièvre  Exanthème subit	Fièvre  MNI	
Récurrences Infections opportunistes	Herpès labiale, oculaire ou génital	Zona	Forme graves chez sujets ID: pneumopathie, colite, rétinite...	Formes graves chez sujets ID: encéphalite, pneumopathie...	?	Proliférations lymphoïdes  Leucoplasie chevelue de la langue	Maladie de Castelman  Sarcome de Kaposi
Pouvoir transformant	Non	Non	Non	Non	Non	Oui	Oui

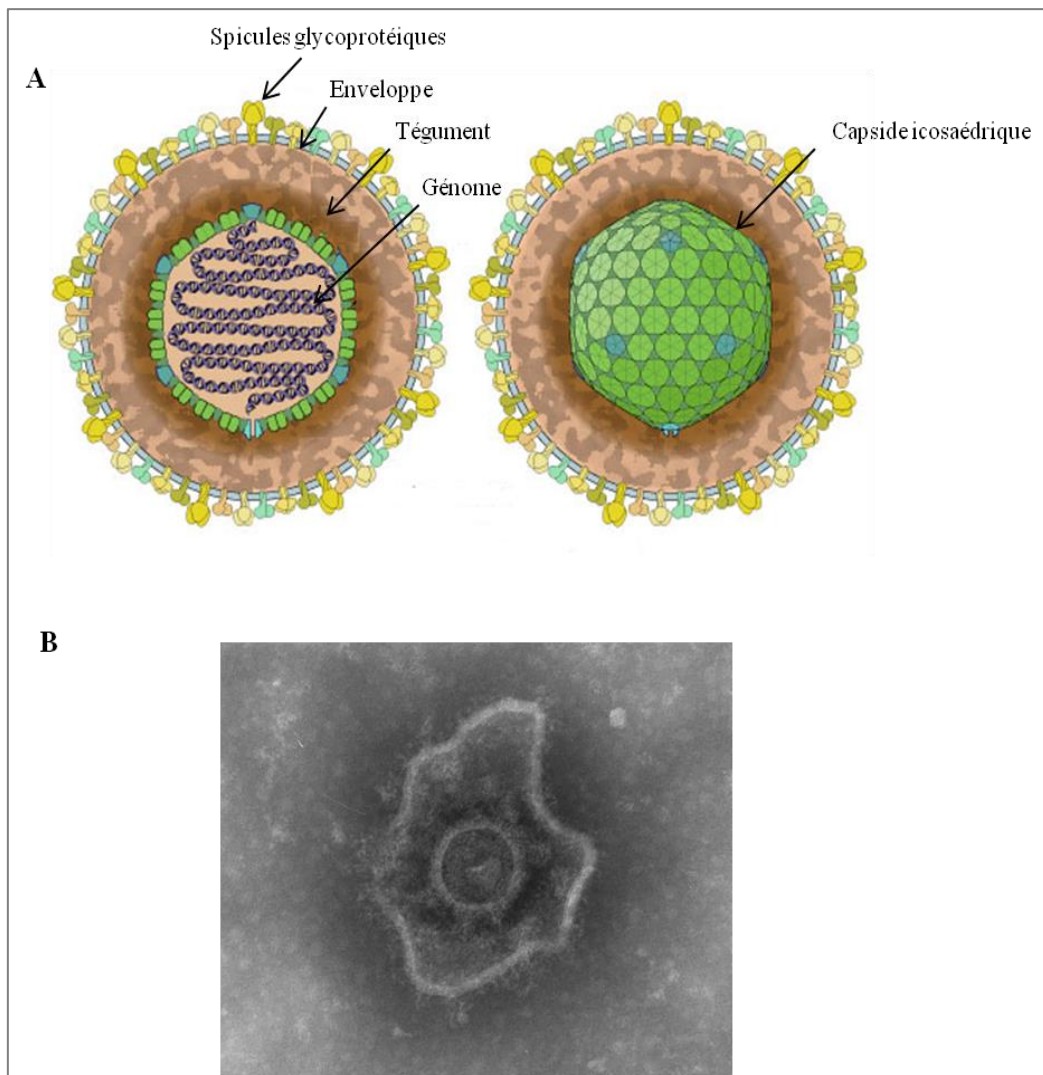
HSV-1 et HSV-2: virus *herpes simplex* 1 et 2; VZV: virus de la varicelle et du zona; HCMV: cytomégalo virus humain; HHV-6A et HHV-6B; herpesvirus humains 6 A et B; HHV-7: herpesvirus humain 7; EBV: virus Epstein-Barr; HHV-8: herpesvirus humain 8

FH: fibroblastes embryonnaires humains; ID: immunodéprimés; Ly: lymphocytes; MNI: mononucléose infectieuse; SK: sarcome de Kaposi; SNC: système nerveux central

## 2. Propriétés structurales et biologiques

### 2.1. Structure des virions

L'HHV-6 partage la structure typique des membres de la famille des *Herpesviridae*. Le génome viral est protégé par une capside, elle-même entourée d'un tégument et d'une enveloppe d'origine cellulaire dans laquelle sont ancrées les glycoprotéines virales (Figure 2). Le virion a un diamètre compris entre 160 et 200 nm (Zhou *et al.*, 2006).



**Figure 2 : Structure du virion d'HHV-6.**A :structure schématique (adapté de [viralzone.expasy.org](http://viralzone.expasy.org). B : aspect en microscopie électronique d'une particule virale d'HHV-6 (x100000)(Cliché : Dr Claudine Mollat, Laboratoire de Virologie, CHU de Nantes).

## 2.2. Organisation du génome viral et variabilité génétique

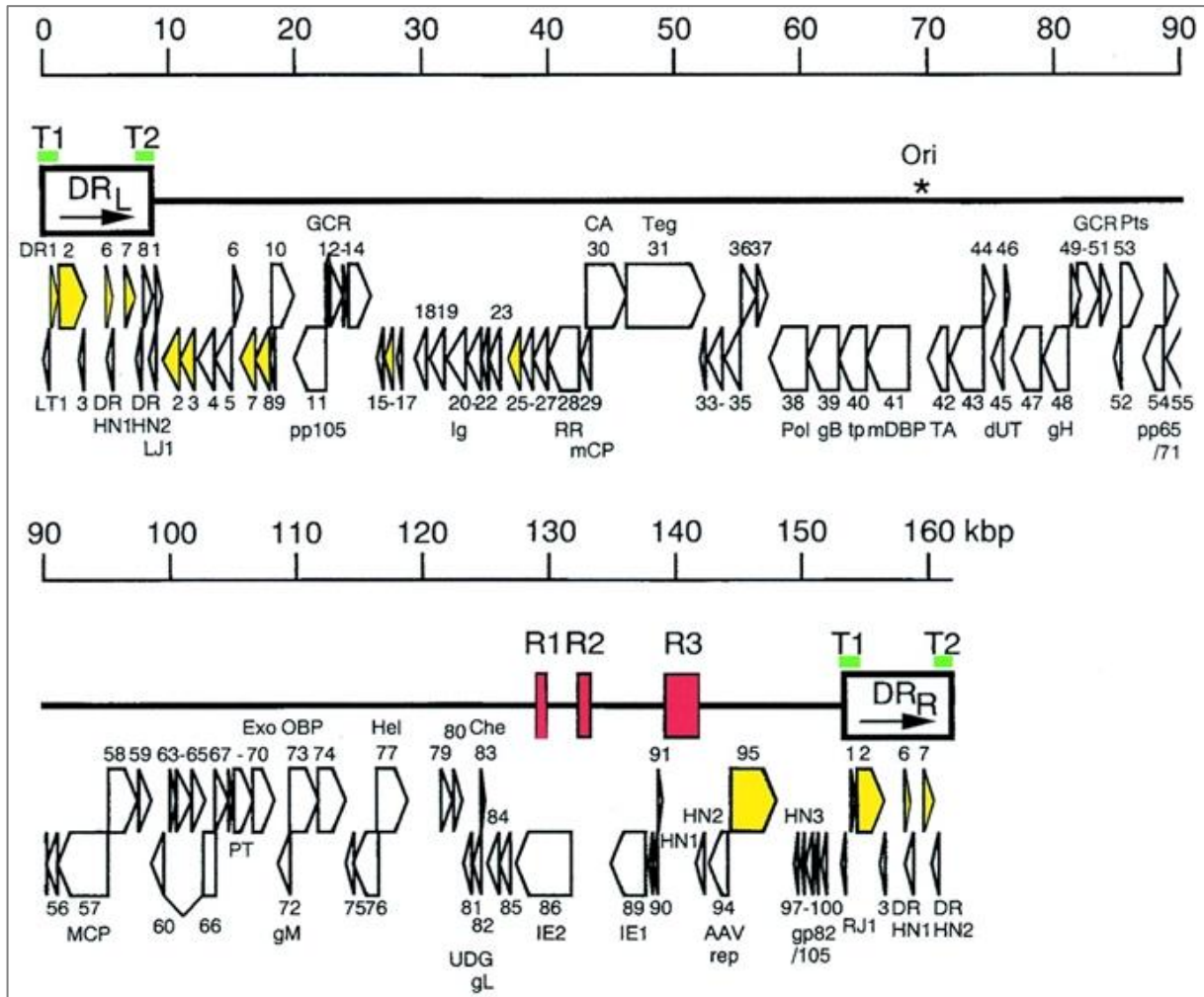
### 2.2.1. Organisation du génome

Le génome d'HHV-6 est constitué d'une molécule linéaire d'ADN bicaténaire. Il mesure entre 160 et 162 kb et comprend un segment central unique (U) de 143 à 144 kb encadré par deux régions terminales constituées de séquences directement répétées de 8 à 9 kb (DR<sub>L</sub> et DR<sub>R</sub> respectivement à gauche et à droite du génome viral) ayant la même orientation et interrompu par trois régions répétées R1, R2 et R3, au niveau du locus des gènes très précoces IE-A (*immediate early-A*). (Dominguez *et al.*, 1999; Gompels *et al.*, 1995; Isegawa *et al.*, 1999)(Figure 3). Les régions courtes uniques DR<sub>L</sub> et DR<sub>R</sub> sont flanquées par les sites de clivage et d'emballage *pac-1* et *pac-2*, conservés chez l'ensemble des herpesvirus. Adjacent au site *pac-2*, on retrouve des séquences hexanucléotidiques GGGTTA répétées en tandem, identiques aux séquences télomériques répétées (TRS : *telomere repeat sequence*) des chromosomes des vertébrés. A l'autre extrémité, on retrouve des motifs imparfaits, décrits comme het(GGGTTA)<sub>n</sub> collés au site *pac-1* (De Bolle *et al.*, 2005). Ces séquences répétées joueraient un rôle dans la réplication de l'ADN viral et le maintien des génomes viraux sous forme d'épisomes au sein de la cellule hôte en phase de latence (Gompels & Macaulay, 1995). Par ailleurs, plusieurs études ont montré qu'elles jouaient un rôle majeur dans le processus d'intégration du génome viral au chromosome humain (Arbuckle & Medveczky, 2011)(voir paragraphe 2.7).

L'organisation de la région U présente des similitudes avec celle de la région longue unique de CMVH et est colinéaire à celle d'HHV-7 (Clark, 2000). Le génome de l'HHV-6B contient 119 cadres ouverts de lecture codés par 97 gènes (ORF : *open reading frame*), celui de l'HHV-6A n'en contient que 110. Les ORFs situés dans le segment unique sont notés U1 à U100 de gauche à droite de la séquence et ceux situés dans les régions répétées sont désignés DR1 à DR7. Les 9 ORFs uniques à l'HHV-6B sont dénommés B1 à B9. Les gènes codant pour les protéines de structure ou pour les enzymes impliquées dans la réplication virale sont localisés au centre de la région U et sont organisés en 7 blocs numérotés I-VII, composés chacun de deux à huit ORFs conservés chez tous les herpesvirus. De plus, le génome de l'HHV-6 contient un cluster de gènes, situé à gauche des 7 blocs, spécifiques de la sous-famille des *β-herpesvirinae*, homologues des gènes de la famille US22 du CMVH qui codent pour des protéines transactivatrices ainsi que plusieurs gènes spécifiques au genre *Roseolovirus*. Ils sont situés à droite et à gauche des blocs I-VII, et comprennent notamment

U20, U21, U23,U24, U100. Enfin, plusieurs gènes tels que U83 et U94 sont uniques à l'HHV-6(Agut *et al.*, 2015; De Bolle *et al.*, 2005; Dockrell, 2003).

Le Tableau 2 présente les principaux gènes des HHV-6.



**Figure 3. Organisation du génome de l'HHV-6 (souche HST) (d'après Isegawa *et al.*, 1999).** La région unique U est représentée par un trait épais. Les régions répétées terminale (DRL ET DRR) intermédiaires (R1, R2 et R3) sont représentées par des rectangles respectivement noirs et rouges. Les séquences télomériques (T1 et T2) sont figurées à chaque extrémité des régions DR par des traits verts. L'origine de répliation (Ori) est indiquée par un astérisque. Les différentes régions codantes sont représentées par des flèches claires et numérotées DR1, DR2, DR3, DR6, DR7, DR8, DRHN1, et DRHN2 dans les régions DR et HN1, HN2, HN3, et U1 à U100 (excluant U78, U88, U92, U93, et U96) dans la région U. Les gènes homologues de la famille des gènes US22 du CMVH sont colorés en jaune. Abréviations : GCR, récepteur couplé à une protéine G ; Ig, superfamille des immunoglobulines ; RR, grande sous-unité de la ribonucléotide réductase ; mCP, protéine mineure de capsid ; CA, protéine d'assemblage de capsid ; Teg, protéine de tégument ; Pol, ADN polymérase ; gB, glycoprotéine B ; tp, protéine de transport ; mDBP, protéine majeure liant l'ADN monocaténaire ; TA, transactivateur conservé des herpesvirus ; dUT, dUTPase ; gH, glycoprotéine H ; Pts, protéase/protéine d'assemblage ; pp65/71, phosphoprotéine 65/71K ; MCP, protéine majeure de capsid ; PT, phosphotransférase ; Exo, exonucléase ; OBP, protéine liant l'origine ; Hel, hélicase ; UDG, uracil-ADN glycosylase ; Che, chimiokine ; gL, glycoprotéine L ; AAV rep, homologue de la protéine de répliation de l' « Adeno-Associated virus »



**Tableau 2. Principaux gènes des variants HHV-6A et HHV-6B, leurs produits et leurs homologues sur le génome du CMVH(d'après Isegawa *et al.*, 1999 et Dominguez *et al.*, 1999).**

ORF d'HHV-6	Classe	Fonctions/Caractéristiques	CMVH
DR1	$\alpha$	Gène de la famille US22 du CMVH	
DR6	$\alpha$	Transactivateur/ Gène de la famille US22 du CMVH	
U2	$\alpha$	Gène de la famille US22 du CMVH	UL23
U3	$\alpha$	Transactivateur/ Gène de la famille US22 du CMVH	UL24
U7	$\beta$	Gène de la famille US22 du CMVH	UL27/UL28
U11	$\gamma$	Protéine structurale :p101k (B) et p100(A)	UL32
U12	$\gamma$	Recepteur couplé aux protéines G	UL33
U14		Protéine antigénique du tégument	UL25
U15		Gène de la famille UL25/UL35 du CMVH	
U16	$\alpha$	Gène de la famille US22 du CMVH, IE-B	UL36
U17	$\alpha$	IE-B	
U18	$\beta$	IE-B, homologue à la glycoprotéine IE du CMVH	UL37/EX3
U19	$\beta$	IE-B	UL38
U20-U23	$\gamma$	Glycoprotéines	
U25		Gène de la famille US22 du CMVH	UL43
U27	$\beta$	Facteur de processivité de l'ADN	UL44
U28		Grande sous-unité de la ribonucléotide réductase	UL45
U29	$\gamma$	Protéine mineure de capsid	UL46
U30	$\gamma$	Assemblage capsid et maturation de l'ADN	UL47
U31	$\gamma$	Protéine large du tégument	UL48
U33		Protéine de capsid	UL49
U34		Phosphoprotéine associée à l'enveloppe	UL50
U35/U36		Enzymes d'empaquetage d l'ADN	UL51/UL52
U37		Phosphoprotéine putative	UL53
U38	$\beta$	ADN polymérase	UL54
U39	$\gamma$	Glycoprotéine gB	UL55
U40		Transport/assemblage de la capsid	UL56
U41	$\beta$	Protéine majeure de liaison à l'ADN	UL57
U42	$\beta$	Transactivateur conservé chez les herpesvirus	UL69
U43		Complexe hélicase/primare	UL70
U46	$\gamma$	Protéine d'enveloppe	UL73
U47	$\gamma$	Glycoprotéine O (gO)	UL74
U48	$\gamma$	Glycoprotéine H (gH)	UL75
U49	$\gamma$	Protéine de fusion	UL76
U50	$\gamma$	Enzyme d'empaquetage d l'ADN	UL77
U51	$\beta$	Recepteur couplé aux protéines G	UL78
U53	$\gamma$	Protéase	UL80
U54	$\gamma$	Transactivateur protéine du tégument	UL82/UL83
U56	$\gamma$	Protéines de capsid	UL85
U57	$\gamma$	Protéine majeure de la capsid	UL86
U64		Enzyme d'empaquetage d l'ADN	UL93
U65	$\gamma$	Protéines du tégument	UL94
U66		Terminase	UL89
U69	$\beta$	Phosphotransférase/ kinase du GCV	UL97
U70	$\beta$	Alcaline exonucléase (Exo)	UL98
U71		Protéine du virion	
U72	$\gamma$	Glycoprotéine M (gM)	UL100
U73	$\alpha$ ou $\beta$	Origin binding protein (OBP)	
U74	$\beta$	Complexe protéique hélicase-primase	UL102
U76		Enzyme d'empaquetage d l'ADN,	UL104
U77		Complexe hélicase/primare	UL105
U79	$\beta$	Réplication de l'ADN	UL112/UL113
U81	$\beta$	Uracyl-ADN glycosylase	UL114
U82	$\gamma$	Glycoprotéine L	UL115
U83		Analogue de chimiokine	
U85	$\alpha$	Glycoprotéine	
U86-U90	$\alpha$	Transactivateur locus IE-A	UL122
U91	$\alpha$ ou $\beta$	Transactivateur locus IE-A	
U94	$\alpha$	Homologue <i>rep</i> du parvovirus/transactivateur	
U95	$\alpha$	Gène de la famille US22 du CMVH	
U97-U100	$\gamma$	Complexe glycoprotéique gp 82-105	

### 2.2.2. Variabilité inter-espèces

Les souches d'HHV-6 sont classées, depuis 2011, en deux espèces, HHV-6A et HHV-6B, sur la base de données épidémiologiques, biologiques, immunologiques et moléculaires (Ablashi *et al.*, 2014). Les deux espèces présentent des profils de restriction enzymatique différents (Ablashi *et al.*, 1991; Aubin *et al.*, 1991; Schirmer *et al.*, 1991). L'identité de séquence nucléotidique entre les génomes des deux espèces est globalement de 90%.

Les régions les plus conservées du génome, de la région centrale jusqu'à l'extrémité du génome, montrent de 95 à 98% d'identité. Cette identité diminue jusqu'à 31% pour les gènes très précoces (U86 à U95, sauf U94), au niveau nucléotidique (Dominguez *et al.*, 1999; Isegawa *et al.*, 1999). Le degré élevé de divergence des séquences retrouvé au niveau de la région très précoce IE (63% d'homologie de séquence) suggère que cette région puisse être responsable de certaines différences biologiques entre les deux espèces (Dominguez *et al.*, 1999).

Un autre déterminant de la différence phénotypique entre les espèces HHV-6A et HHV-6B est la région U97-U100, qui code pour le complexe de glycoprotéines d'enveloppe gp82-gp105. L'identité de séquence de cette région entre les deux espèces est de seulement 72.1%. Un exon de ce gène, désigné HN3, est trouvé seulement chez HHV-6B (Isegawa *et al.*, 1999). Les transcrits épissés sont traduits en protéines différentes, contenant des épitopes de neutralisation spécifiques de chacune des espèces (Pfeiffer *et al.*, 1993, 1995). La divergence dans cette région pourrait contribuer aux différences de tropisme cellulaire entre les deux espèces d'HHV-6. En effet, le produit du gène U100 80-kDa (protéine gQ), de l'HHV-6A se lie au récepteur CD46 (Mori, 2009) tandis que celui de l'HHV-6B se lie au récepteur CD134 (Tang *et al.*, 2013).

D'autres régions divergentes sont LT1, DR2, DR7, DR8, LJ1, RJ1, U1 et U47 (Isegawa *et al.*, 1999). À part la protéine codée par DR7 (pDR7), on ne connaît pas encore les fonctions biologiques des autres protéines. Cependant, il est plausible que la haute divergence dans la séquence d'acides aminés explique des différences biologiques et pathogènes entre les deux espèces HHV-6A et HHV-6B (De Bolle *et al.*, 2005).

L'analyse des polymorphismes de séquences dans les gènes gB et gH du HHV-6, permet de distinguer chacune des espèces par la mise en évidence de signatures génétiques spécifiques à l'HHV-6B non retrouvées pour l'HHV-6A (Achour *et al.*, 2008).

Enfin, l'analyse des séquences U83 a montré une divergence d'environ 15% entre les espèces d'HHV-6 (Sjahril *et al.*, 2009). Le gène U83 est unique pour l'HHV-6 et code pour une chimiokine qui active des voies de signalisation intracellulaire en se liant à plusieurs récepteurs de chimiokines. Ces divergences pourraient conduire à des différences biologiques pertinentes: pU83 de l'HHV-6B semble se lier uniquement à CCR2 (Lüttichau *et al.*, 2003), alors que pU83 de l'HHV-6A se lie avec une haute affinité à CCR1, CCR4, CCR5, CCR6 et CCR8 et active les voies de signalisation correspondantes (Catusse *et al.*, 2009; Dewin *et al.*, 2006).

### 2.2.3. Variabilité intra-espèce

Au sein de chaque espèce, il existe un certain degré d'hétérogénéité entre les différents isolats d'HHV-6, variable en fonction du gène ou de la région étudiés. Le plus haut degré de variabilité inter-souche d'HHV-6B se situe à l'extrémité gauche des deux régions DR (De Bolle *et al.*, 2005).

Bien que la région IE-A montre un haut niveau de variation de séquence entre les deux espèces d'HHV-6, elle est fortement conservée parmi les isolats d'HHV-6B obtenus à partir d'échantillons cliniques ou après passages *in vitro*. Il faut noter que la variabilité des séquences IE-A d'HHV-6B permet de définir deux sous-groupes distincts, représentés par les souches de référence Z29 et HST (Stanton *et al.*, 2003).

Cependant, la congruence des sous-groupes n'est pas parfaite, par exemple deux souches Z29 et HST sont dans le même sous-groupe lorsque la séquence gH est analysée, mais dans des sous-groupes différents lorsque la séquence gB est considérée (Achour *et al.*, 2008). L'étude du polymorphisme du gène gB a permis de mettre en évidence des recombinaisons génétiques entre isolats d'HHV-6B, suggérant que ce phénomène pourrait contribuer à la diversité génétique intra-espèces (Agut *et al.*, 2015).

Un point particulier de divergence concerne le nombre de TRS dans la région DR, et est indépendant de la classification en espèces : il varie considérablement en fonction des souches étudiées mais reste stable pour un isolat donné, même après plusieurs passages en culture cellulaire ; cette empreinte peut être utilisée pour suivre une souche spécifiquement au cours d'une infection (Achour *et al.*, 2009).

### 2.3. Capside, tégument et enveloppe

La structure de la capsid e de l'HHV-6, de nature protéique, est commune à tous les herpesvirus. Elle a une forme régulière, globalement sphérique, et possède une symétrie icosaédrique. Elle est composée de 162 capsomères, 150 hexons et 12 pentons, et son diamètre mesure entre 90 et 100 nm. La protéine majeure de capsid e MCP (*major capsid protein*), codée par l'ORF U57, forme les unités de structure de la capsid e qui se groupent en capsomères formés de 5 ou 6 unités. La capsid e comprend également la protéine mineure de capsid e mCP (*minor capsid protein*), codée par U29, qui permet l'ancrage de l'ADN génomique, une protéase virale et des protéines d'échafaudage (scaffold proteins)(Brown & Newcomb, 2011).

Le tégument, ou matrice, est une structure fibrillaire située entre la capsid e et l'enveloppe. Il est souvent réparti de manière asymétrique autour de la capsid e et sa taille peut varier en fonction de la localisation des virus dans la cellule hôte(Torrisi *et al.*, 1999). Il est composé de plusieurs protéines généralement phosphorylées et très immunogènes, comme la phosphoprotéine codée par le gène U11 (p100K pour l'HHV-6A et p101K pour l'HHV-6B) (Neipel *et al.*, 1992).

L'enveloppe virale, élément indispensable à l'infectiosité des herpesvirus et responsable de leur fragilité, est une bicouche lipidique dérivée de la membrane cellulaire. Elle présente un aspect tri-lamellaire typique et est hérissée de spicules de petite taille,formées par l'assemblage en nombre variable de glycoprotéines virales. Le génome de l'HHV-6 code plusieurs glycoprotéines : gB (U39), gO (U47), gH (U48), gM (U72), gL (U82) et gQ (U97-U100), glycoprotéine unique au genre *Roseolovirus*. Ces glycoprotéines vont pouvoir s'assembler entre elles pour former des complexes tri- ou tétramériques qui vont aller interagir avec les récepteurs cellulaires (*voir paragraphe2.4.1*). Elles sont indispensables au bon déroulement de l'infection virale : elles interviennent dans les étapes de fixation membranaire, de pénétration du virion dans les cellules, dans la transmission de cellule à cellule, dans la fusion des cellules infectées et participent au processus d'enveloppement et de maturation des particules virales nouvellement formées(Mori, 2009)

La structure de la particule virale est illustrée Figure 2.

## 2.4. Cycle de multiplication de l'HHV-6

Les interactions de l'HHV-6 avec sa cellule hôte suivent le schéma classique des *Herpesviridae*, avec l'expression séquentielle et ordonnée, dans les cellules permissives, de trois groupes principaux de gènes : gènes très précoces ou IE (*immediate early*), gènes précoces ou E (*early*) et gènes tardifs ou L (*late*). Schématiquement, l'expression des gènes E est régulée par des produits des gènes IE, et conduit à la production de protéines impliquées dans le métabolisme et la réplication de l'ADN viral. Les derniers gènes exprimés sont les gènes L, qui codent pour les protéines et les glycoprotéines structurales. Ce cycle lytique aboutit à la production de nouveaux virions en 72h. Dans certains types cellulaires, le virus entre en état de latence. Les différentes étapes du cycle de multiplication d'HHV-6 sont illustrées par la Figure 5.

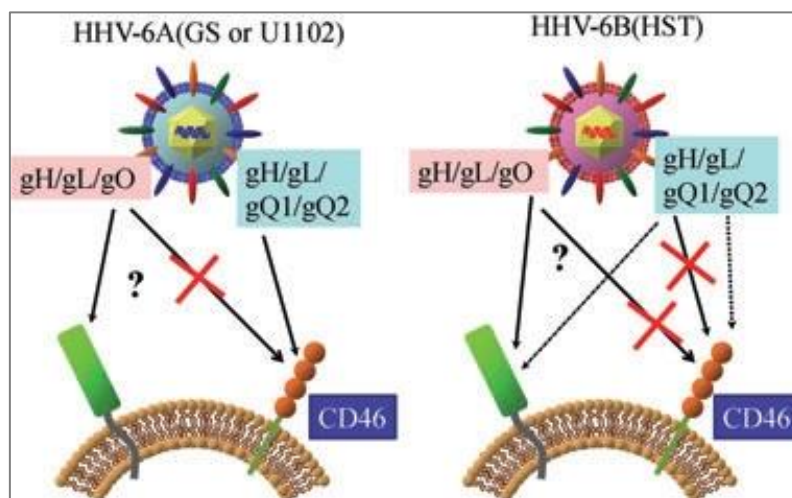
### 2.4.1. Entrée d'HHV-6 dans les cellules cibles

#### Récepteurs cellulaire et ligands d'HHV-6

La pénétration d'un virus dans une cellule cible est conditionnée par l'existence de récepteur(s) spécifique(s) à la surface cellulaire. Jusqu'en 2013, le seul récepteur connu pour les deux espèces d'HHV-6 était le CD46 (ou MCP pour Membrane Cofactor Protein), protéine présente à la surface de toutes les cellules nucléées et impliquée dans la régulation du complément (Santoro *et al.*, 1999). Néanmoins, l'existence d'un autre récepteur, ou d'un co-récepteur, a été rapidement envisagée dans la mesure où certaines lignées cellulaires exprimant le CD46 n'étaient pas permissives à l'infection par l'HHV-6 (Santoro *et al.*, 1999). De plus, il a par la suite été montré que le complexe gH/gL/gQ1/gQ2 de l'HHV-6A se liait au CD46, alors que celui de l'HHV-6B n'interagissait pas avec cette molécule (Akkapaiboon *et al.*, 2004; Mori *et al.*, 2003, 2004) et que l'utilisation d'anticorps anti-CD46 permettait d'inhiber l'infection par l'HHV-6A mais pas par l'HHV-6B (Mori, 2009). Un autre argument en faveur de l'existence, d'au moins un autre récepteur, était que le complexe gH/gL/gQ1/gQ2 de la souche d'HHV-6BHST, ne constituait pas un ligand pour le CD46 (Mori *et al.*, 2004), alors que celui des souches PL-1 et Z29 se liait à ce récepteur (Pedersen *et al.*, 2006; Santoro *et al.*, 1999). Ceci faisant suggérer que certaines souches au sein d'une même espèce pourraient utiliser des récepteurs différents. Il est intéressant de rappeler ici, que les gènes U97-U100 qui codent pour la glycoprotéine gQ, unique au genre *Roseolovirus*, présentent seulement 72.1% d'identité de séquences entre les 2 espèces. L'existence d'une telle variabilité génétique au niveau de gènes impliqués dans l'interaction

virus/cellule concourt à expliquer, au moins en partie, les différences de tropisme observées entre les deux espèces et entre les souches (voir paragraphe 2.5). C'est ainsi qu'en 2013, l'équipe de Mori, a pu identifier un nouveau récepteur pour l'HHV-6B (Tang *et al.*, 2013) : la molécule CD134 (ou OX-40), qui fait partie de la superfamille des récepteurs du TNF (*tumor necrosis factor*) et qui est exprimée à la surface des lymphocytes T activés (Ishii *et al.*, 2010). Dans cette étude, ils ont montré d'une part que l'expression du CD134 à la surface cellulaire était nécessaire pour permettre l'infection par différentes souches d'HHV-6B (HST, Z29, KYO) mais ne permettait pas l'infection par l'HHV-6A (souche U1102) ; d'autre part que le ligand viral de ce récepteur (dont l'expression est diminuée au cours de l'infection) était le complexe tétramérique gH/gL/gQ1/gQ2, et que gQ1 et gQ2 étaient essentielles pour la liaison au CD134 (Tang *et al.*, 2013).

Par ailleurs, un autre complexe glycoprotéique, le complexe trimérique gH/gL/gO a été mis en évidence chez les deux espèces d'HHV-6 (Mori *et al.*, 2004). Le gène gO est un gène commun aux *β-herpesvirinae*, et pour le CMVH, il a été montré que ce complexe gH/gL/gO était nécessaire pour l'entrée du virus dans les fibroblastes humains. Cependant, il ne semble pas constituer un ligand du CD46 ni pour HHV-6A ni pour HHV-6B et son rôle précis reste encore à caractériser. Là encore, il est intéressant de noter que l'alignement des séquences des produits des gènes gO montre une homologie de séquence en acides aminés de seulement 76.8% entre les deux espèces, cette divergence pourrait constituer un élément d'explication aux différences de tropisme observée entre les deux espèces (Maeki & Mori, 2012).



**Figure 4. Interactions entre les complexes glycoprotéiques d'HHV-6 et ses récepteurs cellulaires (Mori, 2009).**

### Fusion de l'enveloppe virale

Pour l'HHV-6A il a été montré que la glycoprotéine gH se lie aux domaines SCR (*Short Consensus Repeat*) 2, 3 et 4 de la molécule CD46 et que cette interaction était nécessaire à l'étape de fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire (Mori *et al.*, 2002). Cette même étude a également mis en évidence une implication de la glycoprotéine gB dans l'étape de fusion membranaire (Mori *et al.*, 2002). Cependant les fonctions et les mécanismes précis mis en jeu ne sont pas encore clairement établis.

Par ailleurs, il a été démontré toujours par cette équipe japonaise, que la réorganisation de la membrane cellulaire en microdomaines lipidiques (« lipid raft »), consécutive à l'infection par l'HHV-6A, était une étape préalable indispensable à l'entrée du virus dans les cellules (Tang *et al.*, 2008).

Nous pouvons noter ici que l'existence d'un mécanisme d'entrée par endocytose a été évoquée par Cirone *et al.* (Cirone *et al.*, 1992) pour l'HHV-6A, mais ce mode d'entrée n'a plus été rapporté par la suite.

### Décapsidation

La nucléocapside est ensuite transportée à travers le cytoplasme vers les pores nucléaires, probablement via le réseau de microtubules. Le génome d'ADN viral pénètre alors dans le nucléoplasme où il se circularise pour former un épisode. La nucléocapside est alors dégradée par les enzymes lysosomales (Agut *et al.*, 2015; De Bolle *et al.*, 2005).

#### **2.4.2. Réplication du génome viral**

Quand l'ADN pénètre le nucléoplasme, les gènes viraux vont être exprimés de manière séquentielle, en commençant par les gènes de la région IE-A, qui est constituée de deux locus IE-1 et IE-2. Ces gènes vont être transcrits par la machinerie cellulaire en l'absence de synthèse protéique virale *de novo*, et cette étape sera suivie par l'expression des gènes E puis L. La réplication du génome survient après la synthèse des protéines E, qui conduit à la production d'enzymes virales impliquées dans le métabolisme des nucléotides et la synthèse de l'ADN (Figure 5).

L'étape de réplication virale est indépendante de la réplication de l'ADN cellulaire et exige sept facteurs viraux. D'abord, une protéine se liant à l'origine de réplication lytique (codée par le gène U73), qui est absente chez le CMVH et chez les  $\gamma$ -*Herpesvirinae*, se lie à l'origine de réplication lytique (*ori-lyt*) et dénature une partie du génome circularisé. Cette

conformation est maintenue par le complexe hélicase-primase, formé par les produits des gènes U43, U74, et U77. L'ADN simple brin est ensuite stabilisé par la protéine majeure de liaison à l'ADN, MDBP (*Major DNA Binding Protein*, codée par U41) tandis que l'élongation du brin complémentaire est assurée par l'ADN polymérase (pU38), associée au facteur de processivité, ou protéine accessoire (pU27). Quatre autres protéines produites par épissage alternatif des gènes U79-U80 pourraient également être impliquées dans la réplication de l'ADN mais leur rôle reste à définir (De Bolle *et al.*, 2005).

Quand le nouveau brin d'ADN se développe, la structure circulaire de réplication est entaillée pour former un cercle roulant intermédiaire.

#### **2.4.3. Morphogénèse et excrétion des particules virales**

La réplication aboutit à la formation de longs concatémères d'ADN qui sont ensuite clivés et encapsidés grâce aux signaux spécifiques *pac-1* et *pac-2*. Il est intéressant de noter que *l'ori-lyt* et les séquences *pac* sont différents entre les deux espèces d'HHV-6 (De Bolle *et al.*, 2005).

Le génome d'HHV-6 code pour une protéase, pU53 qui semble jouer un rôle dans la maturation des protéines de capsid (Tigue *et al.*, 1996). Suite à leur assemblage dans le noyau, les nucléocapsides ensortent, acquièrent une enveloppe temporaire, dépourvue de glycoprotéines virales, au niveau de la membrane interne de l'espace périnucléaire puis sont dé-enveloppées par fusion au niveau de la membrane externe de cet espace pour être libérées dans le cytoplasme (Maeki & Mori, 2012) où elles s'entourent alors d'un tégument riche en phosphoprotéines virales. L'acquisition de l'enveloppe définitive comportant les glycoprotéines virales a lieu au niveau de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique (Figure 5).

Les virions matures néoformés sont ensuite libérés à l'extérieur de la cellule infectée par exocytose. Le cycle de multiplication complet dure au moins 3 jours, il a un impact sur les fonctions de la cellule-hôte et sa morphologie. Les cellules infectées engagées dans le processus de production virale finissent par mourir d'apoptose ou de nécrose (Agut *et al.*, 2015).



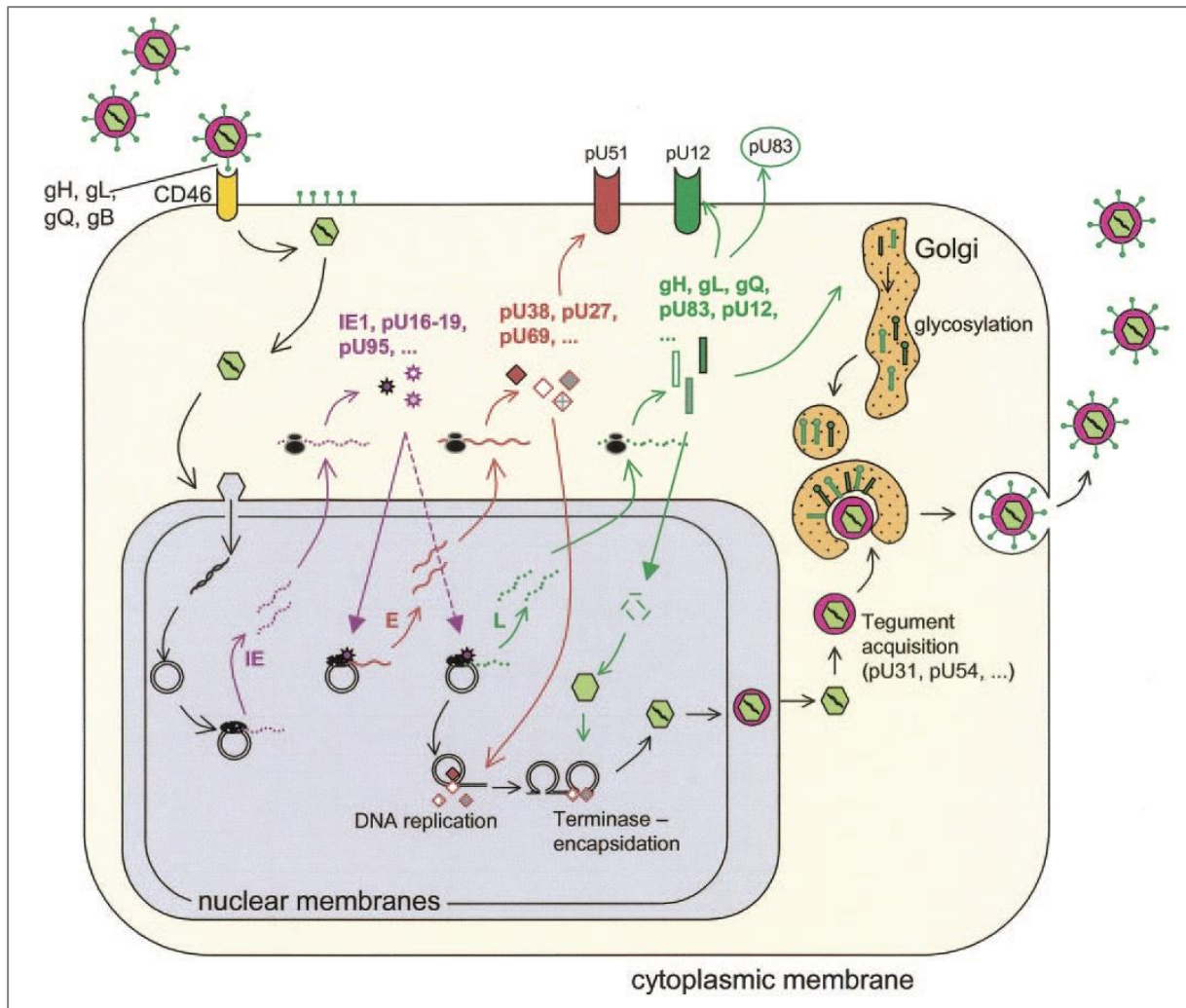


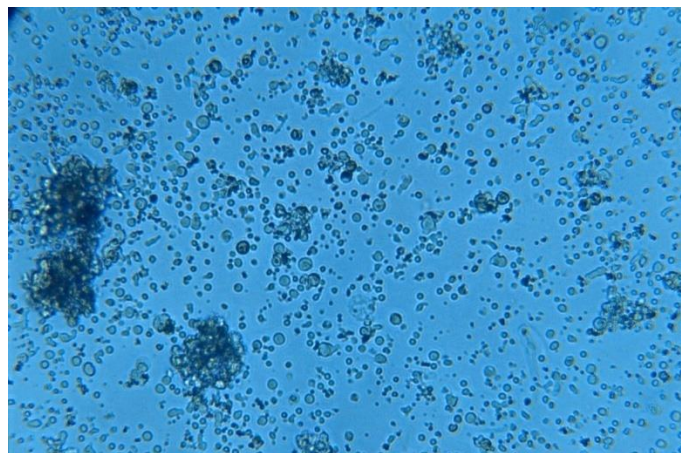
Figure 5. Représentation schématique du cycle de réplication de l'HHV-6 (d'après De Bolle et al., 2005).

## 2.5. Tropismes cellulaire, tissulaire et spécificité d'hôte de l'HHV-6

Bien que l'HHV-6 soit capable d'infecter un large panel de cellules humaines *in vitro*, il est avant tout un virus lymphotrope et les lymphocytes T CD4+ activés constituent le système cellulaire le plus permissif à l'infection par les deux espèces d'HHV-6 (Lusso *et al.*, 1988; Takahashi *et al.*, 1989). Le récepteur, ou tout du moins une partie de celui-ci, utilisé par le virus pour s'ancrer à sa cellule cible diffère en fonction de l'espèce étudiée. En effet, comme dit précédemment, l'HHV-6A utilise comme récepteur la molécule CD46, présente à la surface de toutes les cellules nucléées de l'organisme alors que l'HHV-6B se lie au CD134, molécule exprimée uniquement par les lymphocytes T activés (Santoro *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2013). Le CD46 constitue un récepteur pour d'autres pathogènes humains tels que la souche vaccinale du virus de la rougeole ou bien encore *Neisseria gonorrhoeae*, ce qui lui avalu son

nom « d'aimant à pathogènes » (Cattaneo, 2004). Son caractère ubiquiste est concordant avec le fait qu'un grand nombre de types cellulaires soient permissifs à l'infection par HHV-6, et notamment par HHV-6A. Des expériences *in vitro* ont ainsi montré que l'HHV-6A est capable d'infecter les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Grivel *et al.*, 2003), les cellules NK (*Natural Killer*) (Lusso *et al.*, 1993), les lymphocytes T  $\gamma\delta$  (Lusso *et al.*, 1995) et les cellules mésothéliales (Caselli *et al.*, 2015). L'HHV-6 peut également se répliquer, à des niveaux variables, dans des cellules dendritiques (Asada *et al.*, 1999), des fibroblastes humains (Luka *et al.*, 1990), des cellules épithéliales (Chen *et al.*, 1994), des cellules endothéliales (Caruso *et al.*, 2002), des cellules du foie (Cermelli *et al.*, 1996), des astrocytes (He *et al.*, 1996), des oligodendrocytes et des cellules microgliales (Albright *et al.*, 1998). L'HHV-6A possède en général la capacité d'infecter un plus grand nombre de types cellulaires que l'HHV-6B, ceci constitue une caractéristique phénotypique permettant de distinguer les deux espèces entre elles (Agut *et al.*, 2015).

Des essais de propagation de différentes souches des deux espèces d'HHV-6 dans des cultures de lignées lymphocytaires humaines pré-T ou T telles que MT4, HSB-2, Molt-3, J-Jhan ou encore SupT1 ont été réalisés. Cependant, l'efficacité d'adaptation sur lignée et le niveau de répllication varient considérablement selon les isolats. Ainsi, concernant l'HHV-6A, la souche GS est le plus souvent cultivée sur la lignée HSB2, alors que la souche U1102 l'est sur les cellules J Jhan. Pour l'HHV-6B, la souche Z29 a été adaptée à la culture sur lignée Molt 3, alors que la souche HST est quant à elle cultivée sur la lignée MT4 (Dagna *et al.*, 2006). La répllication d'HHV-6 dans les lymphocytes conduit à l'apparition, au bout d'une semaine environ, d'un ECP sous la forme de cellules ballonnisées et réfringentes (Figure 6).



**Figure 6.** ECP de l'HHV6 sur cellules mononucléées sanguines périphériques (12b) (x100). (Cliché, Laboratoire de Virologie, CHU Nantes)

L'existence d'une telle divergence de tropisme entre HHV-6A et HHV-6B et entre les souches d'une même espèce, ne permet pas de recommander l'utilisation de lignées lymphocytaires telles que celles précédemment citées pour l'isolement du virus en culture primaire. L'utilisation de co-cultures avec des cellules primaires hautement permissives telles que des PBMCs ou des cellules mononucléées de sang placentaire (CBMC pour *cord blood mononuclear cells*) est donc nécessaire.

Comme pour le CMVH, la capacité d'HHV-6 à infecter différents tissus humains *in vivo*, est plus large que ce que les expériences *in vitro* laissaient envisager. L'HHV-6 a en effet été retrouvé dans différents organes et tissus comme le cerveau (Donati *et al.*, 2003), les amygdales (Roush *et al.*, 2001), les glandes salivaires (Fox *et al.*, 1990), les reins (Okuno *et al.*, 1990), le foie (Ishikawa *et al.*, 2002), les cellules endothéliales (Caruso *et al.*, 2002) ainsi que dans les monocytes-macrophages (Kondo *et al.*, 1991). Ce dernier type cellulaire constitue un des sites de latence de l'HHV-6. Deux autres types cellulaires sont reconnus comme étant des sites de latence : les progéniteurs hématopoïétiques médullaires (Andre-Garnier *et al.*, 2004; Gautheret-Dejean *et al.*, 2000; Luppi *et al.*, 1999) et les cellules du système nerveux central (Luppi *et al.*, 1994a, 1995).

Bien que l'infection par l'HHV-6 soit naturellement restreinte aux cellules et tissus humains, des études ont montré qu'il était possible d'infecter de manière expérimentale des cellules simiennes (Lusso *et al.*, 1994) et différentes espèces de singes et de macaques (Reynaud & Horvat, 2013), cependant l'utilisation de tels modèles animaux, rarement disponibles, est limitée. Plus récemment, un modèle de souris transgénique exprimant le CD46 a été développé par une équipe lyonnaise et a permis de démontrer la mise en place d'une réponse inflammatoire chez les animaux infectés et que l'HHV-6A était capable de persister dans le cerveau des souris pendant des mois, suite à l'infection (Reynaud *et al.*, 2014). Le développement de ce dernier modèle constitue un outil intéressant pour étudier les interactions virus-hôte et la physiopathologie de l'infection par l'HHV-6. Enfin, l'infection d'une espèce de petit singe, le ouistiti à toupets blancs (*Callithrix jacchus*) par les deux espèces d'HHV-6 a permis de montrer que les animaux présentaient des troubles neurologiques suite à l'infection par l'HHV-6A, alors que l'infection par l'HHV-6B était asymptomatique (Leibovitch *et al.*, 2013). Ces résultats renforcent l'hypothèse d'un neurotropisme plus important pour l'HHV-6A que pour l'HHV-6B (De Bolle *et al.*, 2005; Mori, 2009). Le ouistiti à toupets blancs semble ainsi être le modèle approprié pour étudier les maladies neurologiques associées à l'HHV-6A (Cermelli & Jacobson, 2000; Challoner *et al.*,

1995; Yao *et al.*, 2010), pour comprendre les mécanismes mis en jeu et ainsi apporter des preuves, notamment de l'implication de l'HHV-6 dans le développement de la sclérose en plaque (SEP) (Reynaud & Horvat, 2013).

## 2.6. Latence et réactivation

Après la survenue de la primo-infection, comme les autres herpesvirus humains, l'HHV-6 va pouvoir entrer dans un état de latence et ainsi persister à vie à dans l'organisme infecté. Par la suite, sous l'action de stimuli cellulaire et/ou viraux ou lors d'une immunosuppression, le virus va être capable de se réactiver, c'est-à-dire de reprendre un cycle de réplication complet aboutissant à la production de particules virales détectables après une phase apparente d'inactivité virale.

La persistance de l'HHV-6 est liée à la fois à un état de latence sans production de particules virales, et à des phénomènes de réplication à bas bruit dans certains compartiments de l'organisme. Ainsi, les glandes salivaires et le tissu cérébral semblent être le siège d'une réplication chronique à bas bruit (Chan *et al.*, 2001; Donati *et al.*, 2003; Fox *et al.*, 1990; Jarrett *et al.*, 1990) alors que les monocytes et les progéniteurs hématopoïétiques sont caractérisés comme étant des sites de latence (Andre-Garnier *et al.*, 2004; Kondo *et al.*, 1991).

Pour les autres herpesvirus, tel que l'herpès simplex virus (HSV), le génome latent prend la forme d'un épisode circulaire clos de manière covalente associé à des protéines cellulaires nucléaires. L'existence de cette forme épisomale n'a pas été formellement démontrée pour l'HHV-6, bien qu'une forme équivalente ait été mise en évidence après infection *in vitro* de lignées cellulaires dérivées d'un cancer du col utérin (Agut *et al.*, 2015).

Le gène U94 codé par les deux espèces d'HHV-6 est fortement exprimé pendant l'infection latente, et semble jouer un rôle majeur dans l'établissement et le maintien de cet état. Il est transcrit à la phase très précoce du cycle et joue un rôle dans la réplication de l'ADN viral et la régulation de l'expression des gènes. Il a été montré que l'acide ribonucléique (ARN) messager de U94 était le seul transcrit détecté dans les PBMCs de patients sains et que l'expression de U94 dans des lymphocytes sensibles à l'infection par HHV-6 limitait le niveau de réplication, suggérant ainsi, un rôle de U94 dans le maintien de la latence virale (Rapp *et al.*, 2000; Rotola *et al.*, 1998). Par ailleurs, pU94 agit en tant que transactivateur en se liant, dans le noyau cellulaire, au facteur de transcription fixé sur la boîte TATA (Mori *et al.*, 2000) et est capable de lier l'ADN simple brin (Dhepakson *et al.*, 2002).

Enfin, pU94 est capable d'activer le promoteur LTR du HIV-1 dans des cultures de fibroblastes et d'inhiber la transformation cellulaire induite par le protéine oncogénique humaine H-ras (De Bolle *et al.*, 2005).

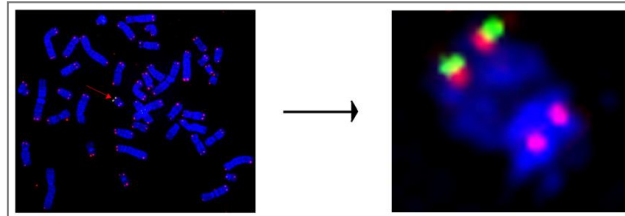
D'autres transcrits associés à la latence (ou LTs pour *latency-associated transcripts*) codés par la région IE-A ont également été décrits par Kondo *et al.* (Kondo *et al.*, 2002a). Ils contiennent des ORFs communs aux transcrits IE1 et IE2 de la phase productive. Cependant, la transcription des LTs a lieu à partir de codons d'initiation différents, et la structure de leur région non-codante en 5' est différente de celle des transcrits de la phase lytique (De Bolle *et al.*, 2005). L'expression abondante de ces LTs d'HHV-6 a été observée juste avant le début de la réactivation virale, qui a été évaluée par la présence d'IE1 et IE2. Ceci a été observé chez des patients après l'instauration d'une thérapie immunosuppressive, et aussi *in vitro*, après la stimulation par le phorbol de cultures hébergeant un HHV-6 latent. Ainsi, l'accumulation des LTs, sous la dépendance probable de stimuli cellulaires et/ou viraux, pourrait agir comme signal positif en induisant la transcription d'IE1 et d'IE2 de la phase productive, et ainsi permettre la réactivation virale et la reprise d'un cycle lytique (Kondo *et al.*, 2003).

## 2.7. Intégration chromosomique de l'HHV-6

Parmi les huit herpèsvirus humains qui infectent l'homme, l'HHV-6 se distingue par sa capacité à persister sous une forme tout à fait originale. Il possède, en effet, une capacité unique à intégrer son génome à celui de la cellule. Cette forme particulière est dénommée ciHHV-6 (*chromosome integrated- HHV-6*). Les premières observations sur le ciHHV-6 ont été publiées au début des années 1990 par l'équipe du docteur Luppi. Ces derniers ont démontré la présence du génome (complet et/ou partiel) de l'HHV-6 dans l'ADN de monocytes fraîchement isolés de sang périphérique de patients leucémiques (Luppi *et al.*, 1993, 1994b; Torelli *et al.*, 1995). Différents travaux ont permis d'estimer la prévalence du ciHHV-6 à environ 1% dans la population mondiale et de montrer que les deux espèces d'HHV-6 sont capables de s'intégrer (Morissette & Flamand, 2010; Pellett *et al.*, 2012). Chez un individu porteur d'un ciHHV-6 le génome viral est présent dans toutes les cellules nucléées du corps, des follicules pileux jusqu'au kératinocytes (Ward *et al.*, 2006).

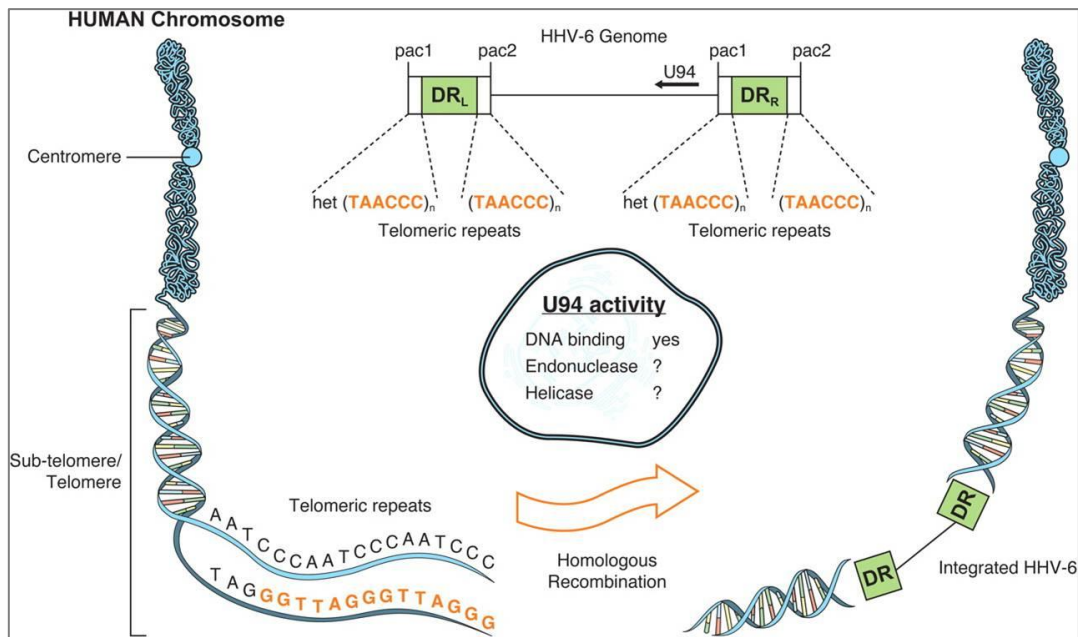
Les séquences hexanucléotidiques (GGGTTA) répétées dans les régions DR du génome viral, similaires aux séquences répétées télomériques humaines, pourraient jouer un rôle dans cette intégration. Il est probable que l'intégration chromosomique de l'HHV-6 se fasse par

recombinaison homologues entre les TRS du génome viral et les TRS présentes sur les chromosomes humains (Morissette & Flamand, 2010). Cette hypothèse est soutenue par le fait que tous les sites d'intégration rapportés se trouvent dans les régions télomériques des chromosomes (Arbuckle & Medveczky, 2011) (Figure 7).



**Figure 7. Hybridation in situ en fluorescence sur des PMBC provenant d'un patient avec un HHV-6 intégré dans les télomères du chromosome 22. Les chromosomes en métaphase sont marqués avec du DAPI (bleu), une sonde spécifique des télomères marquée au cy5-PNA (rouge), et une sonde spécifique de l'HHV-6 conjuguée au FITC (vert) (Arbuckle & Medveczky, 2011).**

L'unique présence des séquences TRS semble insuffisante pour que l'intégration ait lieu, puisqu'aucun cas d'intégration par l'HHV-7, virus proche de l'HHV-6 qui possède également ces séquences GGGTTA répétées, n'a été observé (Hall *et al.*, 2004). Il est donc probable qu'un autre élément unique à HHV-6, soit déterminant pour l'intégration. Or, l'HHV-6 possède une protéine qui lui est propre et qui est codée par l'ORF U94. Cette protéine partage des homologies de séquences avec la protéine REP68/78 du parvovirus AAV-2 (*Adeno-Associated Virus*) humain (Thomson *et al.*, 1991). La protéine REP68/78 d'AAV-2 est une protéine non structurale qui est essentielle pour l'intégration du virus dans le chromosome 19 humain (Linden *et al.*, 1996). La protéine REP68/78 possède au moins trois activités importantes pour l'intégration: une capacité à lier l'ADN, une activité endonucléase et une activité hélicase-ATPase. Différentes études antérieures avaient suggéré que la protéine U94 était capable d'exercer ces 3 fonctions (Dhepakson *et al.*, 2002; Morissette & Flamand, 2010; Thomson *et al.*, 1994). L'étude récemment publiée par l'équipe du Dr Flamand vient d'apporter une preuve pertinente en faveur de cette hypothèse, en démontrant que U94 est capable de se lier préférentiellement à l'ADN télomérique, d'hydrolyser l'ATP (*adénosine triphosphate*) et d'exercer une activité exonucléase/hélicase, confirmant ainsi que cette protéine, unique à l'HHV-6, possède toutes les fonctions essentielles à l'intégration chromosomique (Trempe *et al.*, 2015)



**Figure 8. Modèle hypothétique du mécanisme d'intégration du génome de l'HHV-6 dans les régions télomériques des chromosomes humains avec la contribution probable de la protéine U94 dans les événements de recombinaison (Morissette & Flamand, 2010).**

Il est important de distinguer le concept de transmission verticale (via l'hérédité) de l'intégration chromosomique du virus après une infection à HHV-6. Dans la littérature, il est clair que la transmission du ciHHV-6 des parents aux enfants est possible, puisque les sites d'intégration sont identiques entre les membres d'une même famille (Arbuckle *et al.*, 2010; Mori *et al.*, 2009). L'évènement premier de cette intégration reste obscur. Puisque le ciHHV-6 se transmet des parents aux enfants, on peut penser que le virus est capable d'infecter et d'intégrer les cellules germinales, expliquant l'existence de gamètes contenant du ci-HHV-6. Le ciHHV-6 pourrait également provenir d'une infection et d'une intégration directe du virus dans un spermatozoïde ou un ovule durant la gamétogénèse (Godet *et al.*, 2015). De plus amples travaux sont nécessaires pour mieux comprendre ce phénomène.

Pour certains auteurs, l'intégration d'HHV-6 dans le chromosome ne serait pas une simple erreur sporadique pour le virus, mais plutôt un moyen délibéré de latence virale non conventionnelle (Arbuckle *et al.*, 2010; Daibata *et al.*, 1999). L'idée que le ciHHV-6 puisse se réactiver et causer des infections secondaires est encore très controversée. Plusieurs études récemment publiées ont montré que la production de transcrits viraux, de protéines et même de particules virales transmissibles était détectable suggérant que ce phénomène de réactivation est possible (Arbuckle *et al.*, 2010; Endo *et al.*, 2014; Gravel *et al.*, 2013; Hall *et al.*, 2004).

Les conséquences de la présence du ciHHV-6 pour l'hôte demeurent hypothétiques et restent à l'heure actuelle basées sur de simples observations cliniques. Toutefois, il est facilement concevable qu'une telle insertion (170 kb) codant pour de nombreuses protéines du non soi et présente dans toutes les cellules du corps puisse être responsable de nombreuses altérations physiologiques (Morissette & Flamand, 2010; Pellett *et al.*, 2012)

La confusion diagnostique entre une infection active et la présence d'une intégration est assurément la première conséquence indirecte mais importante (Boutolleau *et al.*, 2006a). Ainsi, une charge virale sanguine élevée ( $>10^5$ - $10^6$  copies d'HHV-6/mL) doit faire évoquer en premier lieu la présence d'un ciHHV-6, qui peut être confirmée par une simple détection par PCR de l'ADN viral dans les follicules pileux (Ward *et al.*, 2006).

Il est intéressant de noter ici, que plusieurs cas de transmission de ciHHV-6 suite à des greffes de CSH et de sang placentaire ont été rapportés dans la littérature (Clark *et al.*, 2006; Jeulin *et al.*, 2009; de Pagter *et al.*, 2010). Ce transfert conduit à une augmentation de la charge virale qui suit la cinétique de reconstitution hématopoïétique. Le phénomène inverse est également observable, puisqu'un patient possédant un ciHHV-6 recevant une greffe de CSH d'un donneur sain, verra ses nouveaux leucocytes exempts d'ADN d'HHV-6, objectivable au niveau biologique par une diminution progressive de la charge virale lors de la prise de greffe.

### 3. Epidémiologie

Les HHV-6A et HHV-6B sont des virus ubiquitaires, largement répandus dans la population mondiale. La séroprévalence globale de l'HHV-6 dépasse 95% dans la population adulte des pays développés, mais peut varier de manière significative en fonction de la zone géographique, de l'âge des sujets et de la sensibilité et spécificité des tests utilisés (De Bolle *et al.*, 2005). Aucun test sérologique ne permet de différencier les infections à HHV-6A de celles à HHV-6B.

L'infection à HHV-6 est généralement acquise très tôt au cours de la vie d'un individu, entre le 6<sup>ème</sup> mois et l'âge de 2 ans, suite à la perte des anticorps d'origine maternelle (Hall *et al.*, 1994) (Figure 9). L'infection peut survenir encore plus tôt dans la vie : des cas d'infections congénitales liées à une transmission intra-utérine ont été rapportés chez environ 1% des nouveaux-nés, (fréquence équivalente à celle observée pour le CMVH) et des cas de transmission périnatales ont également été décrits (Aubin *et al.*, 1992; Caserta *et al.*, 2007; Hall *et al.*, 2004; Mendel *et al.*, 1995). Il a été montré que les cas d'infections congénitales



étaient majoritairement liés à la transmission d'un ciHHV-6 (Hall *et al.*, 2008). Enfin, des cas de primo-infection de survenue plus tardive, à l'âge adulte, sont possibles mais ontrarement été observés (Akashi *et al.*, 1993).

L'HHV-6 est fréquemment détecté dans la salive et dans le tissu de la glande salivaire, suggérant que la glande salivaire est un site potentiel pour la persistance d'HHV-6 (voir paragraphe 1.2.6) et que la salive est le principal vecteur pour la transmission interhumaine du virus (Tanaka-Taya *et al.*, 1996). Il a été observé que l'HHV-6 isolé de la salive était toujours l'HHV-6B (Collot *et al.*, 2002), le mode de transmission de l'HHV-6A reste donc à ce jour méconnu.

Une transmission d'HHV-6 par le greffon est également possible au cours des transplantations, mais rarement rapportée (Ward *et al.*, 1989).

Enfin, l'allaitement ne semble pas constituer une voie de transmission de l'HHV-6 (Kusuhara *et al.*, 1997).

La distinction entre HHV-6A et HHV-6B sur le plan épidémiologique n'est pas encore clairement établie, du fait notamment de l'absence de tests sérologiques permettant les distinguer. Mais il est aujourd'hui admis que dans les pays développés la primo-infection à HHV-6B survient la première, associée dans un certain nombre de cas à des manifestations clinique (voir paragraphe 5.1), alors que l'infection à HHV-6A, asymptomatique, serait acquise secondairement, au cours de la vie (Ablashi *et al.*, 2014). Enfin, la détection concomitante d'HHV-6A et HHV-6B dans le sang ou certains tissus indique que les deux virus sont capables d'infecter de manière chronique un même individu (Boutolleau *et al.*, 2006b).

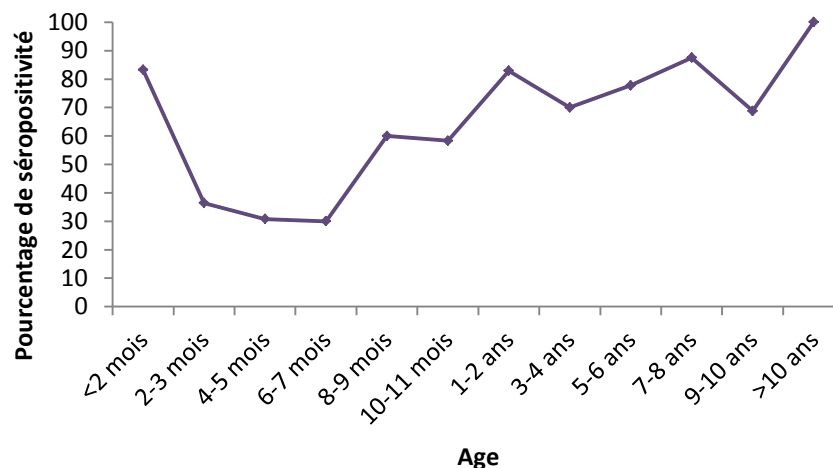


Figure 9. Séroprévalence de l'HHV-6 en fonction de l'âge (d'après (Clark *et al.*, 1993)

## 4. Pathogénèse de l'infection humaine

### 4.1. Histoire naturelle de l'infection HHV-6

Comme nous l'avons abordé dans le paragraphe 2.5 « Tropismescellulaire, tissulaire et spécificité d'hôte de l'HHV-6 », des modèles animaux ont été développés ces dernières années pour étudier les interactions entre l'HHV-6 et son hôte. Cependant la pertinence de ces modèles peu disponibles, pour étudier la physiopathologie de l'infection HHV-6 reste à démontrer(Reynaud & Horvat, 2013). Ainsi, les connaissances dans ce domaine proviennent des observations cliniques et biologiques rapportées durant le processus naturel chez l'homme(Krueger & Schneider, 2006).

Après son entrée dans l'organisme par voie orale, l'HHV-6 se réplique dans les glandes salivaires et les tissus lymphoïdes (amygdales, ganglions lymphoïdes cervicaux). S'en suit, la diffusion systémique de l'infection par voie sanguine comme le montre l'isolement de particules virales à partir de PBMCs au cours de la phase aiguë. Une dissémination du virus et des cellules infectées par la voie lymphatique est également possible. Le virus va pouvoir ainsi atteindre de nombreux compartiments cellulaires incluant, les lymphocytes T et les monocytes dans les organes lymphoïdes, les cellules hépatiques, rénales et épithéliales, les précurseurs hématopoïétiques ou encore les cellules gliales du SNC et y établir une infection active, abortive ou latente en fonction du niveau de permissivité des cellules infectées(*voir paragraphe 2.5*). Une étude a par ailleurs montré que l'ADN de l'HHV-6 était détectable dans des échantillons de muqueuses nasales et que l'HHV-6 était capable de se multiplier *in vitro* dans des cellules gliales olfactives suggérant l'utilisation de la voie olfactive comme porte d'entrée dans le SNC (Harberts *et al.*, 2011)

Au décours de la primo-infection, l'hôte va développer une réponse immunitaire spécifique (*voir paragraphe 4.2.1*) qui va permettre d'endiguer la répllication virale objectivée par une diminution de la charge virale qui va finir par atteindre un seuil indétectable par les techniques de diagnostic conventionnelles (Agut *et al.*, 2015).

L'établissement de la latence va avoir lieu, comme dit précédemment, dans différents sites de l'organismes et en particulier dans la salive, les monocytes, les cellules endothéliales et les progéniteurs hématopoïétiques(Caruso *et al.*, 2002; Fox *et al.*, 1990; Gautheret-Dejean *et al.*, 2000; Kondo *et al.*, 1991)

Les phases de latence seront, au cours de la vie d'un individu, entrecoupées de phases de réactivations, au décours desquelles le virus reprend un cycle lytique complet aboutissant à la production de nouvelles particules virales infectieuses, qui vont pouvoir diffuser dans tout l'organisme et aller se répliquer dans certains tissus cibles. Lorsque ces réactivations surviennent chez des sujets immunodéprimés elles pourront être à l'origine de maladies à HHV-6 plus ou moins graves en fonction notamment du degré d'immunosuppression (De Bolle *et al.*, 2005; Dockrell, 2003)

Enfin, une réinfection par une souche exogène d'un individu séropositif pour l'HHV-6A ou l'HHV-6B, est possible comme le montre la détection concomitante des génomes de deux souches distinctes d'une espèce d'HHV-6 chez un même individu (Achour *et al.*, 2009). Cependant, les méthodes diagnostiques utilisées en routine ne permettent pas de distinguer une réactivation endogène d'une réinfection exogène, la fréquence de ce phénomène, tout comme les conséquences physiopathologiques ne sont donc pas encore connues (Agut *et al.*, 2015).

## **4.2. Réponse immunitaire dirigée contre l'HHV-6**

Suite à la primo-infection par HHV-6, la mise en place d'une réponse immunitaire innée puis adaptative spécifique, va permettre, comme pour les autres *Herpesviridae*, de contrôler l'infection. Cette immunité ne permet pas d'éviter les réinfections ou les réactivations, mais elle permet de contrôler la réplication et la dissémination virale et de limiter la survenue d'une maladie à HHV-6. Les caractéristiques des réponses immunitaires vis-à-vis de l'HHV-6A et de l'HHV-6B ne sont pas encore complètement élucidées, à cause notamment de la distinction récente en deux espèces qui n'était pas prise en compte dans les études antérieures. Des investigations supplémentaires seront ainsi nécessaires pour permettre une meilleure compréhension de tous les mécanismes mis en jeu (Becerra *et al.*, 2014).

### **4.2.1. Réponse innée anti HHV-6**

La première ligne de défense anti HHV-6, si on se réfère à ce qui est décrit pour les autres *Herpesviridae*, repose sur l'action des différents acteurs de la réponse immunitaire innée : cellules NK (*natural killer*), réponse interféron (IFN) induite par l'activation des récepteurs de l'immunité innée, activation des cellules dendritiques (DC) et des monocytes-macrophages. Ces différents éléments ont un rôle important pour le contrôle initial de l'infection et la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative (Smith & Khanna, 2013).

Le rôle fondamental joué par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) dans la mise en place de la réponse antivirale ainsi que leurs fonctions seront développés dans la partie expérimentale n°4 de ce mémoire. L'interaction entre HHV-6 et DC conventionnelles (cDCs : *conventional dendritic cells*) sera abordée dans le paragraphe 4.3.

Les publications se rapportant à la réponse immunitaire innée anti HHV-6 ne sont pas aussi abondantes dans la littérature que celles disponibles pour le CMVH par exemple. Ainsi, l'équipe de Flamand *et al.* a publié deux études qui ont montré que l'infection HHV-6 induisait une stimulation des effecteurs de l'immunité innée : l'infection de PBMCs par HHV-6A, induit une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), le TNF- $\alpha$  et interféron alpha (IFN- $\alpha$ ) et une activation des cellules NK associée à une synthèse d'IL-15 (Flamand *et al.*, 1991, 1996).

#### **4.2.2. Réponse immunitaire adaptative humorale**

Les études sérologiques réalisées chez des patients en primo-infection ont montré que des immunoglobulines d'isotype M (IgM) spécifiques apparaissent au cours de la première semaine suivant l'infection et peuvent persister jusqu'à un mois post-infection. Les immunoglobulines d'isotype G (IgG) sont d'apparition plus tardive mais persistent à vie dans l'organisme infecté (Suga *et al.*, 1992). Ces anticorps réagissent avec un large éventail de motifs antigéniques viraux (Balachandran *et al.*, 1989), parmi lesquels certains ont été identifiés, telle que la protéine majeure de capsid U11 (Pellett *et al.*, 1993; Yamamoto *et al.*, 1990), les glycoprotéines gH (U48) (Qian *et al.*, 1993) et gQ (U100) (Pfeiffer *et al.*, 1993), le facteur de processivité de la polymérase (U27) (Chang & Balachandran, 1991), la protéine U94 (Caselli *et al.*, 2002) ou bien encore la protéine d'ancrage U24 (Tejada-Simon *et al.*, 2003). Certains de ces anticorps ont une activité neutralisante, mais leur rôle dans le contrôle de l'infection active n'est pas encore déterminé (Agut *et al.*, 2015; Suga *et al.*, 1992). Les protéines identifiées comme cibles de la réponse humorale sont résumées dans la Figure 10.

#### **4.2.3. Réponse immunitaire adaptative cellulaire T**

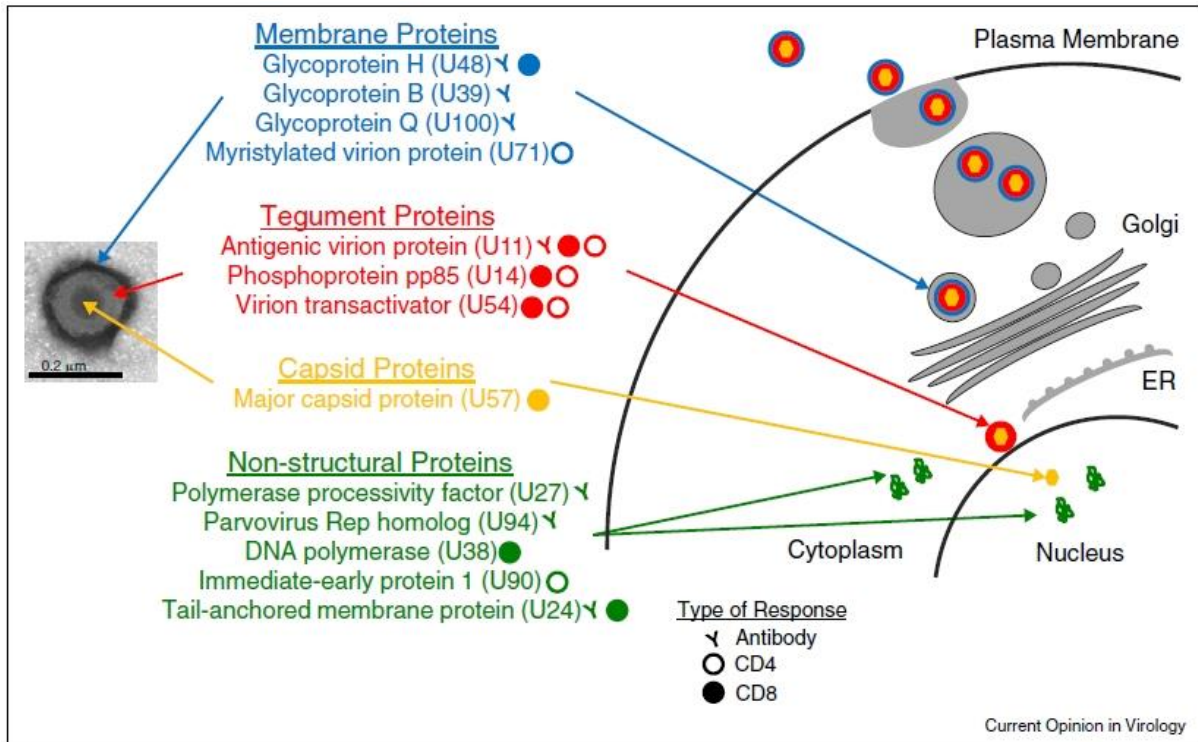
La mise en place d'une réponse immunitaire adaptative médiée par les lymphocytes T joue un rôle majeur dans le contrôle de l'infection, comme le montrent les cas de réactivations associées à des atteintes plus ou moins sévères observées chez les patients ayant un déficit de l'immunité cellulaire.

La réponse cellulaire T anti-HHV-6 a été étudiée principalement à partir de PBMCs de patients sains. Les lymphocytes T spécifiques d'HHV-6, quantifiés via la production d'IFN- $\gamma$  après stimulation antigénique, sont détectés à une faible fréquence et représentent moins de 0.1% des lymphocytes T circulants (Nastke *et al.*, 2012). Cette fréquence est remarquablement plus faible que celle observée pour le CMV, pour lequel la fraction des lymphocytes T spécifiques détectables, à distance de l'infection, représente entre 2 et 6% des lymphocytes T totaux (Sylwester *et al.*, 2005). Malgré leur faible représentativité, les cellules T spécifiques mémoires de l'HHV-6 répondent à des essais de prolifération cellulaire (Yakushijin *et al.*, 1991). La capacité de ces cellules à proliférer en réponse à une stimulation antigénique permet de les expander *in vitro* pour réaliser des études plus détaillées. Ainsi, il a été observé que la population cellulaire recueillie après stimulation de PBMCs de donneurs sains par un pool de peptides HHV-6 spécifiques, est composée majoritairement (60%) de lymphocytes TCD4+ polyfonctionnels producteurs d'IFN- $\gamma$ , de TNF- $\alpha$  ayant des propriétés cytotoxiques (expression des molécules CD107a/b composants de la membrane des granules lytiques exprimées à la surface des cellules après dégranulation) (Gerdemann *et al.*, 2012a; Nastke *et al.*, 2012; Yakushijin *et al.*, 1992). La population minoritaire (30%) est constituée de lymphocytes T CD8+ polyfonctionnels IFN- $\gamma$ + et TNF- $\alpha$ + (Gerdemann *et al.*, 2012a). Une sous-population T CD4+ productrice d'IL-10 semble être prédominante (Nastke *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2006). Une proportion des cellules T cytotoxiques (CTLs : *cytotoxic T lymphocytes*) expandus *in vitro* exprime des marqueurs de cellules mémoires : CD62L+ (36%), CD27+ (61%) et CD45RO+ (51%), impliquant que ces cellules dérivent d'une population de cellules mémoires présentes dans les PBMCs des donneurs. (Gerdemann *et al.*, 2012a). Enfin, ces CTLs sont capables de produire de l'IL-4 ainsi que de faibles quantités d'IL-2 après stimulation antigénique (Nastke *et al.*, 2012), ce profil cytokinique est similaire à celui rapporté chez des enfants atteints de roséole (Yoshikawa *et al.*, 2011). Ces résultats montrent une réponse prédominante des lymphocytes T CD4+ par rapport aux lymphocytes T CD8+. Ceci pourrait être dû à la technique utilisée pour expander les CTLs (utilisation de pool de peptides) mais ceci est peu probable car d'autres techniques d'expansions (utilisation de monocytes infectés) montrent une expansion en faveur des CD4+. Il est en revanche tout à fait concevable de penser que la balance en faveur d'une réponse CD4+ puisse être influencée par les capacités immunomodulatrices de l'HHV-6 (voir paragraphe 4.3) (Gerdemann *et al.*, 2012a).

La caractérisation des épitopes d'HHV-6 reconnus par les cellules T a fait l'objet d'études récemment publiées (Figure 9). Ainsi, Nastke *et al.*, ont identifié 11 épitopes T CD4+dérivés de 4 protéines de capsides (la protéine majeure de capside U57, les protéines de tégument U11 et U14, et la glycoprotéine U48) et d'une protéine non-structurale (l'ADN polymérase U38). Ils ont montré que des lymphocytes T CD4+ expandus avec ces peptides sont capables de produire de l'IFN- $\gamma$  et expriment, à leur surface, des marqueurs associés à un potentiel cytotoxique lorsqu'ils sont mis en contact avec des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) prétraitées par une suspension virale ou un lysat de cellules infectées (Nastke *et al.*, 2012). Martin *et al.*, ont mis en évidence une population de lymphocytes T CD8+ HHV-6B spécifiques capables de reconnaître des peptides dérivés des protéines de tégument U11 et U54. Ils ont montré que les T CD8+ expandus avec ces peptides sont capables de reconnaître des cellules infectées par HHV-6B, mais pas par HHV-6A, et ont des fonctions pro-inflammatoires et cytotoxiques (sécrétion d'IFN- $\gamma$ , de TNF- $\alpha$  et de granzyme B) (Martin *et al.*, 2012). L'équipe de Gerdemann *et al.*, a, quant à elle, pu observer une réponse T vis-à-vis d'épitopes peptidiques dérivés de la protéine très précoce U90, des protéines de tégument U11, U14 et U54, et la protéine de capside myristylée U71. La population T expandue avec ces peptides, composée de T CD4+ et de T CD8+ (cf. supra), est capable de produire de nombreux effecteurs cytokiniques et de lyseraussi bien des cellules chargées avec ces peptides que des cellules infectées par l'HHV-6B (Gerdemann *et al.*, 2012a). Enfin, des épitopes T CD8+ de U90 ont récemment été identifiés par Iampietro *et al.* (Iampietro *et al.*, 2014a). Une proportion importante des épitopes caractérisés pour la réponse T sont partagés par HHV-6A et HHV-6B, à l'origine d'une réactivité croisée entre les deux virus, ceux-ci ne peuvent donc pas être utilisés comme marqueur d'une réponse virus-spécifique (Becerra *et al.*, 2014). L'absence de réaction croisée a été rapportée dans une étude utilisant des antigènes de capsides pour les tests de lymphoprolifération mais aucun épitope n'a à l'époque été caractérisé (Wang *et al.*, 1999a).

D'autre part, 3 épitopes putatifs ont été définis sur la base de leur réactivité croisée avec des antigènes du soi humain (Tableau 3) tel que celui dérivé de la protéine U24 d'HHV-6, qui partage des homologies de séquences avec la protéine basique de la myéline (MBP : *Major Basic Protein*), auto-antigène impliqué dans la physiopathologie de la SEP (Tejada-Simon *et al.*, 2003). Il faut cependant noter que l'implication d'une réponse T croisée entre U24 d'HHV-6 et MBP dans la SEP est encore très controversée (Cirone *et al.*, 2002).

Au total, à ce jour, 26 épitopes d'HHV-6A et/ou d'HHV-6B sont identifiés et sont recensés dans le Tableau 3. L'ensemble des protéines d'HHV-6 ciblées par la réponse cellulaire T sont illustrées Figure 10.



**Figure 10. Cibles de la réponse immunitaire adaptative anti HHV-6(d'après Becerra *et al.*, 2014).** Les anticorps et la réponse cellulaire T ciblent des composants de la membrane, du téguement et de la capside virale ainsi que des protéines non structurales exprimées dans les cellules infectées. Le cliché (à gauche) représente une particule virale purifiée et l'illustration (à droite) indique la localisation cellulaire des différents composants au cours du cycle de réplication virale.

La caractérisation des réponses T HHV-6A spécifiques et HHV-6B spécifiques se poursuit actuellement au sein de plusieurs équipes. Néanmoins, les données préliminaires obtenues ont d'ores et déjà permis à l'équipe du docteur Leen, aux Etats-Unis, de générer *in vitro* l'expansion de CTLs HHV-6 spécifiques (voire multi-virus spécifiques) et d'envisager l'utilisation de ces cellules pour traiter et/ou prévenir les réactivations virales après greffe de CSH (Gerdemann *et al.*, 2012a, b; Papadopoulou *et al.*, 2014).

Tableau 3. Epitopes T CD4+ et CD8+ identifiés pour l'HHV-6 (Becerra *et al.*, 2014)

Epitope	HLA <sup>a</sup>	ORF <sup>b</sup>	Protéine	Test <sup>c</sup>	Spécificité <sup>d</sup>	Référence
GILDFGVKL	A2	U11	Protéine du tégument	Cyto; grzB	6B	Martin <i>et al.</i> , 2012
MLWYTVYNI	A2	U11	Protéine du tégument	Cyto; grzB; Tet	6B	Martin <i>et al.</i> , 2012
SLMSGVEPL	A2	U11	Protéine du tégument	Cyto; grzB	6B	Martin <i>et al.</i> , 2012
ILYGPLTRI	A2	U54	Transactivateur/tégument	CTL; Cyto; grzB; Tet	6B	Martin <i>et al.</i> , 2012
LLCGNLLIL	A2	U54	Transactivateur/tégument	Cyto; grzB	6B	Martin <i>et al.</i> , 2012
TEMMNDARL	B40	U14	Protéine IE1	CTL; Cyto	n.d.	Gerdemann <i>et al.</i> , 2013
FESLLFPEL	B40	U90	Protéine IE1	CTL; Cyto	n.d.	Gerdemann <i>et al.</i> , 2013
VEESIKEIL	B40	U90	Protéine IE1	CTL; Cyto	n.d.	Gerdemann <i>et al.</i> , 2013
CIQSIGASV	A2	U90	Protéine IE1	CTL; Cyto	6A/6B	Iampetro <i>et al.</i> , 2014
CYAKMLSGK	A3	U90	Protéine IE1	CTL; Cyto	6B/6A?	Iampetro <i>et al.</i> , 2014
STSMFILGK	A3	U90	Protéine IE1	CTL; Cyto	6B/6A?	Iampetro <i>et al.</i> , 2014
NPEISNKEF	B7	U90	Protéine IE1	CTL; Cyto	6B/6A?	Iampetro <i>et al.</i> , 2014
SLESYSASKAFSVPENG	DR1	U11	Protéine du tégument	Cyto	6A/6B	Nastke <i>et al.</i> , 2012
RDNSYMPIALSLHENG	DR1	U14	Phosphoprotéine pp85	Cyto	6A/6B	Nastke <i>et al.</i> , 2012
VVGKYSLQDSVLVVRLF	DR1	U38	ADN polymérase	Cyto; Tet	6A/6B	Nastke <i>et al.</i> , 2012
GIYYIRVVEVRQMQYDN	DR1	U48	Glycoprotéine H	Cyto; Tet	6A/6B	Nastke <i>et al.</i> , 2012
VDEEYRFISDATFVDET	DR1	U48	Glycoprotéine H	Cyto; Tet	6A/6B	Nastke <i>et al.</i> , 2012
TRPLYITMKAQKKNSRI	DR1	U54	Transactivateur/tégument	Cyto; Tet	6A/6B	Nastke <i>et al.</i> , 2012
FKSLIYINENTKILEVE	DR1	U57	Protéine majeur de capsid	Cyto; Tet	6A/6B	Nastke <i>et al.</i> , 2012
IRHHVGIEKPNPSEGEA	DR1	U57	Protéine majeur de capsid	Cyto	6A/6B	Nastke <i>et al.</i> , 2012
SLLSIMTLAAMHSKLSP	DR1	U57	Protéine majeur de capsid	Cyto; Tet	6A/6B	Nastke <i>et al.</i> , 2012
TTNPWASLPGSLGDILY	DR1	U57	Protéine majeur de capsid	Cyto; Tet	6A/6B	Nastke <i>et al.</i> , 2012
DPSRYNISFEALLGIYS	DR1	U57	Protéine majeur de capsid	Cyto; Tet	6A/6B	Nastke <i>et al.</i> , 2012
KELLQSYVSKNNN	DR53	U95	Protéine IE	Cyto	6A?; GAD95	Uemura <i>et al.</i> , 2003
MDRPRTPPPSYSE	n.d.	U24	Protéine d'ancrage	Prolif; Cyto	6A/B; MBP	Tejada-Simon <i>et al.</i> , 2003
RPRTPPPSY	n.d.	U24	Protéine d'ancrage	Prolif; CTL	6B?; MBP	Cheng <i>et al.</i> , 2012

<sup>a</sup> Restriction HLA. HLA-A2, HLA-A3, HLA-B7, et HLA-B40 sont des molécules du CMH de classe I reconnues par les lymphocytes T CD4+. HLA-DR1 et HLA-DR3 sont des molécules du MCH de classe II reconnues par les lymphocytes T CD4+. N.d., non définie

<sup>b</sup> ORF d'HHV-6

<sup>c</sup> Tests utilisés in vitro pour la mise en évidence d'épitopes : CTL, test de cytotoxicité; GrzB, sécrétion de granzyme B; Prolif, test de prolifération; Tet, marquage tétramère du MCH

<sup>d</sup> Spécificité pour HHV-6A ou HHV-6B, ou antigène du soi. ?, spécificité probable. n.d., non définie



### 4.3. Mécanismes d'échappement de l'HHV-6 au système immunitaire

L'HHV-6 comme tous les *Herpesviridae* va être capable de persister à vie dans l'organisme de l'hôte. La difficulté que peut avoir le système immunitaire à éradiquer le virus est liée à plusieurs phénomènes. Tout d'abord, sa capacité à rester latent dans certaines cellules de l'organisme, avec une activité transcriptionnelle réduite voire nulle, empêche toute possibilité de clairance virale. L'HHV-6 est capable d'infecter un grand nombre de types cellulaires *in vivo* et d'en altérer les fonctionnalités, en particulier les cellules issues des lignées hématopoïétiques qui interviennent dans la réponse immunitaire antivirale (lymphocytes T CD4+, monocytes-macrophages et DCs). Enfin, un certain nombre de produits de gènes viraux ont pour objectif ce que certains appellent « immunosubversion » ou immunomodulation. Les études *in vitro* ont souvent abouti à des résultats contradictoires concernant les effets de ces protéines qui peuvent probablement varier en fonction des types cellulaires étudiés mais surtout en fonction de l'espèce d'HHV-6 étudiée. Cependant, il semble clairement admis que l'HHV-6 possède la capacité d'impacter sur la régulation des fonctions cellulaires. Pour revues de l'ensemble des mécanismes d'immunomodulation mis en jeu par HHV6A et HHV-6B, voir Lusso *et al.* (2006) et Dagna *et al.* (2013), les principaux sont résumés Figure 11.

A noter, nous n'aborderons volontairement pas ici les quelques études sur l'interaction entre HHV-6 et pDCs qui feront l'objet d'un paragraphe dédié dans la partie expérimentale n°4.

#### 4.3.1. Infection des cellules du système immunitaire

Comme nous l'avons déjà dit dans le paragraphe 2.5, les deux espèces d'HHV-6 sont avant tout des virus lymphotropes. Ils vont infecter préférentiellement les lymphocytes T CD4+ et y établir un cycle lytique complet (Takahashi *et al.*, 1989). Les lymphocytes T CD4+ jouant un rôle majeur dans la mise en place de la réponse immune adaptative, la lyse de ceux-ci suggère que l'HHV-6 pourrait être une cause d'immunosuppression, et cet effet constitue la base de la potentielle synergie entre HHV-6A et HIV (Lusso *et al.*, 1989).

A la différence des lymphocytes T, les lymphocytes B ne semblent pas constituer une cible pour HHV-6A et HHV-6B, malgré la dénomination initiale d'HBVL. Cependant, il a été rapporté que des cellules B devenaient sensibles à une infection par HHV-6A après immortalisation par l'EBV, suggérant que l'infection EBV était capable d'induire l'expression de facteurs membranaires ou solubles, rendant permissives les cellules B infectées (Ablashi *et*

*al.*, 1988).

D'autres sous-populations lymphocytaires peuvent être infectées de manière productive par HHV-6A mais pas par HHV-6B telles que les lymphocytes CD8+, les lymphocytes T  $\gamma/\delta$  ou bien encore les cellules NK (Lusso *et al.*, 1991a, 1993, 1995). Ces cellules sont impliquées dans les mécanismes de défense antiviraux *in vivo*, HHV-6A pourrait utiliser cette stratégie pour contrecarrer efficacement la réponse immune de l'hôte.

Bien que certaines cellules du système immunitaire ne soient pas le siège d'une infection productive par HHV-6A ou HHV-6B, une infection non-lytique voire une simple interaction entre les membranes cellulaires et les protéines virales peuvent néanmoins induire une altération de leurs fonctions. Ainsi, les cellules de la lignée monocyttaire constituent une cible pour les deux virus *in vivo* et *in vitro*, et sont supposées être un réservoir *in vivo* (Burd & Carrigan, 1993; Kondo *et al.*, 1991). Le fait que ces cellules puissent supporter une infection productive est encore controversé. Ainsi Lusso *et al.* n'ont observé aucun marqueur d'infection productive (production d'ARN messager, cinétique croissante de l'ADNémie ou observation d'un ECP) dans des macrophages primaires différenciés dérivés de PBMCs après exposition à HHV-6A et HHV-6B (Smith *et al.*, 2003). A l'inverse d'autres équipes ont montré que des macrophages différenciés *in vitro* étaient capables de supporter, au moins de manière transitoire une infection par l'HHV-6B et l'HHV6A (Kondo *et al.*, 1991), et présentaient des signes d'ECP induits par HHV-6A et HHV-6B (Burd & Carrigan, 1993). Une autre étude, a rapporté que des monocytes fraîchement isolés étaient résistants à l'infection, mais que leur différenciation avec l'IL-15 augmentaient leur sensibilité à l'infection (Arena *et al.*, 2000). Les divergences observées entre ces études pourraient s'expliquer par l'utilisation de conditions expérimentales différentes pour la croissance et la différenciation des monocytes primaires *in vitro*. Par ailleurs, de hauts niveaux d'ADN d'HHV-6B sont détectés dans les monocytes circulants issus d'enfants en primo-infection et sont associés à l'expression des ARNm U79/U80 et à la possibilité d'isoler en culture le virus à partir de ces cellules. Ces derniers résultats sont en faveur de la présence d'une infection productive dans ces cellules au cours de la primo-infection (Kondo *et al.*, 2002b). Pendant la phase de convalescence, l'ADN d'HHV-6B est détecté dans les monocytes circulants en l'absence de marqueur d'infection active, suggérant que ces cellules puissent constituer un réservoir *in vivo* de l'infection latente (Kondo *et al.*, 1991).

Quoiqu'il en soit que l'infection soit, productive ou non, les cellules phagocytaires mononucléées représentent une cible majeure pour les deux espèces virales.

Comme les cellules phagocytaires mononucléées, les cDCs immatures dérivées de sang périphériques sont infectables par HHV-6A et HHV-6B. Là encore des données contradictoires sont décrites concernant le type d'infection qu'elles supportent. Pour certaines équipes, l'infection par HHV-6A et HHV-6B de cDCs immatures *in vitro*, obtenues à partir de monocytes sanguins mis en cultures en présence d'IL-4 et de facteur de croissance granulomonocytaire GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), conduit à une production de protéines virales détectables par IFI ou cytométrie en flux (Asada *et al.*, 1999; Hirata *et al.*, 2001) et à la production d'ARNm correspondant aux gènes très précoces et tardifs et donc à une infection productive (Kakimoto *et al.*, 2002; Niiya *et al.*, 2006). A l'inverse, les données obtenues par Smith *et al.* (2005), et plus récemment par Gustaffson *et al.* (2013), montrent l'absence d'accumulation d'ADN viral au sein de ces cellules et sont donc plutôt en faveur d'une infection non productive.

Par ailleurs, Takemoto *et al.*, ont montré que des DCs dérivées de monocytes (moDCs) et des cDC isolées de PBMCs, exposées à l'HHV-6B transmettent efficacement l'infection aux lymphocytes T CD4+, conduisant à une infection productive de ces derniers, malgré l'absence de mise en évidence de particules virales dans les surnageants (Takemoto *et al.*, 2009). Un traitement par de l'acide phosphonormique empêche la transmission du virus des moDCs aux cellules T CD4+, suggérant que les cDCs doivent être infectées de manière productive par HHV-6B pour pouvoir transmettre le virus aux lymphocytes T CD4+. Cependant, cette étude ne permet pas d'exclure la possibilité pour les cDCs d'agir en tant que « cheval de Troie », en adsorbant les particules d'HHV-6B qui seraient alors transmises alors secondairement, de manière passive, aux cellules T CD4+.

De plus, les cellules progénitrices de la moelle osseuse (CD34+) sont également sensibles à l'infection par HHV-6B (aucune étude ne rapporte d'infection par HHV-6A), et peuvent transférer du virus latent à des cellules différenciées issues de plusieurs lignées, incluant les monocytes-macrophages et les cDCs (Andre-Garnier *et al.*, 2004; Isomura *et al.*, 2003; Luppi *et al.*, 1999).

Enfin, il a été montré que HHV-6A et HHV-6B ont de puissants effets suppresseurs sur la croissance et la différenciation de différents types de précurseurs hématopoïétiques (Isomura *et al.*, 2000; Knox & Carrigan, 1992; Yasukawa *et al.*, 1999). Ces dernières données obtenues *in vitro* sont cohérentes avec les observations *in vivo* comme les retards à la sortie d'aplasie ou les échecs de prise de greffe rapportés chez les patients greffés de CSH infectés de manière active par HHV-6 (Boutolleau *et al.*, 2003; Chevallier *et al.*, 2010; Imbert-Marcille *et al.*,

2000; Johnston *et al.*, 1999)(voir paragraphe 5.3.2).

#### **4.3.2. Modulation de la sensibilité à l'apoptose**

Les phénomènes d'apoptose peuvent conduire à une modulation et à des perturbations du système immunitaire. La capacité de HHV-6 à induire l'apoptose cellulaire, même si les mécanismes ne sont pas tous clairement établis, a été illustrée par une étude menée *in vivo* qui montrait une sensibilité augmentée des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> isolés chez des patients au moment d'une infection active par rapport à ceux d'un groupe contrôle (Yasukawa *et al.*, 1998). Néanmoins, la relation entre HHV-6 et apoptose semble complexe. En effet, l'infection de différentes lignées lymphocytaires T par HHV-6A et HHV-6B induit un arrêt du cycle cellulaire, une accumulation de la protéine p53 dans le cytoplasme cellulaire, et les cellules deviennent résistantes à l'apoptose induite par un rayonnement ultra-violet (Li *et al.*, 2011; Oster *et al.*, 2008; Takemoto *et al.*, 2004).

#### **4.3.3. Modulation des réponses cytokinique et chimiokinique**

HHV-6A et HHV-6B peuvent moduler la sécrétion de cytokines et chimiokines produites par différents types cellulaires. Ce dérèglement peut profondément affecter l'initiation, la polarisation et les fonctions normales des effecteurs de l'immunité. Il est à noter cependant que selon le support cellulaire utilisé (PBMCs, monocytes-macrophages, cellules de lignée) et le niveau d'étude (ARNm ou protéine), les diverses données de la littérature sont parfois contradictoires.

Les infections par HHV-6A et HHV-6B induisent une diminution de la sécrétion d'IL-2 par les PBMCs stimulés et par des lignées de cellules T, conduisant à une diminution de la prolifération cellulaire T (Flamand *et al.*, 1995; Iampietro *et al.*, 2014b). L'étude récente publiée par Iampietro *et al.* (2014b) a montré que pour l'HHV-6B l'inhibition de la sécrétion d'IL-2 était médiée par la protéine de tégument U54, cette dernière étant capable d'inhiber la déphosphorylation et la translocation nucléaire de la protéine NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) et ainsi de diminuer la transcription du gène de l'IL-2. A l'inverse, une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor alpha*), IFN- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-15 et IL-18a été observée après infection (Arena *et al.*, 1999; Flamand *et al.*, 1991, 1996; Kikuta *et al.*, 1990; Mayne *et al.*, 2001).

Des données contradictoires concernant l'IL-10 et l'IL-12 sont rapportées dans la

littérature. Li *et al.*, ont rapporté que l'infection de monocytes-macrophages par HHV-6 entraînait une augmentation de la synthèse d'IL-10 et d'IL-12 ((Li *et al.*, 1997), alors que, Smith *et al.* (2003) ont décrit au contraire une suppression de la synthèse de l'IL-12 dans ce même type cellulaire. L'IFN- $\gamma$  et l'IL-10 semblent être les marqueurs des lymphocytes T CD4+ mémoires spécifiques de HHV-6A et HHV-6B (Nastke *et al.*, 2012). Il a en effet été observé que l'infection de PBMCs par ces deux virus, semble induire une augmentation de l'IL-10 et une diminution de l'IL-12, ce déséquilibre cytokinique pouvant être à l'origine d'un switch d'une réponse antivirale de type T helper (Th) 1 vers une réponse de type Th-2 de la réponse lymphocytaire T CD4+ (Arena *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2006). De plus, l'IL-10 sécrété par les lymphocytes T CD4+ en réponse à l'infection par HHV-6 module la prolifération d'autres sous-populations de lymphocytaires T. Différentes sous-populations de lymphocytes T régulateurs ont été observées *in vitro* après expansion de lymphocytes T HHV-6 spécifiques (Wang *et al.*, 2014). Cependant, Mayne *et al.* (2001) ont rapporté que l'infection de la lignée lymphocytaire SupT1 par HHV-6A et HHV-6B, entraînait une réduction de la synthèse des cytokines de type 2 telles que l'IL-10, son récepteur (IL-10R) et IL-14.

Par ailleurs, Smith *et al.* (2005), ont montré que la production d'IL-12 par les DCs matures infectées par HHV-6A et HHV-6B est inhibée, alors qu'à l'inverse une augmentation du niveau de production de cette cytokine par les cDCs matures a été mise en évidence par deux autres équipes suite à une infection par HHV-6A (Gustafsson *et al.*, 2013) et HHV-6B (Bertelsen *et al.*, 2010).

Des données contradictoires existent en ce qui concerne l'IL-18 (Arena *et al.*, 1999; Mayne *et al.*, 2001). Par ailleurs, il a été montré que HHV-6 induit la sécrétion d'IL-6 *in vitro* (Mayne *et al.*, 2001) et *in vivo* (Go & Nakamura, 2002) et augmente la production d'IL-8 dans des cellules d'hépatocarcinome HepG2 ou des cellules endothéliales (Caruso *et al.*, 2002; Inagi *et al.*, 1996).

De plus, la mesure de la sécrétion de cytokines et chimiokines *ex vivo* à partir de tissus lymphoïdes infectés par HHV-6A a permis de mettre en évidence une augmentation importante de la production de RANTES (Grivel *et al.*, 2001, 2003). Des données similaires ont été obtenues après infection par HHV-6A de cellules endothéliales, pour lesquelles une augmentation de synthèse de diverses chimiokines telles que RANTES ou MCP-1 a été observée (HHV-6B n'a pas été testé dans cette étude) (Caruso *et al.*, 2003). Cette augmentation marquée de sécrétion de RANTES dans les tissus infectés par HHV-6A,

jouerait un rôle dans les interactions entre HHV-6A et VIH (Grivel *et al.*, 2001) et conduit à une augmentation de la réponse inflammatoire ainsi qu'au recrutement de nouvelles cibles pour une infection productive ou non à HHV-6 (Dagna *et al.*, 2013).

Un autre mécanisme d'immunomodulation probable a récemment été décrit par Jaworska *et al.*, qui ont découvert que les protéines IE-1 d'HHV-6A et HHV-6B sont de puissants suppresseurs de l'induction des gènes IFN- $\beta$  (Jaworska *et al.*, 2007). Cette même équipe a de plus montré que l'infection HHV-6B est résistante à l'activité antivirale des IFN de type I, alors que HHV-6A reste sensible et voit sa réplication diminuée de manière significative sous l'action des IFN- $\alpha/\beta$  (Jaworska *et al.*, 2010). La protéine IE-1 de HHV-6B (IE1B) est ainsi capable d'interagir avec le facteur de transcription STAT2 (*signal transducer and activator of transcription 2*), de le séquestrer dans le noyau cellulaire et ainsi empêche la liaison d'ISGF3 (*IFN-stimulated gene factor 3*) promoteur des gènes de réponse à l'IFN (ou ISRE pour *IFN-stimulated response elements*). IE1 est l'une des premières protéines synthétisées après l'entrée du virus dans la cellule. Une inhibition puissante et rapide de l'action des IFN de type I constitue probablement un élément essentiel pour l'établissement d'une infection productive ou latente pour HHV-6A et HHV-6B.

#### 4.3.4. Analogues viraux de chimiokines et de récepteurs de chimiokines

Les deux espèces d'HHV-6 codent pour des analogues de chimiokines CC et pour des récepteurs de chimiokines humains (CCRs), qui peuvent moduler de manière significative les réponses immunes et qui ont pour rôle probable de promouvoir la croissance virale, la dissémination virale et/ou l'échappement à la réponse immune. HHV-6A et HHV-6B codent pour deux chimiokines (U22 et U83) et deux récepteurs de chimiokines (U12 et U51) qui ont leurs homologues chez le CMVH (French *et al.*, 1999; Isegawa *et al.*, 1998; Milne *et al.*, 2000; Zou *et al.*, 1999).

U12 et U51 codent pour des récepteurs couplés à une protéine G, homologues de récepteurs de chimiokines probablement capables d'activer et de recruter les cellules de l'hôte (Dagna *et al.*, 2013; Lusso, 2006). Le produit du gène U12, exprimé au cours de la phase tardive de l'infection par HHV-6A ou HHV-6B code pour un récepteur de chimiokines  $\beta$ . Il est activé par les chimiokines  $\beta$  CCL5/RANTES (*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*), CCL3/MIP-1 $\alpha$  (*macrophage inflammatory protein 1 alpha*), CCL4/MIP-1 $\beta$  et CCL2/MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*), mais pas par la chimiokine  $\alpha$ CXCL8/IL-8 (Isegawa *et al.*, 1998; Kondo *et al.*, 2002b). A la différence de

U12, le gène U51 est transcrit à la phase précoce de l'infection, et code pour un récepteur liant spécifiquement les chimiokines  $\beta$  CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CCL7/MCP-3, CCL11/Eotaxine et CCL13/MCP-4 (Milne *et al.*, 2000). Lorsque U51 est exprimé dans des cellules épithéliales, il induit une diminution de l'expression de RANTES et une diminution de la sécrétion de cette chimiokine dans le milieu extracellulaire (Milne *et al.*, 2000). U51 pourrait également agir comme régulateur positif de la réplication virale, en favorisant la fusion des membranes virales et cellulaires, facilitant ainsi la dissémination de l'infection cellule à cellule (Zhen *et al.*, 2005).

Le gène U83, code pour une protéine chimioattractive qui est un agoniste de plusieurs récepteurs de chimiokines humains. Comme dit dans le paragraphe 2.2.2 « *Variabilité inter-espèces* », ce gène diverge d'environ 15% entre les deux espèces, ainsi U83 d'HHV-6A (U83A) n'a pas les mêmes propriétés biologiques que U83B (Sjahril *et al.*, 2009). pU83A est capable de se lier avec une haute affinité à CCR1, CCR4, CCR5, CCR6 et CCR8 et ainsi de recruter au site de l'infection les cellules exprimant ce récepteur tels que les monocytes-macrophages et les lymphocytes T (Dewin *et al.*, 2006; Lüttichau *et al.*, 2003; Zou *et al.*, 1999). Le transcrit complet de U83A est exprimé seulement au stade tardif de l'infection, mais une forme épissée de ce gène est exprimé à un stade précoce et conduit à la traduction d'une protéine (U83A-Npep) ayant une activité biologique différente de U83A. En effet, U83A-Npep est un antagoniste des récepteurs CCR1, 5 et 8. Ainsi U83A-Npep, via son activité antagoniste pourrait prévenir la reconnaissance des cellules infectées par le système immunitaire au stade précoce de l'infection, alors que l'activité agoniste de U83A au stade tardif de l'infection pourrait conduire au recrutement de nouvelles cibles pour le virus permettant ainsi une dissémination de l'infection et l'établissement de la latence (Catusse *et al.*, 2008, 2009; Dewin *et al.*, 2006). Le gène U83 de HHV-6B ne code quant à lui que pour une seule isoforme de U83B (absence de site d'épissage) qui est un agoniste du CCR2 (Lüttichau *et al.*, 2003) capable d'induire le recrutement et l'activation des monocytes présentant ce récepteur à leur surface (Clark *et al.*, 2013).

#### **4.3.5. Modulation de l'expression des molécules de surface cellulaire**

HHV-6A et HHV-6B sont capables d'entraîner des modifications de l'expression de nombreuses molécules exprimées à la surface de différents types cellulaires.

HHV-6A et HHV-6B induisent une diminution de l'expression de leurs récepteurs respectifs, CD46 (Santoro *et al.*, 1999) et CD134 (Tang *et al.*, 2013). Par ailleurs, l'infection

par HHV-6A ou HHV-6B de lymphocytes T CD4+, s'accompagne d'une diminution importante de l'expression du complexe CD3/récepteur T (TCR pour *T-cell receptor*) due à une down-régulation de la transcription de plusieurs chaînes du CD3 pouvant ainsi affecter la reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes (Lusso *et al.*, 1991a). Un mécanisme supplémentaire impliqué dans la diminution d'expression du complexe CD3/TCR a été décrit pour l'HHV-6A mais pas pour l'HHV-6B : en présence de la protéine U24A les complexes CD3/TCR endocytés s'accumulent dans les endosomes et ne sont pas recyclés pour être ré-exprimés à la surface membranaire (Sullivan & Coscoy, 2008). L'HHV-6A induit une augmentation de la molécule CD4 à la surface des lymphocytes T CD4+ (Flamand *et al.*, 1998), mais il est aussi capable d'induire une expression *de novo* de la molécule CD4 à la surface de cellules qui ne l'expriment pas habituellement, tels que les lymphocytes T CD8+ (Lusso *et al.*, 1991b), les cellules NK (Lusso *et al.*, 1993) et les lymphocytes T  $\gamma/\delta$  CD4- (Lusso *et al.*, 1995). L'augmentation de l'expression de la molécule CD4 et la diminution de l'expression des molécules CD46 et CD3 ont aussi été observées à la surface de lymphocytes T contenus dans des fragments d'amygdale d'origine humaine mis en culture *in vitro* et infectés par HHV-6A (souche GS) et HHV-6B (souche PL-1)(Grivel *et al.*, 2003).

L'infection par HHV-6B prévient l'apoptose spontanée de monocytes *in vitro* et induit une diminution de l'expression des molécules CD14, CD64 (Fc $\gamma$ RI, récepteur du fragment Fc des Immunoglobulines) et HLA-DR à leur surface, sans que l'expression de CD32 (Fc $\gamma$ RII) ne soit affectée(Janelle & Flamand, 2006).

Comme nous l'avons vu précédemment, la cDC constitue une cellule cible pour l'HHV-6(Asada *et al.*, 1999). Les résultats relatifs aux conséquences de l'infection par les HHV-6 de ces cellules *in vitro*, obtenues à partir de monocytes sanguins mis en culture en présence d'IL-4 et de GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), sont contradictoires. Alors que certaines études ont rapporté une augmentation de l'expression des molécules de HLA de classe I sur des cDC immatures infectées par HHV-6A ou HHV-6B, avec ou sans réplication virale(Gustafsson *et al.*, 2013; Kakimoto *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2005), d'autres ont montré une diminution d'expression dépendante de la réplication pour HHV-6A mais pas pour HHV-6B (Hirata *et al.*, 2001), et une autre n'a mis en évidence aucun effet (Niiya *et al.*, 2006). Deux équipes ont étudié l'expression des molécules de CMH de classe I sur des cDCs matures et ont observé soit une diminution(Smith *et al.*, 2005) soit aucune modification(Niiya *et al.*, 2006) d'expression. Un des mécanismes évoqué pour expliquer ce phénomène implique le gène U21 qui code pour une protéine capable de lier les molécules de CMH de classe I et



d'induire leur dégradation dans le compartiment lysosomal. Bien que U21A et U21B partagent une homologie de séquences en acides aminés de 89%, U21A semble être plus efficace que U21B pour faire diminuer l'expression des molécules du CMH de classe I (Glosson & Hudson, 2007).

Les résultats des études sur l'expression des molécules de classe II sont tout aussi contradictoires: suite à l'infection des cDCs par HHV-6A et HHV-6B, certains ont rapporté une augmentation d'expression (Bertelsen *et al.*, 2010; Gustafsson *et al.*, 2013; Kakimoto *et al.*, 2002), d'autres une diminution (Smith *et al.*, 2005) alors que certains n'ont observé aucune modification (Hirata *et al.*, 2001; Niiya *et al.*, 2006).

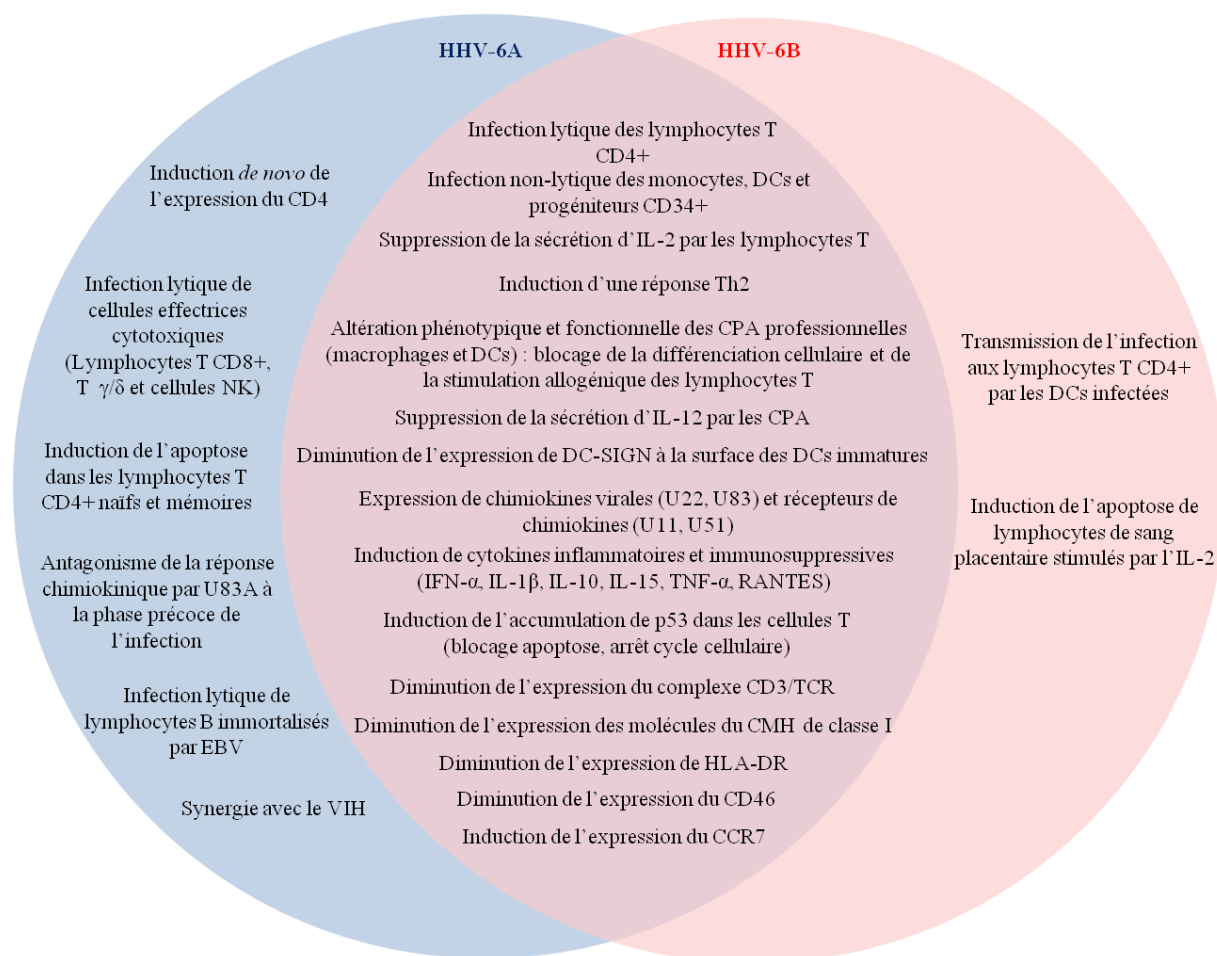
Considérant les études sur l'expression des molécules de stimulation, elles ont montré une augmentation de l'expression du CD86 et une expression non altérée du CD40 à la surface des cDCs immatures qu'il y ait ou non une répllication virale (Gustafsson *et al.*, 2013; Kakimoto *et al.*, 2002; Niiya *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2005). L'infection de cDCs matures par HHV-6A et HHV6B induit, quant à elle, une augmentation du CD86 alors que l'expression du CD40 est diminuée (Bertelsen *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2005). Concernant la molécule CD80, une infection productive à HHV-6B semble aboutir à une augmentation de son expression à la surface de cDCs immatures (Bertelsen *et al.*, 2010; Kakimoto *et al.*, 2002), et à l'inverse à une diminution de son expression à la surface des cDCs matures, indépendamment d'une répllication ceci étant observé pour les deux espèces virales (Bertelsen *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2005). L'expression de la molécule CD83 est soit non affectée (Gustafsson *et al.*, 2013; Hirata *et al.*, 2001) soit augmentée (Kakimoto *et al.*, 2002; Niiya *et al.*, 2006) suite à l'infection HHV-6A et HHV-6B aussi bien dans les cDCs immatures que matures.

Par ailleurs, l'infection de cDCs par HHV-6A et HHV-6B induit une diminution de la transcription du gène codant pour le récepteur de type lectine DC-SIGN (*dendritic cell specific ICAM-3 grabbing non integrin*) (Niiya *et al.*, 2004). Cette molécule intervient notamment dans l'interaction de la cDC avec le lymphocyte T lors de la présentation de l'antigène, en se liant à la molécule d'adhérence ICAM-3 (Geijtenbeek *et al.*, 2000a). De plus cette molécule constitue un récepteur viral à large spectre. DC-SIGN participe notamment à la dissémination de l'infection VIH dans l'organisme en favorisant la capture des virions par les cDCs au niveau des muqueuses, et leur transmission aux lymphocytes T CD4+ permissifs situés dans les ganglions lymphatiques (Geijtenbeek *et al.*, 2000b).

A l'inverse, les deux espèces sont capables d'induire l'expression de CCR7 (Dagna *et al.*, 2013), récepteur clé exprimé par les lymphocytes T et les cDCs matures, qui entraîne la migration par chimiotactisme vers les organes lymphoïdes secondaires (Hasegawa *et al.*,

1994).

Au total, l'infection des cellules dendritiques par les HHV-6 pourrait considérablement perturber leur fonctionnement *in vivo* et affecter leur capacité à présenter les antigènes et à activer les cellules T (Gustafsson *et al.*, 2013; Kakimoto *et al.*, 2002; Niiya *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2005).



**Figure 11. Mécanismes d'immunomodulation communs et spécifiques d'HHV-6A et HHV-6B (adapté de Dagna *et al.*, 2013).**

## 5. Clinique

### 5.1. Primo-infection

L'infection primaire à HHV-6, initialement décrite par Yamanishi *et al.* en 1988, dans sa forme typique est appelée exanthème subit, roséole infantile ou bien encore sixième maladie. Il s'agit d'une affection fébrile aiguë bénigne survenant généralement avant l'âge de 2 ans (Hall *et al.*, 1994). Elle se caractérise par une fièvre élevée (pouvant dépasser 40°C), éventuellement associée à des convulsions, qui dure de trois à cinq jours, et disparaît soudainement pour laisser place à une éruption cutanée maculo-papuleuse, siégeant dans un premier temps au niveau du tronc, puis s'étendant au visage et aux extrémités (Figure 12). Elle se résout spontanément en un à deux jours.

La fréquence de l'exanthème subit au cours de la primo-infection HHV-6 semble plus élevée dans la population japonaise bien que la cause de ce phénomène soit encore inconnue (Asano *et al.*, 1994)

Dewhurst *et al.* (Dewhurst *et al.*, 1993) ont montré que l'HHV-6B était responsable de la majorité des primo-infections infantiles. Des cas de primo-infections liées à HHV-6A ont été plus rarement rapportés aux Etats-Unis et en Afrique (Bates *et al.*, 2009; Hall *et al.*, 2006), et il est aujourd'hui admis que l'HHV-6A est acquis plus tard dans la vie que l'HHV-6B, au cours d'une primo-infection typiquement asymptomatique (De Bolle *et al.*, 2005). Outre l'exanthème subit typique, la primo-infection HHV-6B chez l'enfant peut revêtir d'autres formes cliniques telles qu'une fièvre isolée sans éruption mais souvent associée à des convulsions, qui traduisent l'effet de la fièvre mais aussi probablement l'atteinte directe du système nerveux central (SNC) par le virus, ou bien encore des atteintes des voies respiratoires ou digestives (Flamand *et al.*, 2010; Hall *et al.*, 1994).

Zerr *et al.*, ont montré dans une étude prospective que la majorité des cas de primo-infections à HHV-6B (81 cas) chez l'enfant de moins de 2 ans étaient symptomatiques (93%). Les manifestations cliniques les plus fréquemment observées étaient la fièvre associée à une rhinorrhée, seulement une minorité d'enfants symptomatiques ont présenté un exanthème subit typique (23%). Dans cette étude le pic d'acquisition de la primo-infection se situait entre 9 et 21 mois et HHV-6B était l'agent étiologique de 10 à 20 % des cas de convulsions fébriles chez l'enfant de moins de deux ans (Zerr *et al.*, 2005a).

Dans la majorité des cas, la roséole infantile est une maladie bénigne d'évolution favorable(Asano *et al.*, 1994; Hall *et al.*, 1994). Néanmoins, certaines complications parfois graves ont été décrites : méningo-encéphalite(Asano *et al.*, 1992; Kondo *et al.*, 1993; Yoshikawa *et al.*, 1992a), hépatite fulminante(Asano *et al.*, 1990), purpura thrombopénique(Saijo *et al.*, 1995; Yoshikawa *et al.*, 1993), syndrome d'activation macrophagique (Huang *et al.*, 1990; Sugita *et al.*, 1995), et myocardite (Yoshikawa *et al.*, 2001a).

Du fait de la séroprévalence élevée dans la population adulte, les cas de primo-infection à HHV-6 sont rares. Ellesont été associées dans quelques cas à un syndrome mononucléosique (Akashi *et al.*, 1993) ou encore à une hépatite fulminante avec adénopathie généralisée (Sobue *et al.*, 1991).



**Figure 12. Eruption maculo-papuleuse au cours de la roséole infantile (Prober, 2005)**

## **5.2. Infections chez le sujet immunocompétent**

L'HHV-6 a été mis en cause dans certaines manifestations cliniques chez le sujet immunocompétent, sans que l'on sache s'il s'agit d'une primo-infection ou une réactivation.

### **5.2.1. Atteintes du système nerveux central**

L'HHV6 présente un tropisme important pour le SNC, comme en atteste la détection de génome viral dans des prélèvements cérébraux de patients de différentes origines(Chan *et al.*, 2001; Donati *et al.*, 2003; Luppi *et al.*, 1995). Comme évoqué précédemment, l'HHV-6A semble avoir unneurotropisme beaucoup plus marqué que l'HHV-6B.

Outre les complications neurologiques observées au cours de l'exanthème subit, l'HHV-6 a

été imputé dans des cas d'encéphalites survenant chez des sujets adultes immunocompétents (Birnbaum *et al.*, 2005; Isaacson *et al.*, 2005; Portolani *et al.*, 2001; Torre *et al.*, 1998). Des cas rares d'encéphalomyélites ont également été documentés (Denes *et al.*, 2004; Portolani *et al.*, 2006).

Le rôle d'HHV-6 dans la SEP reste toujours controversé (Leibovitch & Jacobson, 2014; Yao *et al.*, 2010). Les capacités de ce virus à infecter le SNC et à interagir avec le système immunitaire en font un agent étiologique potentiel de cette pathologie auto-immune démyélinisante du SNC probablement multifactorielle. Une association potentielle entre HHV-6 et SEP a ainsi été évoquée par des études cas-témoins comparant la détection du virus dans le tissu nerveux, le liquide céphalo-rachidien (LCR), le sang ou les PBMCS et les résultats de tests sérologiques réalisés dans le sérum ou le LCR chez des patients atteints ou non par cette maladie (Caselli *et al.*, 2002; Cermelli *et al.*, 2003; Challoner *et al.*, 1995; Hon *et al.*, 2014; Liedtke *et al.*, 1995; Simpson *et al.*, 2014; Virtanen *et al.*, 2011). Néanmoins, ces résultats sont contradictoires, et aucune preuve formelle ne permet d'établir à ce jour un lien de causalité entre HHV-6 et SEP (Leibovitch & Jacobson, 2014).

Enfin, une association entre HHV-6 et des cas d'épilepsie du lobe temporal a par ailleurs été évoquée mais reste à démontrer (Yao *et al.*, 2010)

### **5.2.2. Pathologies autres**

L'implication de l'HHV6 dans d'autres pathologies a été évoquée (revues dans (Ablashi *et al.*, 2010; Agut *et al.*, 2015; Yao *et al.*, 2010). Le lien de causalité reste, pour la majorité d'entre elles, controversé, notamment par le fait que d'autres agents pathogènes ont été parfois mis en évidence. Ainsi, une association est suggérée entre HHV-6 et la thyroïdite d'Hashimoto (Caselli *et al.*, 2012), le syndrome de fatigue chronique (Buchwald *et al.*, 1992) et certaines maladies lymphoprolifératives (Lacroix *et al.*, 2007, 2010), où l'HHV6 pourrait jouer un rôle de cofacteur dans la carcinogenèse. HHV-6 a également été impliqué dans des cas de myocardites et cardiomyopathies chroniques (Escher *et al.*, 2015; Leveque *et al.*, 2011) et des cas d'hépatites fulminantes et de décompensations aiguës chez des patients atteints de maladie hépatique chronique (Chevret *et al.*, 2008; Härmä *et al.*, 2003)

Par ailleurs, une infection active à HHV-6 est souvent retrouvée dans des cas de syndrome d'hypersensibilité médicamenteuse ou DRESS syndrome (*drug rash with eosinophilia and systemic symptoms*) (Cacoub *et al.*, 2011; Descamps *et al.*, 1997; Tohyama *et al.*, 2007). Le

fait d'avoir une PCR HHV-6 positive dans le sang est considérée par les japonais comme un critère diagnostique de DRESS (Shiohara *et al.*, 2007). Cependant, l'implication d'un autre herpesvirus, l'EBV est également suggérée dans ce contexte et les mécanismes permettant d'établir un lien entre réactivation virale et DRESS restent à définir (Ablashi *et al.*, 2010; Tohyama & Hashimoto, 2011).

### 5.3. Infections chez le sujet immunodéprimé

L'HHV-6, à l'instar des autres membres de la famille des *Herpesviridae*, est susceptible de se comporter comme un pathogène opportuniste. C'est dans un contexte d'immunodépression cellulaire, notamment chez les patients recevant un traitement immunosuppresseur suite à une greffe d'organes solides ou de CSH, ou chez les individus infectés par le VIH, que les infections virales actives ont la plus grande probabilité de survenir, accompagnées dans un certain nombre de cas de manifestations cliniques.

Néanmoins, il faut noter ici que, à la différence de ce que nous allons voir chez les patients transplantés, le pouvoir pathogène d'HHV-6 chez les patients infectés par le VIH reste relativement méconnu et largement controversé. Des cas d'infections symptomatiques chez les patients VIH+ sont ainsi rarement rapportés et l'HHV-6, à la différence du CMV, ne semble pas constituer un agent viral opportuniste majeur dans ce contexte. De plus, le rôle d'HHV-6A comme cofacteur de progression de l'infection VIH reste encore sujet à discussion. Il est étayé par plusieurs expériences *in vitro* ayant mis en évidence une interaction entre les deux virus : tropisme partagé pour les lymphocytes T CD4+, transactivation des LTR du VIH par des protéines IE-A d'HHV-6A, induction de l'expression de la molécule CD4 à la surface des lymphocytes TCD8+ et des cellules NK, rendant ces cellules sensibles à l'infection par le VIH (De Bolle *et al.*, 2005).

Pour les raisons évoquées ci-dessus nous nous attacherons, dans la suite des rappels bibliographiques, à décrire le pouvoir pathogène d'HHV-6 chez les patients transplantés uniquement.

Chez les patients transplantés, l'incidence des infections à HHV-6, majoritairement liées à des réactivations d'HHV-6B (Drobyski *et al.*, 1993a), varie entre 48% (intervalle, 28 à 75%) chez les receveurs de CSH et 32% (intervalle, 0 à 91%) chez les greffés d'organe solide (De Bolle *et al.*, 2005). La variation considérable d'incidence observée selon les études, est certainement la conséquence non seulement de l'hétérogénéité des populations étudiées (taille

des cohortes, âge des patients...) et des prélèvements analysés (sang total, PBMCs, sérum, plasma...), mais surtout à l'absence de standardisation des méthodes utilisées pour mettre en évidence les infections virales et à l'absence de critères consensuels pour définir une infection active. Les infections à HHV-6 dans ce contexte sont dans la majorité des cas le résultat de la réactivation d'un virus endogène, consécutive à l'immunodépression iatrogène, comme cela a pu être montré par une étude des profils de restriction enzymatiques de souches d'HHV-6 isolées avant et après allogreffe de CSH chez un enfant atteint d'une leucémie (Yoshikawa *et al.*, 1992b). Néanmoins, comme nous l'avons vu précédemment, la transmission d'HHV-6 par le greffon a été rapportée dans de rares cas et les cas de réinfections ne peuvent être exclus.

### **5.3.1. Infections à HHV-6 après transplantation d'organe solide**

La fréquence de réactivations à HHV-6 après greffe d'organe solide est en moyenne de 30%, avec des taux de détection variables en fonction du type d'organe transplanté, de la nature du traitement immunosuppresseur, et de l'administration d'un traitement prophylactique anti-CMVH, qui peut en fonction de la molécule utilisée être également actif sur HHV-6 (De Bolle *et al.*, 2005; Caïola *et al.*, 2012; Lautenschlager & Razonable, 2012). HHV-6B est l'espèce la plus fréquemment détectée dans ce contexte et ces infections surviennent généralement dans les 2 à 4 mois qui suivent la greffe. L'infection à HHV-6 semble être mieux supportée par les patients greffés d'organes solides comparativement aux patients receveurs d'une greffe de CSH (voir paragraphe 5.3.2) même s'il faut noter que le nombre d'études menées chez des receveurs d'organes solides est beaucoup plus restreint. Chez les patients transplantés de rein, les conséquences des réactivations à HHV-6 semblent limitées, comparativement aux patients recevant une greffe hépatique. Peu de données concernant les greffes cardiaques ou pulmonaires sont disponibles dans la littérature (Tableau 4) (Lautenschlager & Razonable, 2012). Les manifestations cliniques les plus fréquemment observées dans ce contexte sont la survenue d'une fièvre et/ou d'un rash cutané et de signes non spécifiques tels qu'une leucopénie ou une thrombopénie. Des formes plus sévères ont été rapportées telles que des cas d'encéphalite, d'hépatite, de rejet ou de dysfonction du greffon, de myélosuppression et de pneumopathie (Caïola *et al.*, 2012; Griffiths *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 1997; Yamamoto *et al.*, 2014; Yoshikawa *et al.*, 2000).

Chez les patients transplantés d'organe solide, plusieurs études soulignent l'importance des interactions potentielles entre les différents membres de la sous-famille des  $\beta$ -herpesvirinae et des conséquences en terme de pathogénicité. Ainsi, HHV-6 (seul ou avec

HHV-7), via des interactions directes ou via sa capacité à moduler la réponse immunitaire de l'hôte, pourrait favoriser la réactivation du CMVH mais également la survenue d'une maladie à CMVH (DesJardin *et al.*, 1998, 2001; Griffiths *et al.*, 1999; Herbein *et al.*, 1996; Humar *et al.*, 2002; Lautenschlager *et al.*, 2002; Mendez *et al.*, 2001; Ratnamohan *et al.*, 1998).

Enfin, HHV-6, du fait de ses propriétés immunomodulatrices, et si on se réfère à ce qui se passe pour le CMVH, pourrait chez les patients transplantés faciliter la survenue d'infections opportunistes telles que les infections fongiques (Dockrell *et al.*, 1999; Rogers *et al.*, 2000) et avoir un rôle dans le rejet du greffon. Cependant, ce dernier point reste encore controversé (Lautenschlager & Razonable, 2012).

Les facteurs de risque d'infections à HHV-6 après greffe d'organe solide sont mal définis. Les traitements par anticorps monoclonaux anti-CD3 (OKT3) ou par sérum anti-lymphocytaire (SAL) ont été évoqués par certains auteurs comme étant associés à un risque plus élevé d'infections à HHV-6 (DesJardin *et al.*, 2001; Nash *et al.*, 2004; Ratnamohan *et al.*, 1998). A l'inverse, d'autres études ne mettent pas en évidence une telle association (Caïola *et al.*, 2012; Herbein *et al.*, 1996).



Tableau 4. Etudes prospectives sur l'incidence des réactivations HHV-6 après transplantation d'organe solide.

Type de greffe	Méthodes de diagnostic <sup>b</sup>	Prélèvements <sup>c</sup>	Nombre de patients	Incidence des infections à HHV-6 (%)	Signes cliniques <sup>d</sup>	Espèce	Référence
Cœur	PCR	PBMCS	21	0	Aucun	n.d.	Moschettini et al., 1998
Rein	PCR	PBMCS	107	8	Aucun	n.d.	Pacsa et al., 2003
Rein	qPCR	PBMCS	52	23	Aucun	n.d.	Kidd et al., 2000
Rein	IV, serologie	PBMCS	65	55	Aucun	n.d.	Yoshikawa et al., 1992
Rein et/ou foie	IV, serologie	PBMCS	32	31	Aucun	n.d.	Herbein et al., 1996
Rein et/ou pancréas	PCR, sérologie	Urine, sérum	30	50	Fièvre	n.d.	Ratnamohan et al., 1998
Foie	IHC	PBMCS	34	80 (10/12 CMV+)	Infection à CMVH (fièvre + dysfonction greffon)	n.d.	Lautenschlager et al., 2002
Foie	qPCR	PBMCS	200	28	Infections opportunistes, maladie à CMVH, rejet aigu du greffon	n.d.	Humar et al., 2002
Foie	qPCR, sérologie	PBMCS	33	33	Infections et maladies à CMVH	n.d.	Mendez et al., 2001
Foie	qPCR	PBMCS	88	54	Infections et maladies à CMVH	n.d.	Humar et al., 2000
Foie	PCR, IV, sérologie	Plasma	47	49	Fièvre	HHV-6B	Yoshikawa et al., 2000
Foie	IV	PBMCS	80	39	Atteintes du SNC, infections fongiques, Taux de mortalité élevé	n.d.	Rogers et al., 2000
Foie	Sérologie, IHC	PBMCS	51	22	Dysfonction du greffon	HHV-6B	Lautenschlager et al., 2000
Foie	qPCR	PBMCS	60	32	Rejet du greffon, fièvre, hépatite	n.d.	Griffiths et al., 1999
Foie	Sérologie	Sérum	247	24	Maladie à CMVH	n.d.	Dockrell et al., 1997
Foie	PCR	PBMCS	46	28	Aucun	10% HHV-6A; 90% HHV-6B	Schmidt et al.,
Foie <sup>a</sup>	qPCR	PBMCS	66	26	Association avec forme sévère de récurrence VHC	n.d.	Humar et al., 2002b
Foie <sup>a</sup>	IV	PBMCS	51	41	Association avec forme sévère de récurrence VHC	n.d.	Singh et al., 2002
Cœur/poumon ou poumon	IV, PCR	PBMCS, LBA	30	66	Taux de mortalité élevé, infections fongiques	HHV-6B	Jacobs et al., 2003
Cœur/poumon ou poumon	IHC	PBMCS, LBA	22	91	1 pneumopathie, 1 encéphalite	n.d.	Lehto et al., 2006

<sup>a</sup> Etudes chez des patients greffés hépatiques pour une hépatite C

<sup>b</sup> qPCR, PCR quantitative; IV, isolement viral par culture; IHC, immuno-histochimie

<sup>c</sup> PBMCS, cellules mononucléées du sang périphérique; LBA, lavage broncho-alvéolaire

<sup>d</sup> CMVH, cytomégalo virus humain; VHC, virus de l'hépatite C

### 5.3.2. Infections à HHV-6 après greffe de CSH

Les patients recevant une greffe de CSH semblent constituer une cible privilégiée des infections à HHV-6. C'est en tout cas chez ces patients que les manifestations cliniques potentiellement liées à ce virus sont le mieux documentées.

#### 5.3.2.1. Fréquence, cinétiques et facteurs de risque des infections à HHV-6

Les infections à HHV-6 pendant la période post-greffe de CSH sont fréquentes. En effet, quelle que soit la méthode de diagnostic retenue, la fréquence est en moyenne de l'ordre de 48% (28 à 75%, selon les études) (De Bolle *et al.*, 2005) (Tableau 6).

L'infection à HHV-6 survient précocement après la greffe généralement entre la deuxième et la quatrième semaine (Boutolleau *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 1997; Chevallier *et al.*, 2010; Hentrich *et al.*, 2005; Imbert-Marcille *et al.*, 2000; Maeda *et al.*, 1999). Néanmoins, des réactivations plus tardives au cours du deuxième mois post-greffe ont aussi été décrites (Miyoshi *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 1996). Pour certains auteurs, la survenue des infections à HHV-6 est plus précoce chez les patients recevant une autogreffe que chez ceux recevant une allogreffe (Boutolleau *et al.*, 2003; Imbert-Marcille *et al.*, 2000; Miyoshi *et al.*, 2001).

Dans la majorité des cas d'infections à HHV-6 après greffe de CSH l'espèce identifiée est l'HHV-6B (Boutolleau *et al.*, 2006b; de Pagter *et al.*, 2008b; Zerr *et al.*, 2005b) (Tableau 6). Quand l'HHV-6A est retrouvé, c'est généralement en association avec l'HHV-6B (Galièni *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 1996). Deux équipes ont néanmoins rapporté des cas de réactivations liées uniquement à l'espèce A : Zerr *et al.* (2005b) ont identifié un isolat d'HHV-6A sur les 29 testés (3%) et Radonic *et al.* ont identifié un HHV-6A dans la plasma chez 29% des patients présentant une réactivation HHV-6 durant la période post-greffe (Radonić *et al.*, 2005). Ceci pourrait s'expliquer par des différences épidémiologiques (zones géographiques différentes et acquisition plus tardive de l'HHV-6A au cours de la vie) (de Pagter *et al.*, 2008b) mais probablement également par le choix de la matrice utilisée pour la détection du virus. En effet, Nitsche *et al.* ont montré que la fréquence de détection de l'ADN de l'HHV-6A est plus élevée dans le plasma que dans les PBMCs correspondants, alors que l'ADN de l'HHV-6B est détecté de façon similaire dans les deux compartiments (Nitsche *et al.*, 2001). Ce dernier point est par ailleurs intéressant, car si ces données de discordance entre plasma et PBMCs étaient confirmées, cela indiquerait qu'il existe chez ces patients une réactivation de l'HHV-6A dans des tissus autres que les leucocytes.

Un certain nombre de facteurs de risque de survenue d'infection à HHV-6 a été identifié après greffe de CSH (résumés dans le Tableau 5), mais les résultats des différentes études restent parfois contradictoires. Une étude prospective a rapporté que le fait d'avoir un âge jeune constituait un facteur de risque (Zerr *et al.*, 2005b), alors que d'autres ne mettent en évidence aucune association entre l'âge et le risque d'infection à HHV-6 (Betts *et al.*, 2011; de Pagter *et al.*, 2008b). Deux études prospectives ont montré que les patients de sexe masculin semblent être plus à risque de développer des réactivations à HHV-6 (Betts *et al.*, 2011; Zerr *et al.*, 2005b), mais ce facteur ne ressort pas dans d'autres études (Chevallier *et al.*, 2010; Jeulin *et al.*, 2013; de Pagter *et al.*, 2013). Yoshikawa *et al.* (2002) ont mis en évidence un risque accru d'infection à HHV-6 en période post-greffe de CSH chez les patients ayant une leucémie (myéloïde ou lymphoïde) ou un lymphome comparativement aux autres pathologies. Ce lien n'a pas été retrouvé par la suite, mais d'autres ont, en revanche, mis en évidence une association entre le statut avancé de la maladie initiale au moment de la greffe et le risque de développer une réactivation à HHV-6 dans les suites de la greffe (Betts *et al.*, 2011).

Quelques études indiquent une fréquence de détection d'HHV-6 plus élevée chez les patients allogreffés que chez les patients autogreffés (Hentrich *et al.*, 2005; Wilborn *et al.*, 1994; Yoshikawa *et al.*, 2002), mais pour d'autres le type de greffe ne semble pas influencer la fréquence des infections à HHV-6 (Appleton *et al.*, 1995; Boutolleau *et al.*, 2003; Imbert-Marcille *et al.*, 2000; Miyoshi *et al.*, 2001; Savolainen *et al.*, 2005). Quoiqu'il en soit, il est important de noter ici que les cas d'infections symptomatiques, et notamment les atteintes sévères, sont pour la majorité des cas décrits après allogreffe de CSH. Par ailleurs, Maeda *et al.* ont montré que la fréquence de détection de l'HHV-6 était plus élevée chez les patients recevant un greffon médullaire que ceux recevant un greffon d'origine périphérique (Maeda *et al.*, 1999), mais ces résultats n'ont pas été confirmés par la suite (Hentrich *et al.*, 2005; Imbert-Marcille *et al.*, 2000; Ljungman *et al.*, 2000). En revanche, la fréquence des infections à HHV-6 est plus élevée parmi les patients recevant un greffon d'un donneur non apparenté ou un greffon d'un donneur non apparié pour le HLA ou le sexe (Ljungman *et al.*, 2000; Ogata *et al.*, 2006; Yamane *et al.*, 2007; Zerr *et al.*, 2005b). De plus, l'utilisation d'un greffon de sang placentaire représente un facteur de risque indépendant de survenue d'infections à HHV-6 en post-greffe comme nous l'avons montré dans une étude publiée en 2010 où nous avons mis en évidence une fréquence de réactivation de 80% dans le groupe des patients allogreffés de sang placentaire versus 42,5% parmi les patients allogreffés de CSH de

donneurs non-apparentés ( $P < 0.0001$ ) (Chevallier *et al.*, 2010). Cette association a été confortée par de nombreuses études (Betts *et al.*, 2011; Dulery *et al.*, 2012; Jeulin *et al.*, 2013; Sashihara *et al.*, 2002; Tomonari *et al.*, 2005; Yamane *et al.*, 2007; Zerr *et al.*, 2011) et confirmée par une méta-analyse (incidence des réactivations à HHV-6 significativement plus élevée après greffe de sang placentaire : 72.0 % vs 37.4% pour les autres types de greffon,  $p < 0.0001$ ) (Scheurer *et al.*, 2012).

Enfin, d'autres facteurs sont associés à un risque plus élevé de survenue d'une réactivation à HHV-6 : conditionnement myéloablatif (Chevallier *et al.*, 2010; de Pagter *et al.*, 2013) ; traitement par corticoïdes (Jeulin *et al.*, 2013; Ogata *et al.*, 2006; Zerr *et al.*, 2005b) ; et administration de SAL en prévention de la GVHD (*graft versus host disease*) (Olson *et al.*, 2014; Zerr *et al.*, 2001).

Comme nous l'avons vu précédemment, la grande majorité des cas d'infections à HHV-6 en post-greffe, compte-tenu de la séroprévalence très élevée de l'HHV-6 dans la population générale, sont liées à des réactivations endogènes ou à des réinfections, mais il faut noter que de rares cas de transmission de ciHHV-6 par le greffon, quelle qu'en soit la nature (sang placentaire ou cellules souches périphériques (CSP)), ont été rapportés (Jeulin *et al.*, 2009; de Pagter *et al.*, 2010; Purev *et al.*, 2014) sans qu'on ne connaisse les conséquences pour les patients. C'est un point qu'il ne faut pas méconnaître pour ne pas diagnostiquer à tort une infection active à HHV-6.

**Tableau 5. Facteurs de risque de la survenue d'infections à HHV-6 au cours de la période post-greffe de CSH.**

Facteur de risque <sup>a</sup>	Résultat <sup>b</sup>	Auteurs
Age	Jeune > Personnes plus âgées	Zerr <i>et al.</i> , 2005b
Sexe	Masculin > Féminin	Zerr <i>et al.</i> , 2005b; Betts <i>et al.</i> , 2011
Type d'hémopathie initiale	Leucémies et lymphomes > autres	Yoshikawa <i>et al.</i> , 2002
Statut de la maladie initiale à la greffe	Autres > 1 <sup>ère</sup> rémission	Zerr <i>et al.</i> , 2005b
Type de greffe	MO > CSP SP > MO et CSP	Maeda <i>et al.</i> , 1999 Sashihara <i>et al.</i> , 2002; Tomonari <i>et al.</i> , 2005 Yamane <i>et al.</i> , 2007; Chevallier <i>et al.</i> , 2010 Betts <i>et al.</i> , 2011; Jeulin <i>et al.</i> , 2013
Relation donneur/receveur	Non apparentée > familiale	Ljungman <i>et al.</i> , 2000
Appariement HLA donneur/receveur	Non appariés > Appariés	Ogata <i>et al.</i> , 2006; Yamane <i>et al.</i> , 2007
Appariement sexe donneur/receveur	Sexe différent > Même sexe	Zerr <i>et al.</i> , 2005b
Type de conditionnement	Myéloablatif > Intensité réduite	Chevallier <i>et al.</i> , 2010; de Pagter <i>et al.</i> , 2013
Traitement par corticoïdes	Oui > Non	Zerr <i>et al.</i> , 2005b; Ogata <i>et al.</i> , 2006; Jeulin <i>et al.</i> , 2013
Administration de SAL en prophylaxie de la GVHD	Oui > Non	Zerr <i>et al.</i> , 2001; Olson <i>et al.</i> , 2014

<sup>a</sup> HLA, antigènes des leucocytes humains; GVHD, maladie du greffon contre l'hôte; SAL, sérum anti-lymphocytaire

<sup>b</sup> MO, moelle osseuse; CSP, cellules souches périphériques; SP, sang placentaire

### 5.3.2.2. *Manifestations cliniques et biologiques chez les patients*

L'infection à HHV-6 post-allogreffe est dans la grande majorité des cas peu symptomatique, d'où un pouvoir pathogène controversé, mais un certain nombre de manifestations cliniques et biologiques sont rapportées dans la littérature (Tableau 6).

#### ❖ **Encéphalite.**

Une des complications les plus sévères consécutive à une réactivation HHV-6 est l'infection du SNC, pouvant conduire au développement d'une encéphalite limbique aiguë post-transplantation (Ogata, 2009; Wainwright *et al.*, 2001; Zerr *et al.*, 2001, 2011). Les symptômes les plus souvent rencontrés sont la confusion, les convulsions, les troubles mnésiques, le délire, l'aphasie, l'amnésie, l'ataxie et des signes d'hémiplégie. De plus, le tableau clinique peut également comporter la présence d'un SIADH (syndrome de sécrétion inapproprié d'hormone antidiurétique) (Howell *et al.*, 2012; Seeley *et al.*, 2007). Les signes cliniques sont associés à des anomalies de l'électroencéphalogramme et de l'imagerie (IRM : hypersignaux des hippocampes du complexe amygdalien). Le diagnostic d'encéphalite limbique à HHV-6 est posé devant la détection du génome d'HHV-6 par PCR dans le LCR d'un patient allogreffé de CSH présentant une symptomatologie neurologique compatible associée à des anomalies de l'imagerie cérébrale en l'absence d'autre étiologie identifiable (Ogata *et al.*, 2015).

L'encéphalite à HHV-6 est associée à un taux élevé de séquelles neurologiques à long terme (troubles de la mémoire, épilepsie du lobe temporaire) et de mortalité (jusqu'à 50% des cas), et ce malgré parfois l'instauration d'un traitement antiviral spécifique (Hill *et al.*, 2012; Muta *et al.*, 2009; Sakai *et al.*, 2011; Zerr, 2006).

La méta-analyse citée précédemment, publiée par Scheurer *et al.*, a, non seulement confirmé l'association entre réactivations HHV-6 et greffe de sang placentaire, mais elle a également mis en évidence que la greffe placentaire était associée à un risque accru d'encéphalite limbique liée à l'HHV-6 : incidence de 8.3% après allogreffe de sang placentaire versus 0.50% après les autres types d'allogreffes (Scheurer *et al.*, 2012). Par ailleurs, Olson *et al.* en étudiant une cohorte de 125 patients allogreffés de sang placentaire ne recevant pas de traitement par anti-thymoglobulines, ont observé une incidence de seulement 1.6% des cas d'encéphalite, ce qui suggère que l'administration d'anti-thymoglobulines est un facteur associé à un risque de développement d'infections sévères chez ces patients (Olson *et al.*, 2014). Enfin, le type de conditionnement est là encore à prendre en compte, les patients

recevant un conditionnement myéloablatif, semblent effectivement plus à risque d'infections sévères à HHV-6 et donc plus à risque d'encéphalite limbique post-transplantation (de Pagter *et al.*, 2013).

❖ **Retard à la sortie d'aplasie et insuffisance médullaire à distance de la sortie d'aplasie.**

La survenue d'anomalies de l'hématopoïèse suite à la greffe de CSH constitue une des manifestations cliniques propres aux infections à HHV-6 et est la complication la plus fréquemment rapportée dans ce contexte (Tableau 6). Ces anomalies peuvent être classées en deux catégories : retard à la sortie d'aplasie et insuffisance médullaire transitoire à distance de la reprise normale de l'hématopoïèse. Suite à la greffe de CSH, la sortie d'aplasie, c'est-à-dire la reprise d'une hématopoïèse normale, est définie par un nombre absolu de polynucléaires neutrophiles supérieur à  $0,5 \cdot 10^9/L$  et de plaquettes supérieur à  $50 \cdot 10^9/L$  dans le sang périphérique durant au moins deux jours consécutifs. La détection précoce d'HHV-6 en période post-greffe a été fréquemment associée à un retard à la sortie d'aplasie (Dulery *et al.*, 2012; Ljungman *et al.*, 2000; Maeda *et al.*, 1999; Ogata *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 1996; Zerr *et al.*, 2005b) comme nous l'avons montré dans deux études conduites au CHU de Nantes (Chevallier *et al.*, 2010; Imbert-Marcille *et al.*, 2000) et au cours d'une étude rétrospective menée en collaboration avec l'équipe de Virologie de la Pitié-Salpêtrière (Boutolleau *et al.*, 2003). De plus, une étude récente menée sur l'ensemble de la cohorte de patients allogreffés de sang placentaire au CHU de Nantes a retrouvé une majoration du risque d'échec de prise de greffe en cas de réactivation de l'HHV-6 pendant la période d'aplasie post-allogreffe de sang placentaire (Le Bourgeois *et al.*, 2014). Par ailleurs, à distance de la prise de greffe, des signes d'insuffisance médullaire transitoire partielle (anémie et/ou leucopénie et/ou thrombopénie), voire totale (pancytopénie), peuvent se manifester. Ce type d'anomalies a été associé à des épisodes concomitants de réactivations HHV-6 par certains auteurs (Boutolleau *et al.*, 2003; Carrigan & Knox, 1994; Drobyski *et al.*, 1993b; Imbert-Marcille *et al.*, 2000; Knox & Carrigan, 1996; Wang *et al.*, 1999b).

Afin de mieux comprendre le rôle de l'HHV-6 dans la survenue des troubles de l'hématopoïèse pendant la période qui suit la greffe de CSH, plusieurs équipes ont étudié *in vitro* les conséquences de l'infection HHV-6 de précurseurs hématopoïétiques. Knox & Carrigan (1992), ont montré que l'infection par HHV-6B provoquait une diminution de la prolifération des cellules souches pluripotentes, des progéniteurs érythroblastiques et granulo-

monocytaires, ainsi que des cellules médullaires stromales. La même équipe a réitéré ces expériences avec les deux espèces d'HHV-6, et a conclu à un effet myélosuppresseur supérieur de HHV-6A par rapport à HHV-6B (Carrigan & Knox, 1995). Par ailleurs, l'HHV-6 inhibe la maturation des macrophages médullaires (Burd *et al.*, 1993). Une équipe japonaise s'est intéressée au rôle myélosuppresseur de l'HHV-6 sur des précurseurs hématopoïétiques obtenus à partir de sang placentaire (Isomura *et al.*, 1997, 2000). Ces auteurs ont pour leur part montré que l'HHV-6B possédait un effet suppresseur plus important que l'HHV-6A au niveau des progéniteurs de toutes les lignées : progéniteurs érythroblastiques, granulo-monocytaires et mégacaryocytaires, témoignant d'une action directe du virus sur ces cellules. Enfin, l'HHV-6 est capable d'infecter les CSH totipotentes CD34+ provenant de sang placentaire et de perturber leur renouvellement et leur différenciation dans les différentes voies de l'hématopoïèse (Isomura *et al.*, 2003).

#### ❖ Autres manifestations associées à l'infection HHV-6

D'autres manifestations ont été plus rarement imputées à HHV-6. Il a en effet été associé à des épisodes de fièvre (Cone *et al.*, 1999; Imbert-Marcille *et al.*, 2000; Sashihara *et al.*, 2002) et d'éruption cutanée (Boutolleau *et al.*, 2003; Le Cleach *et al.*, 1998; Cone *et al.*, 1999; Sashihara *et al.*, 2002; Yoshikawa *et al.*, 2001b, 2002). Des cas d'atteintes pulmonaires à type de pneumopathie interstitielle ont également été rapportées (Buchbinder *et al.*, 2000; Carrigan *et al.*, 1991; Cone *et al.*, 1993a; Hentrich *et al.*, 2005). De manière ponctuelle, l'HHV-6 a également été impliqué dans des troubles hépatiques, digestifs (diarrhées) et des cas de microangiopathies thrombotiques (Amo *et al.*, 2003; Ljungman *et al.*, 2000; Matsuda *et al.*, 1999; Takatsuka *et al.*, 2003). Comme dans le cas des transplantations d'organe solide, plusieurs auteurs prêtent à HHV-6 un rôle dans la survenue des infections à CMV (Betts *et al.*, 2011; Kadakia *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2002; Yamane *et al.*, 2007; Zerr *et al.*, 2012), alors que d'autres ne mettent en évidence aucun lien (Chevallier *et al.*, 2010; Dulery *et al.*, 2012; Jeulin *et al.*, 2013).

Plusieurs auteurs ont mis en évidence une relation entre GVHD et infections à HHV-6 au cours de la période post-greffe (Appleton *et al.*, 1995; Dulery *et al.*, 2012; de Pagter *et al.*, 2013, 2008b; Wilborn *et al.*, 1994; Zerr *et al.*, 2005b). En fait, la détection de ce virus semble plutôt associée au degré de sévérité de la GVHD (Boutolleau *et al.*, 2003; Imbert-Marcille *et al.*, 2000; Yamane *et al.*, 2007; Zerr *et al.*, 2012). Cependant, au-delà de ces données statistiques, certaines questions subsistent. En particulier, il reste difficile de déterminer



sil'infection à HHV-6 est la cause ou la conséquence de la GVHD.

**Tableau 6. Etudes sur l'incidence des réactivations HHV-6 après greffe de CSH (suite du tableau page suivante)**

Type d'étude	Groupe de patients (âge médian, intervalle, en année)	Méthodes de diagnostic; fréquence	Nature prélèvements	Incidence des réactivations à HHV-6	Délai médian de survenue de la réactivation HHV-6 (semaines)	Facteurs de risque de réactivation à HHV-6	Signes cliniques associés	Espèce	Référence
P	57 patients HSCT : 36 allo et 24 auto (21; 2-53)	PCR; 1x/sem	PBMC	36/57 (63%)	5 (2-10)	n.s.	GHVD aiguë	HHV-6B: 89% HHV-6A: 11%	Wilborn <i>et al.</i> , 1994
P	57 patients HSCT : 34 allo et 23 auto	PCR nichée	PBMC	43/57 (75%)	n.d.	n.d.	GHVD aiguë	n.d.	Appleton <i>et al.</i> , 1995
P	37 patients allo-HSCT (35; 5-59)	PCR nichée	PBMC	26/37 (70%)	n.s.	n.s.	Reconstitution PNN & plq retardée	HHV-6B	Wang <i>et al.</i> , 1996
P	26 patients HSCT : 15 allo et 11 auto (40; 22-60)	PCR, culture, sérologie	PBMC, salive	12/26 (46%)	4 (2-20)	n.s.	Infection à HCMV (allo), sinusite (auto)	HHV-6B	Kadokia <i>et al.</i> , 1996
P	61 patients HSCT : 51 allo et 10 auto (33; 3-50)	sqPCR; 1x/sem	PBMC	17/61 (28%)	3-4 (1-12)	n.s.	n.s.	HHV-6B	Chan <i>et al.</i> , 1997
P	38 patients allo-HSCT (33; 6-54)	PCR nichée et sqPCR	PBMC	17/38 (44,7%)	3-4	Greffe de MO	Reconstitution plq retardée	HHV-6B	Maeda <i>et al.</i> , 1999
P	74 patients allo-HSCT (38; 4-55)	qPCR; 2x/mois	PBMC	58/74 (78%)	n.d.	Donneur non-apparenté; IglV	Reconstitution plq retardée	n.d.	Ljungman <i>et al.</i> , 2000
P	92 patients HSCT : 28 allo et 64 auto (45; 3-65)	PCR; 1-2x/15 jours	PBMC	39/92 (42,5%)	2,6 (1-16,7)	Greffe de MO	Fièvre; anémie; reconstitution PNN & plq retardée	HHV-6B	Imbert-Marcille <i>et al.</i> , 2000
P	21 patients allo-HSCT (41; 21-55)	qPCR	PBMC	17/21 (81%)	n.d.	n.d.	Réactivation HCMV	HHV-6B	Wang <i>et al.</i> , 2002
P	27 patients allo-HSCT (7; 1-17)	qRT-PCR; 1x/sem	PBMC, plasma	16/27 (59%)	n.d.	Greffe de SP (PBMC > plasma)	n.s.	HHV-6B	Sashihara <i>et al.</i> , 2002
P	19 patients allo-HSCT	PCR; 1x/sem	PBMC	19/41 (46%)	n.d.	n.d.	Lésions endothéliales vasculaires	n.d.	Takatsuka <i>et al.</i> , 2002
P	82 patients HSCT: 72 allo et 10 auto (8; 2-14)	Culture	PBMC	31/82 (37,8%)	2	Allogreffe; leucémie et lymphome	Rash cutané	HHV-6B	Yoshikawa <i>et al.</i> , 2002
R	78 patients HSCT: 26 allo et 52 auto (44; 3-65)	qRT-PCR; 1-2x/2 sem	PBMC	31/78 (39,7%)	2,7 (0-6,7)	n.d.	Reconstitution PNN retardée; GVHD aiguë	HHV-6B	Boutolleau <i>et al.</i> , 2003

Tableau 6. Etudes sur l'incidence des réactivations HHV-6 après greffe de CSH (suite)

Type d'étude	Groupe de patients (âge médian, intervalle, en année)	Méthodes de diagnostic; fréquence	Nature prélèvements	Incidence des réactivations à HHV-6	Délai médian de survenue de la réactivation HHV-6 (semaines)	Facteurs de risque de réactivation à HHV-6	Signes cliniques associés	Espèce	Référence
P	228 patients HSCT: 197 allo et 31 auto (40; 14-63)	PCR nichée; 1x/sem	PBMC	96/228 (41,9%)	3,7 (0,6-20,2)	Allogreffe; donneur non-apprenté	GVHD; réactivations EBV	n.d.	Hentrich <i>et al.</i> , 2004
P	50 patients allo-HSCT (41; 12-59)	qRT-PCR; 1x/sem	Plasma	24/50 (48%)	2,6 (0-6,8)	Mésappariement HLA D/R; corticoïdes	Reconstitution plq retardée; encéphalite limbique (CV élevée)	n.d.	Ogata <i>et al.</i> , 2005
R	82 allo-HSCT (39; 17-64)	qRT-PCR; 1x/sem	Plasma	HHV-6A: 24/82 (29%) HHV-6B: 35/82 (43%)	HHV-6A: 5,4 (1-33) HHV-6B: 5,8 (0,7-30,3)	Retard	HHV-6B: reconstitution plq retardée	HHV-6A HHV-6B	Radonic <i>et al.</i> , 2005
P	110 patients allo-HSCT (42; 20-63)	qRT-PCR; 1x/sem	Plasma	52/110 (47%)	3,3 (2,7-4)	Mésappariement sexe D/R; sexe masculin; statut maladie >1 rémission: âge jeune	Reconstitution monocytes & plq retardée; OS; aGVHD; troubles SNC	HHV-6B: 97% HHV-6A: 3 %	Zerr <i>et al.</i> , 2005
P	60 patients allo-HSCT (8; 2-20)	PCR, IHC	Sang total, PBMC	27/49 (55%)	3 (0-24)	Conditionnement avec TBI	Reconstitution GR & plq retardée	HHV-6B	Savoleinen <i>et al.</i> , 2005
P	72 patients allo-HSCT (28; 8-58)	qRT-PCR; 1x/sem	PBMC	35/72 (49%)	3 (1-12)	n.d.	Rash cutané; réactivation HCMV	HHV-6B: 97% HHV-6A: 3%	Wang <i>et al.</i> , 2006
P	46 patients allo-HSCT (47; 20-63)	qRT-PCR; 1x/sem	Plasma	22/46 (47,8%)	3 (2-5)	Greffe de SP; mésappariement HLA D/R; tacrolimus; faible taux d'IgG anti HHV-6	Réactivation HCMV	HHV-6B	Yamane <i>et al.</i> , 2007
P	58 patients allo-HSCT (8; 0-18)	qRT-PCR; 1x/sem	Plasma	39/58 (67%)	2,3 (0-17)	n.s.	GVHD aiguë et chronique; NRM; OS	n.d.	de Pagter <i>et al.</i> , 2008
R	55 patients allo-HSCT (50; 20-65)	qRT-PCR; 1x/sem	Sang total	29/55 (53%)	SP: 5,1 (2,3-10,6) CSP: 8,3 (3,4-14,3)	Greffe de SP; conditionnement MA	Reconstitution PNN & plq retardée	HHV-6B	Chevallier <i>et al.</i> , 2010
P	82 patients allo-HSCT (24; 1-67)	qPCR; 1x/sem	Sang total	46/82 (56%)	3,3 (1,4-24)	Sexe masculin; mésappariement D/R; sexe et/ou HLA	Fièvre; rash cutané; réactivation HCMV	n.d.	Betts <i>et al.</i> , 2011
P	312 patients allo-HSCT (>50; ≤20->50)	qRT-PCR; 2x/sem	Plasma	111/315 (35%)	3 (2-4)	n.d.	Réactivation HCMV; GVHD aiguë (CV élevée); NRM (CV élevée)	n.d.	Zerr <i>et al.</i> , 2012
P	235 patients allo-HSCT (42; 3-63)	qPCR; 1x/sem	Sang total	112/235 (48%)	4 (1-13)	Conditionnement MA	Reconstitution plq retardée; mortalité précoce; GVHD aiguë	n.d.	Dulery <i>et al.</i> , 2012
R	108 patients allo-HSCT (40; 17-65)	qRT-PCR; 1x/sem	Plasma	18/108 (17%)	2,6 (0-5)	Conditionnement MA	GVHD aiguë; NRM; OS	n.d.	de Pagter <i>et al.</i> , 2013
R	220 patients allo-HSCT (25; 10,5-44)	PCR & qRT-PCR	Non précisée	44/120 (20%)	n.d.	Greffe de SP; conditionnement MA; GVHD aiguë; corticoïdes	n.s.	n.d.	Jeulin <i>et al.</i> , 2013

P, prospective; R, rétrospective; HSCT, greffe de cellules souches hématopoïétique (CSH); allo-HSCT, greffe allogénique de CSH; auto-HSCT, auto, autogreffe de CSH; qPCR, PCR quantitative; qRT-PCR, PCR quantitative en temps-réel; IHC, immunohistochimie; sem, semaine; PBMC, cellules mononucléées du sang périphérique; SP, sang placentaire; CSP, cellules souches périphériques; MO, moelle osseuse; MA, myéloablatif; GVHD, maladie du greffon contre l'hôte; TBI, irradiation corporelle totale; D/R, donneur/receveur; HHV-6, herpesvirus humain de type 6; HCMV, cytomégalo virus; EBV, Epstein Barr virus; NRM, mortalité non liée à la rechute; OS, survie globale; CV, charge virale; PNN, polynucléaires neutrophiles; plq, plaquettes; GR, erythrocytes; n.d., non déterminé; n.s., non significatif

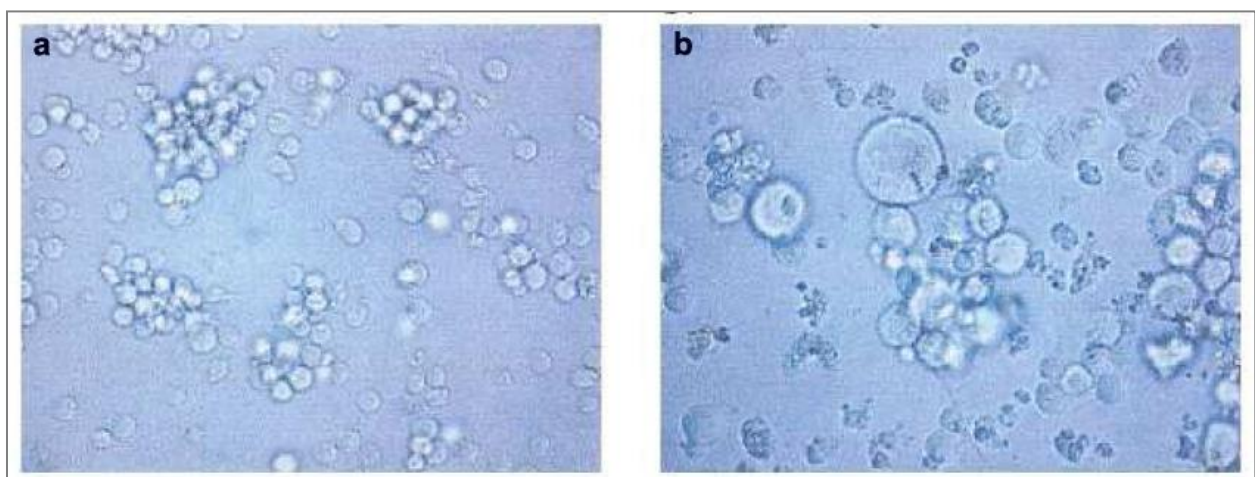
## 6. Méthodes de diagnostic virologique

Il existe différentes techniques virologiques pour établir le diagnostic d'une infection à HHV-6 (Tableau 7). Néanmoins, comme pour les autres herpesvirus, le choix de la méthode utilisée dépend du contexte, selon qu'il s'agit de déterminer un statut sérologique d'un individu ou de mettre en évidence une infection active à HHV-6A ou HHV-6B.

### 6.1. Diagnostic direct

#### 6.1.1. Isolement viral en culture cellulaire

L'isolement des HHV-6 en culture de cellules, qui a permis la découverte de ce virus à partir de sang, est la méthode de référence pour la détection de l'infection active et (Salahuddin *et al.*, 1986). Cette technique consiste à mettre en co-culture, dans un milieu contenant de l'IL-2, des PBMCs de patients avec des PBMCs issues de donneurs sains (ou des CBMCs) préalablement activées par de la PHA. Le suivi de l'infection s'effectue par observation des cultures au microscope pendant 2 à 3 semaines afin de détecter l'apparition d'un ECP (cellules ballonnées et réfringentes, Figure 13). En l'absence d'ECP visible, la confirmation d'une répllication d'HHV-6 doit être apportée par la détection d'antigènes ou du génome viral. HHV-6A et HHV-6B ayant le même ECP, le typage du virus doit être réalisé à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques ou par des techniques de biologie moléculaire. Cette méthode d'isolement reste toutefois longue, fastidieuse et peu sensible, ce qui ne permet pas l'utilisation de cette technique en laboratoire de routine.



**Figure 13. Isolement de l'HHV-6 en culture cellulaire.** a) cellules lymphoblastiques saines b) cellules lymphoblastiques infectées par l'HHV-6 (souche GS) (x200)

### **6.1.2. Détection des antigènes viraux**

Les antigènes d'HHV-6 peuvent être détectés par des anticorps monoclonaux spécifiques. Certains de ces anticorps réagissent avec des protéines d'HHV-6A et d'HHV-6B (Foà-Tomasi *et al.*, 1992; Okuno *et al.*, 1992), alors que d'autres sont spécifiques d'HHV-6A ou B (Aubin *et al.*, 1993; Campadelli-Fiume *et al.*, 1993; Pellett *et al.*, 1993) et permettent donc de typer le virus. Ces différents anticorps peuvent être utilisés pour rechercher la présence du virus dans des cultures de cellules *in vitro* (immunochimie ou immunofluorescence), où au niveau de coupe tissulaire (immunohistochimie) afin de localiser précisément le virus dans un organe infecté. Par ailleurs, des techniques de recherche directe de certains antigènes viraux dans les PBMCs de patients ont été développées pour diagnostiquer des infections virales actives chez des patients greffés (Lautenschlager *et al.*, 2002). Ces techniques s'apparentent à la méthode d'antigénémie du CMVH permettant de détecter la phosphoprotéine 65 (pp65) dans les polynucléaires neutrophiles. Une détection d'antigènes d'HHV-6 est la preuve d'une infection active.

### **6.1.3. Détection et quantification du génome viral**

La détection de l'ADN génomique de HHV-6A et HHV-6B est effectuée de manière générale par amplification génique (PCR : *polymerase chain reaction*). De nombreux systèmes ont été développés afin de détecter le génome viral (PCR simple ou nichée à l'aide d'amorces spécifique, suivi ou non d'hybridation moléculaire à l'aide de sondes spécifiques du HHV-6) (Collandre *et al.*, 1991; Cone *et al.*, 1993b; Huang *et al.*, 1992).

Certaines de ces techniques de PCR qualitative, dont la sensibilité est parfois très élevée, conduisent à l'amplification du génome de virus latent. Il est donc difficile dans ces conditions de poser le diagnostic d'infection virale active. La quantification du génome viral peut aider à définir le caractère répliatif ou non du virus quand celui-ci est détecté dans un échantillon biologique. La technologie de PCR en temps réel a permis de mettre au point des outils de quantification virale particulièrement performants, notamment pour l'HHV-6 (Collot *et al.*, 2002; Locatelli *et al.*, 2000; Razonable *et al.*, 2002; Zerr *et al.*, 2000). Gautheret-Dejean *et al.* ont mis au point une technique de PCR en temps réel, utilisant la technologie TaqMan®, permettant de quantifier indifféremment les génomes des deux espèces HHV-6A et HHV-6B, par l'amplification d'une région au niveau des gènes U65-U66. Cette technique est celle que nous utilisons au laboratoire de Virologie du CHU de Nantes (Gautheret-Dejean *et al.*, 2002).

La distinction entre les deux espèces d'HHV-6 peut être effectuée grâce à différentes méthodes : analyse du profil de restriction enzymatique, amplification avec des amorces spécifiques de chaque variant, ou encore hybridation des produits de PCR avec des sondes spécifiques (Aubin *et al.*, 1991, 1994). Des méthodes de PCR en temps réel fondées sur l'analyse des courbes de fusion (Razonable *et al.*, 2002; Safronetz *et al.*, 2003) ou sur l'utilisation d'amorces spécifiques d'espèces ont été développées (Boutolleau *et al.*, 2006b)

La reclassification récente par l'ICTV en 2 espèces distinctes suggère la nécessité de différencier les infections à HHV-6A des infections à HHV-6B afin notamment, de mieux caractériser l'histoire naturelle de ces infections et mieux définir leur implication clinique respective. Ainsi, les équipes travaillant sur l'étude des infections à HHV-6, devraient pouvoir disposer d'une technique de détection et de quantification par PCR des génomes viraux complétée d'une technique permettant le diagnostic précis de l'espèce mise en cause (PCR spécifique ou technique de séquençage d'une région variable, par exemple).

#### **6.1.4. Détection des transcrits viraux**

L'amplification des ARNm viraux, très précoces, précoces ou tardifs, constitue une autre stratégie pour détecter une infection à HHV-6. Cette méthode permet notamment de suivre l'expression séquentielle des différents gènes viraux et la détection d'ARNm tardifs, transcrits lors d'une réplication virale complète, permet *a priori* de mettre en évidence une infection virale active. Ainsi, plusieurs équipes ont développé des systèmes de détection de transcrits d'HHV-6 (Mirandola *et al.*, 1998; Norton *et al.*, 1999; Pradeau *et al.*, 2006; Yoshikawa *et al.*, 2003). Ces techniques sont fondées sur la réalisation d'une rétrotranscription (RT) de l'ARN, suivie d'une PCR nichée, ce qui suppose de prendre des précautions pour éviter tout risque de contamination. Au sein de notre laboratoire, André-Garnier *et al.* ont mis au point, une méthode de RT-PCR en une seule étape permettant de détecter les transcrits provenant de l'épissage alternatif tardif, preuve de la multiplication du virus (André-Garnier *et al.*, 2003). Plus récemment, notre équipe a développé une technique de RT-PCR quantitative en temps réel détectant les ARNm des gènes U90 (très précoce) et U100 (tardif). L'évaluation de cette méthode chez des patients allogreffés de CSH a montré que, ces ARNm viraux étaient détectés chez des patients ayant une ADNémie HHV-6 supérieure à  $1.10^3$  copies/mL de sang. Cette méthode semble donc constituer un outil de diagnostic intéressant pour discriminer une infection active d'une infection latente (Bressollette-Bodin *et al.*, 2014). Toutefois, ces méthodes de détection d'ARNm viraux sont délicates à utiliser pour diagnostiquer des

infections virales actives chez les patients, car les conditions de prélèvement et de conservation des échantillons biologiques assurant une bonne conservation des ARN sont contraignantes et semblent peu applicables, en systématique, à la pratique hospitalière.

## 6.2. Diagnostic indirect

Le diagnostic indirect ou sérologique est basé sur la détection d'anticorps, IgG et/ou d'IgM contre l'HHV-6 dans le sérum du patient. Les deux techniques principalement utilisées dans le cadre du sérodiagnostic d'HHV6 sont représentées par la technique d'immunofluorescence indirecte (IFI) (Robert *et al.*, 1990) et les techniques immuno-enzymatiques de type ELISA (Sloots *et al.*, 1996).

Les méthodes par immunofluorescence permettent de détecter séparément les IgG et les IgM grâce à l'anticorps conjugué utilisé (Irving & Cunningham, 1990).

La présence des IgM est fréquemment interprétée comme indicatrice d'une primo-infection ou d'une réactivation virale. Cependant, des études associant leur recherche à celle du diagnostic direct, ont montré que les IgM anti HHV-6 étaient retrouvées en dehors de tout contexte d'infection active confirmée suggérant la possibilité de réactions croisées avec notamment les autres  $\beta$ -*Herpesvirinae* (Foà-Tomasi *et al.*, 1996).

Actuellement, aucune méthode sérologique ne permet de distinguer les anticorps spécifiquement dirigés contre l'une ou l'autre des espèces d'HHV-6.

La sérologie présente un intérêt modeste pour le diagnostic d'infection à HHV-6 chez les sujets immunodéprimés, du fait de la séoprévalence élevée de ce virus dans la population générale et de la présence inconstante d'une réponse anticorps chez ces patients. La principale indication d'un test sérologique reste le diagnostic de primo-infection avec mise en évidence d'une séroconversion IgG, et son utilisation pour des études d'épidémiologie (Agut *et al.*, 2015).

**Tableau 7. Méthodes de diagnostic virologique des infections à HHV-6A et HHV-6B (adapté de Agut *et al.*, 2015).**

Type de diagnostic	Méthode	Avantages et intérêt	Inconvénients et limites
Indirect	Détection des IgG et des IgM (IFI, ELISA) et tests d'avidité	Echantillons de sérum faciles à collecter et à stocker, technique facilement accessible, diagnostic de primo-infection, études de séroprévalence	Interprétation difficile pour le diagnostic de réactivation, pas de discrimination entre HHV-6A et HHV-6B, réponse anticorps altérée en cas d'immunodépression, réaction croisée avec les autres $\beta$ -herpesvirus
Direct	Isolement viral en culture cellulaire	Méthode de référence, mise en évidence d'une infection active	Méthode laborieuse, longue, chère et de faible sensibilité
	Détection des antigènes viraux	Facile à mettre en œuvre, permet la mise en évidence de la production de protéines virales, possibilité de distinction entre HHV-6A et HHV-6B	Besoin de standardisation, sensibilité limitée
	PCR qualitative	Sensibilité et spécificité élevée, discrimination entre HHV-6A et HHV-6B	Ne permet pas de distinction entre infection active, latente et ciHHV-6
	PCR quantitative en temps réel	Sensibilité et spécificité élevée, discrimination entre HHV-6A et HHV-6B, permet suivi longitudinal et comparaison charge virale sanguine vs tissulaire	Besoin de standardisation internationale, nécessité d'établir des seuils pour définir une infection active, un ciHHV-6
	Détection des transcrits viraux par RT-PCR	Distinction entre infection active et latente	Sensibilité limitée (à évaluer), besoin de standardisation

IFI, immunofluorescence indirecte; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; RT-PCR, reverse transcriptase PCR; ciHHV-6, intégration chromosomique de l'HHV-6

### 6.3. Problématiques liées au diagnostic des infections à HHV-6

Le manque de standardisation des différentes méthodes et l'absence de consensus sur les critères permettant de distinguer une infection latente d'une infection active rendent difficiles le diagnostic des infections à HHV-6. Comme nous l'avons vu, la sérologie est très peu contributive ; la recherche virale par l'isolement en co-culture avec des PBMCSs met en évidence l'infection active mais cette méthode est laborieuse, longue et manque de sensibilité ; l'utilisation de la PCR quantitative permet d'avoir une quantification rapide, sensible et de déterminer la charge virale sanguine mais, en l'absence de consensus ne permet pas de trancher formellement entre une infection active ou un virus à l'état latent dans la cellule ; enfin la détection de transcrit tardif par RT-PCR est plutôt en faveur d'une infection active mais des transcrits viraux peuvent être détectés aussi à l'état de latence.

La PCR quantitative en temps réel est considérée comme la technique de référence, à l'heure actuelle, pour réaliser le diagnostic d'infections à HHV-6 et une charge virale



supérieure ou égale à  $1.10^3$  copies/mL de sang semble être le seuil admis par l'ensemble de la communauté scientifique, pour permettre de distinguer une infection active à HHV-6 d'une infection latente (Agut *et al.*, 2015). La cinétique d'augmentation de la charge virale ADN peut également être un indicateur d'infection active.

Enfin, il est important de rappeler ici que la mise en évidence d'une charge virale élevée ( $\geq 10^4$ - $10^5$  copies/mL de sang ou de plasma) doit faire évoquer la présence de ci-HHV6, qui le cas échéant pourra être confirmée ou infirmée par une recherche du génome viral dans un follicule pileux par exemple (Hubacek *et al.*, 2007, 2009; Ward *et al.*, 2006)

## **7. Traitement antiviraux**

### **7.1. Indications de traitement des infections à HHV-6**

Si les infections à HHV-6 chez le sujet immunocompétent (enfant ou adulte) sont généralement limitées et ne nécessitent pas de traitement, les infections chez les immunodéprimés, et en particulier chez les patients allogreffés de CSH, peuvent dans certains cas nécessiter le recours à une chimiothérapie antivirale.

Il n'y a pas de consensus international à l'heure actuelle sur le fait de traiter ou non une infection à HHV-6 (Agut, 2011). Ceci inclut aussi bien les notions de traitements prophylactiques, préemptifs ou curatifs. Cette indécision est liée principalement à la faible pathogénicité du virus et à la toxicité des traitements disponibles. Les essais de traitements prophylactiques (Ogata *et al.*, 2013; Rapaport *et al.*, 2002; Tokimasa *et al.*, 2002) ou préemptifs (Ishiyama *et al.*, 2011; Ogata *et al.*, 2008) ne sont pas concluants, en particulier sur la survenue des encéphalites à HHV-6. En ce qui concerne un traitement curatif, la seule indication reconnue est l'encéphalite limbique à HHV-6, maladie pour laquelle le lien de cause à effet entre le virus et la symptomatologie clinique est communément admis aujourd'hui. Cette recommandation émane à la fois du Forum international sur la prise en charge des infections à herpesvirus (Dewhurst, 2004) et de la Conférence Européenne sur la prise en charge des infections survenant chez les patients leucémiques (Ljungman *et al.*, 2008).

Pour les autres cas d'infections à HHV-6 (y compris les retards à la prise de greffe de CSH), les décisions relatives à un traitement sont difficiles et reposent sur un certain nombre d'arguments et sur l'appréciation générale du clinicien. La responsabilité d'HHV-6 dans la

survenue d'un symptôme ou d'une maladie peut être suspectée devant plusieurs éléments : le terrain (patient avec déficit immunitaire), la chronologie entre l'apparition des signes cliniques et la détection de l'infection à HHV-6, la correspondance entre les signes cliniques et le site de détection du virus, l'absence d'autres pathogènes détectés pouvant expliquer la symptomatologie (en particulier le CMVH), l'établissement antérieur d'une association entre le virus et la manifestation clinique observée, finalement une charge virale relativement élevée ( $>1.10^3$  copies/mL de sang) en l'absence de documentation d'HHV-6 intégré au génome (Agut, 2011).

## 7.2. Traitements disponibles

Aucun protocole de chimiothérapie antivirale n'est encore clairement établi et les patients sont pris en charge au cas par cas, en fonction d'autres pathologies concomitantes et des effets secondaires des molécules.

Actuellement, les drogues utilisées sont les mêmes que celles utilisées en pratique clinique pour le traitement des infections à CMVH : un analogue nucléosidique, le ganciclovir (GCV), un analogue nucléotidique cidofovir (CDV) et un analogue de pyrophosphate, le foscarnet (ou acide phosphonoformique, PFA) (Figure 14).

L'aciclovir (ACV), molécule antivirale active sur les HSV et le virus de la varicelle et du zona (VZV), est actif *in vitro* sur l'HHV-6, mais seulement à des concentrations élevées ne pouvant être obtenues *in vivo*, ce qui explique l'exclusion de cette molécule de l'arsenal thérapeutique anti HHV-6 (Agut *et al.*, 2015).

Les trois molécules précédemment citées sont actives aussi bien sur l'HHV-6A que l'HHV-6B *in vitro* (Agut *et al.*, 1991) et ont toutes pour cible l'ADN-polymérase virale. Ils vont agir par compétition avec les nucléotides naturels et entraîner soit un arrêt complet, soit un ralentissement de l'élongation de la chaîne d'ADN viral en cours d'élongation lors de la réplication du génome du virus (Figure 15). Les analogues nucléosidiques (ACV et GCV) sont des prodrogues qui doivent être triphosphorylées avant d'interagir avec la synthèse de l'ADN viral. La première phosphorylation est assurée par une phosphotransférase virale (codée le gène U69), alors que les deux suivantes sont effectuées par des kinases cellulaires. Le CDV est monophosphorylé, sa transformation en métabolite actif nécessite donc uniquement l'intervention de kinases cellulaires. Quant au PFA, il est directement actif, sans transformation préalable.

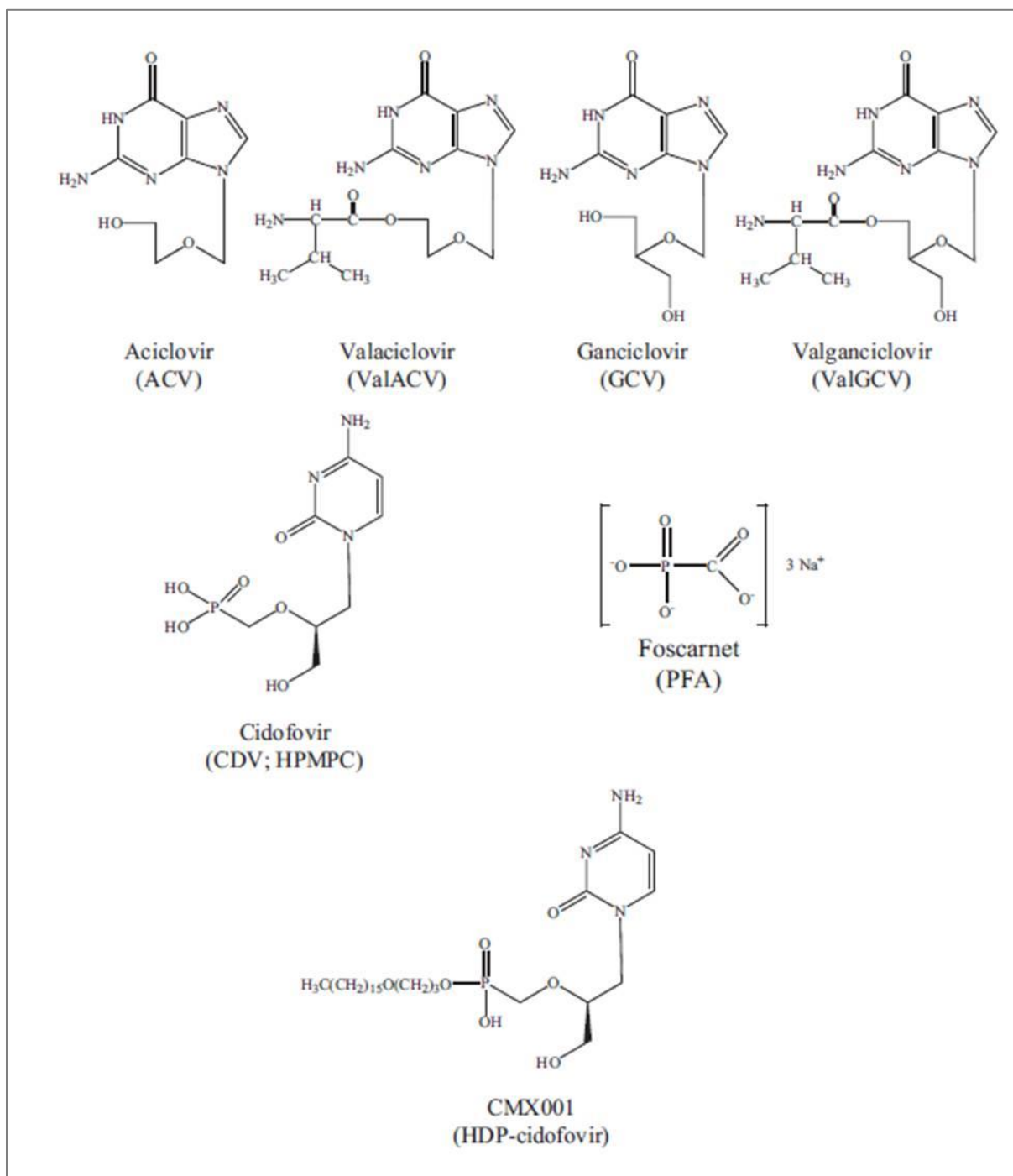
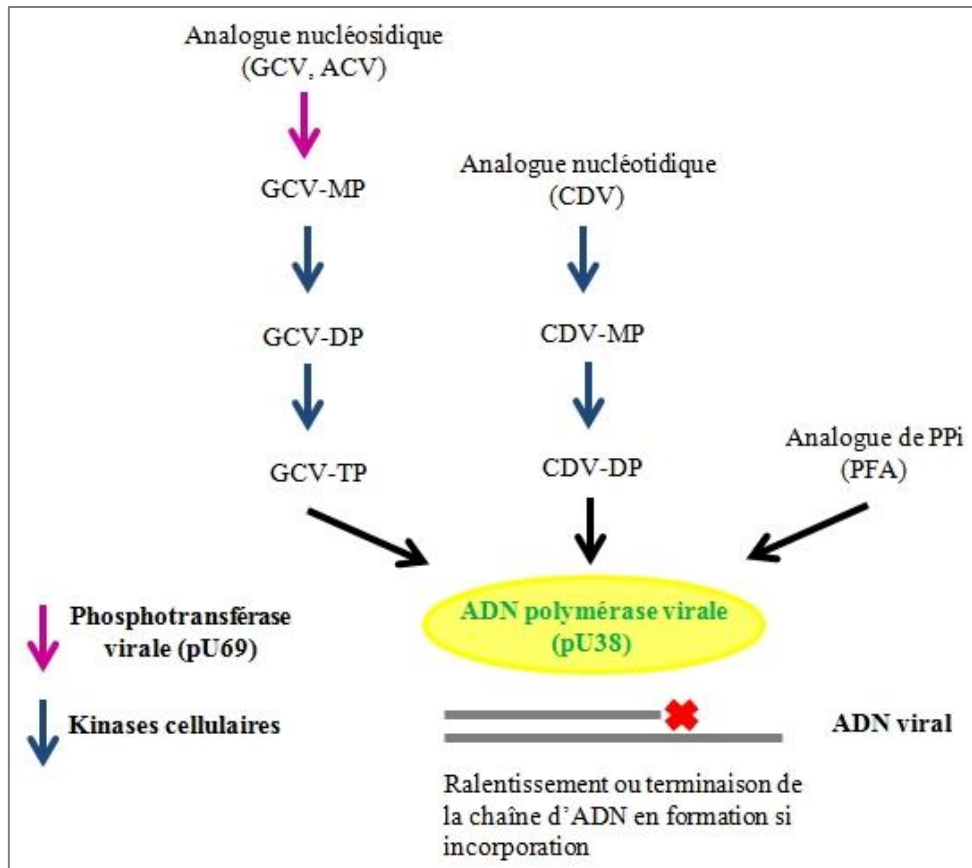


Figure 14. Structure chimique des molécules antivirales actives sur l'HHV-6.



**Figure 15. Métabolisme et mécanismes d'action des antiviraux anti HHV-6.**  
*GCV, ganciclovir ; ACV, aciclovir ; CDV, cidofovir ; PFA, foscarnet ; MP, monophosphate ; DP, diphosphate ; TP, triphosphate ; PPI, pyrophosphate*

Comme dit précédemment, aucun essai contrôlé n'a été conduit sur le traitement *in vivo* des infections à HHV-6, mais quelques cas ont été rapportés, principalement dans le cadre d'encéphalite à HHV-6 survenant chez des patients allogreffés de CSH. L'instauration d'un traitement pas GCV seul, PFA seul, ou les deux molécules associées, a permis la régression des symptômes dans un certain nombre de cas (Camus *et al.*, 2015; Cole *et al.*, 1998; Mookerjee & Vogelsang, 1997; Muta *et al.*, 2005, 2009; Rieux *et al.*, 1998; Zerr, 2006). Néanmoins, malgré l'instauration d'un traitement antiviral, plus de la moitié des patients allogreffés de CSH ayant présenté une encéphalite limbique à HHV-6 développent des séquelles neurologiques tels que des troubles de la mémoire, ou décèdent de leur encéphalite (Muta *et al.*, 2009; Ogata *et al.*, 2015). Ceci montre que l'efficacité d'un traitement antiviral curatif quand l'encéphalite est diagnostiquée semble insuffisante.

Au vu des mécanismes d'action des molécules utilisées et au vu de ce qui observé pour le CMVH, l'émergence de souches d'HHV-6 présentant des mutations de résistances sur le gène codant pour la phosphotransférase (U69), conférant une résistance ou GCV ou sur le gène

codant pour la polymérase virale (U38) est à craindre. Ainsi même si elles restent encore anecdotiques, des résistances aux antiviraux commencent à être observées chez des patients (Bonnafous *et al.*, 2012; Manichanh *et al.*, 2001)

Les molécules dont nous disposons actuellement pour le traitement des infections à HHV-6, en plus d'avoir un certain coût, d'être potentiellement inefficaces sur des souches résistantes et de leur voie d'administration (intraveineuse), posent surtout un problème lié aux effets secondaires qui découlent de leur utilisation. En effet, malgré leur sélectivité pour les enzymes virales, elles posent le problème d'une toxicité hématopoïétique (neutropénie) pour le GCV et rénale pour le PFA et le CDV. De plus, il faut noter que ces molécules ne sont pas formellement approuvées pour le traitement des infections à HHV-6 et ne sont actuellement indiquées que pour la prise en charge des infections à CMVH.

D'autres analogues nucléosidiques ou nucléotidiques potentiellement efficaces sont en cours de développement préclinique ou en phase d'essai clinique. Le brincidofovir, connu sous le nom de CMX001 (Figure 14), est un dérivé ester-lipidique du CDV, actif contre un large spectre de virus à ADN comprenant les herpesvirus, semble être prometteur. Il présente plusieurs avantages par rapport au CDV, comme une faible toxicité rénale, une administration par voie orale et une bonne diffusion au niveau du SNC avec un passage plus efficace de la barrière hémato-encéphalique (Painter *et al.*, 2012). L'artesunate est un dérivé de l'artémisine, utilisé dans le traitement de la malaria. Son efficacité *in vitro* a été démontrée sur plusieurs herpesvirus tel que le CMVH ou l'HHV-6, et il a été utilisé dans le traitement d'infections à CMVH à titre compassionnel. Un cas dans la littérature a rapporté son utilisation pour une infection à HHV-6 : il s'agissait du cas d'un enfant atteint de myocardite aiguë à HHV-6 traitée efficacement avec cette molécule (Hakacova *et al.*, 2013). D'autres composés antiviraux en développement, ont montré une activité anti HHV-6 comme des analogues nucléosidiques/nucléotidiques, SS2242, A-5021, cyclopropavir et 3-deaza-HMPTA et un inhibiteur non nucléosidique, le CMV423 (Bonnafous *et al.*, 2012).

A côté des molécules spécifiques antivirales, le développement de l'immunothérapie adoptive constitue une voie thérapeutique alternative séduisante, en particulier pour le traitement des infections virales chez les patients allogreffés de CSH. Ce type de thérapie consiste à administrer aux patients des lymphocytes T virus-spécifiques générés *in vitro* et ainsi de restaurer une immunité cellulaire spécifique permettant le contrôle de l'infection virale (Figure 16). De plus, l'équipe du Dr Leen, a montré qu'il est possible de générer des

lymphocytes T multivirus-spécifiques (anti- ADV, EBV, CMVH, BKPyV et HHV-6) permettant d'envisager le traitement concomitant de plusieurs infections virales opportunistes. Cette stratégie thérapeutique doit cependant être validée au cours d'essais cliniques (Gerdemann *et al.*, 2012a, b; Leen *et al.*, 2013; Papadopoulou *et al.*, 2014)

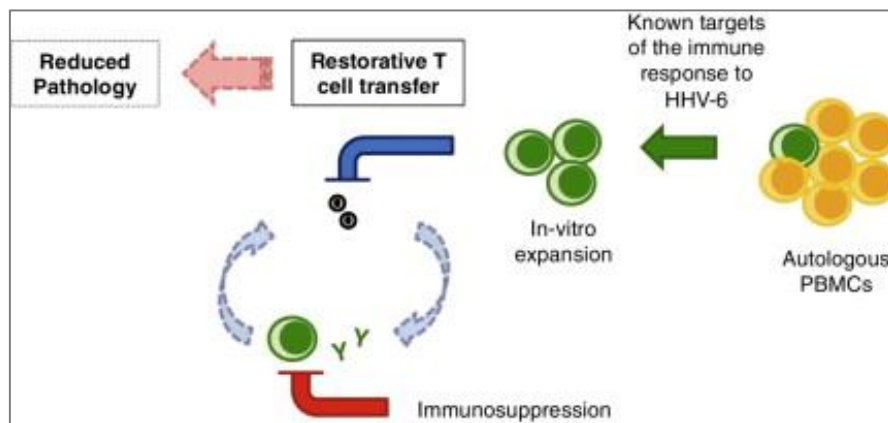


Figure 16. Principe de l'immunothérapie adoptive (Becerra *et al.*, 2014).

---

**PARTIE EXPERIMENTALE**

Comme il a été évoqué dans les rappels bibliographiques, plusieurs études ont mis en évidence une association entre infection à HHV-6 et l'utilisation d'unités de sang placentaire (SP) comme source de greffon lors d'une greffe allogénique de CSH. Notre équipe a obtenu récemment des données similaires lors d'une étude rétrospective menée sur un plus grand nombre de patients (Chevallier *et al.*, 2010). Cette étude réalisée sur 55 patients allogreffés (15 receveurs de SP versus 40 receveurs de cellules souches périphériques (CSP) d'un donneur non apparenté) a mis en évidence le fait que les infections à CMVH et EBV demeurent un problème important, comme dans tous les contextes d'immunosuppression en général, avec une incidence de survenue équivalente dans les deux groupes. Pour l'HHV-6, nos données montraient que l'augmentation très significative de l'incidence des infections à HHV-6 dans le groupe des patients greffés de SP (80 versus 42,5% ;  $P < 0,0001$ ) se traduisait également par des charges virales (CV) sanguines plus importantes (moyenne =  $3,98 \pm 0,86 \log_{10} \text{cop/mL}$ , médiane = 4,25 versus moyenne =  $3,19 \pm 0,82 \log_{10} \text{cop/mL}$ , médiane = 3,48 ;  $P < 0,0001$ ) et avec une durée d'infection plus longue (100% des patients receveurs de SP infectés par HHV-6 restaient positifs à M9 post-greffe versus 41% des patients receveurs de CSP). Cette étude avait par ailleurs mis en évidence des différences significatives concernant la reconstitution immune en période post-greffe. En effet, les patients du groupe SP comparativement au groupe CSP présentaient des taux plus élevés de cellules NK à M3, de lymphocytes B dès M3 jusqu'à M9 et à l'inverse des taux plus faibles de lymphocytes T CD8+ à M3 et M6 post-greffe. En raison de son caractère rétrospectif, des faibles effectifs analysés dans le groupe SP et surtout d'un suivi immunologique trop restreint, notre étude préliminaire n'a pas permis d'expliquer la forte incidence des infections HHV-6 après greffe de SP, ce qui constitue la question principale posée. Elle n'a pas non plus permis de définir les conséquences pour le patient, notamment en terme de survie ou de rechute.

Le premier objectif de ce travail de thèse visait à confirmer les résultats obtenus lors de l'étude rétrospective et à mieux définir les caractéristiques et les conséquences cliniques et/ou biologiques de cette infection dans ce contexte. Nous avons conduit une étude prospective comparant les fréquences de survenue d'infections à HHV-6 et de réactivations de quatre autres virus opportunistes (CMVH, EBV, adénovirus (ADV) et polyomavirus BK (BKPyV) chez 65 adultes allogreffés recevant soit une greffe de SP soit une greffe de CSH issues d'un donneur non apparenté. Au cours de ce travail, nous avons également comparé la reconstitution immune post-greffe entre les deux groupes de patients. Cette étude a fait l'objet de plusieurs communications orales et affichées dans des congrès nationaux et internationaux



et d'un article actuellement en cours de soumission à *Haematologica* (Article 1 dans l'annexe 1, p194). Les résultats de cette étude sont présentés dans la partie expérimentale n°1.

Les différences de reconstitution immunitaire observées au cours de l'étude rétrospective nous ont conduit à envisager que ces différences de cinétique pouvaient interférer sur la réactivation à HHV-6. Nous avons émis l'hypothèse qu'une ou plusieurs sous-populations leucocytaires, en excès chez les patients allogreffés de SP, comme par exemple les cellules NK, qui ont été décrites comme étant permissives à une infection par HHV-6A, pourraient représenter une source de virus chez les patients infectés. Nous avons dans une deuxième partie de notre travail expérimental, réalisé des tris par cytométrie en flux (CMF) à partir des PBMCs de patients infectés par l'HHV-6 inclus dans l'étude prospective puis recherché par PCR le génome viral dans chacune des sous-populations recueillies. Les résultats de ces tris sont présentés dans la partie expérimentale n°2.

Nous nous sommes dans un troisième travail, intéressés aux infections à HHV-6 à distance de la greffe de SP. Nous avons mené une étude visant à déterminer la fréquence des réactivations à HHV-6 à distance de la greffe et à évaluer le statut immunitaire chez deux groupes de patients allogreffés ayant reçu soit une greffe de SP soit une greffe CSP provenant d'un donneur familial ou non apparenté. Cette étude a fait l'objet d'un article publié dans *Journal of Infectious Diseases* en janvier 2014 (Article n°2 dans l'annexe 1, p223) et est présentée dans la partie expérimentale n°3.

Enfin, un travail réalisé récemment au sein de notre équipe a montré que les greffons placentaires étaient caractérisés par un déficit quantitatif et qualitatif en cellules T et B mémoires mais aussi en pDCs (Chevallier *et al.*, 2013a). Ces déficits peuvent en partie expliquer l'incidence accrue d'infections après greffe placentaire. Néanmoins, ceci n'explique pas le fait que l'incidence d'infections à HHV-6 soit plus importante après ce type de greffe (en comparaison des greffes CSP) alors que, comme décrit précédemment, l'incidence des infections à CMV, un virus proche de HHV-6, est comparable après greffe de SP et greffe de CSP. Une des hypothèses pourrait être l'absence de permissivité des pDCs pour le CMV (Varani *et al.*, 2007) alors que celle-ci existerait pour HHV-6 (Takemoto *et al.*, 2009). Ceci ayant pour conséquence le contrôle des pDCs par le virus (via des mécanismes d'immunomodulation) permettant sa réactivation.

Dans la quatrième partie de ce travail de thèse, nous avons donc voulu évaluer les conséquences d'une infection à HHV-6B sur des pDCs humaines *in vitro*. Ces travaux sont présentés dans la partie expérimentale n°4.

## **1. Etude de l'impact de la nature du greffon sur la survenue d'infections virales précoces et la reconstitution immune après greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques chez l'adulte.**

### **1.1. Introduction**

Au cours des dernières décennies, l'utilisation d'un greffon de SP comme source de CSH est devenue une alternative pour les patients éligibles à la greffe ne disposant pas d'un donneur vivant (Ballen *et al.*, 2013). Du fait de la faible quantité de CSH et de l'immaturité des lymphocytes T (lymphocytes T naïfs) contenus dans le greffon placentaire, la transplantation allogénique de SP est associée à un retard à la prise de greffe et à une mauvaise reconstitution immune, responsables d'un risque plus élevé d'infections opportunistes comparativement aux greffes utilisant les sources conventionnelles de CSH (moelle osseuse (MO) et CSP recueillies après stimulation du donneur par du G-CSF) (Komanduri *et al.*, 2007; Laughlin *et al.*, 2004; Parody *et al.*, 2006; Petropoulou & Rocha, 2011; Szabolcs, 2010).

Les infections opportunistes virales représentent une cause majeure de complications post-greffe et impliquent principalement cinq virus : trois herpesvirus, le CMVH, l'EBV et l'HHV-6 ; un polyomavirus, le virus BKPyV et l'ADV (Danby & Rocha, 2014; Hiemenz, 2009). Les séroprévalences pour ces virus sont élevées dans la population générale adulte (>90%), sauf pour le CMVH, pour lequel la séroprévalence varie entre 45 et 90% (Marr, 2012). La survenue d'infections virales en période post-greffe est liée au déficit de l'immunité cellulaire consécutif à la greffe et constitue un sujet de préoccupation important car ces infections sont associées à des taux de morbidité et de mortalité élevés (Ljungman *et al.*, 2008; Styczynski *et al.*, 2009). Ainsi, l'HHV-6 peut être associé à des cas d'encéphalite, de pneumopathie interstitielle, de fièvre, d'éruption cutanée, de retard à la prise de greffe voire de GVHD (de Pagter *et al.*, 2008b). Le CMVH peut être responsable de colite, de rétinite, d'encéphalite et de pneumopathie (Ljungman *et al.*, 2011) et l'EBV peut être à l'origine du développement d'un syndrome lymphoprolifératif (Peric *et al.*, 2011). Le BKPyV est impliqué dans la survenue de cystite hémorragique (Silva *et al.*, 2010) tout comme l'ADV, qui lui est également mis en cause dans des cas de fièvre, de diarrhées, d'hépatite et de pneumopathie (Robin *et al.*, 2007).

A ce jour, les connaissances concernant l'épidémiologie et les facteurs de risque des infections virales post-allogreffe sont encore limitées. De plus, l'influence de la source de

CSH sur le déficit immunitaire cellulaire et sur le risque de réactivations virales post-greffe n'a été que très peu étudiée. La plupart des études comparatives se rapportant à ce sujet traitent soit d'une ou deux infections virales soit de la reconstitution immune seule, ce qui ne permet pas d'avoir une vue globale sur l'ensemble des éléments impliqués (Danby & Rocha, 2014).

Afin de mieux définir l'impact de l'utilisation d'une source de CSH alternative sur les réactivations virales et sur la reconstitution immune après allogreffe, nous avons conduit en 2009 une étude rétrospective dans laquelle nous avons montré que les infections à HHV-6 étaient significativement plus fréquentes après greffe de SP qu'après greffe de CSP d'un donneur non apparenté ; en revanche aucune différence n'a été observée entre les deux groupes concernant les réactivations à CMVH et EBV. L'analyse des données de la reconstitution immune avait mis en évidence la présence de taux plus élevés de lymphocytes B jusqu'au 9<sup>ème</sup> mois post-greffe et de cellules NK à M+3 chez les patients du groupe SP. Les patients du groupe CSP, quant à eux, présentaient des taux plus élevés de lymphocytes T CD8+ à M3 et M6 post-greffe (Chevallier *et al.*, 2010). Le lien étroit entre HHV-6 et greffe de SP a par la suite été rapporté par plusieurs équipes (Betts *et al.*, 2011; Hill *et al.*, 2012; Jeulin *et al.*, 2013; Scheurer *et al.*, 2012; Yamane *et al.*, 2007).

Afin de confirmer nos données, nous avons entrepris de mener une étude prospective comparant les cinétiques de reconstitution immune et des réactivations virales mentionnées précédemment après allogreffe de CSH chez des patients recevant soit un greffon d'origine placentaire soit un greffon de CSP provenant d'un donneur non apparenté après un conditionnement d'intensité réduite (RIC, *reduced-intensity regimen*), qui est le type de conditionnement principalement utilisé chez l'adulte, tout du moins, en France (Blaise & Castagna, 2012).

## **1.2. Patients et méthodes**

### Critères d'inclusion et design de l'étude

Il s'agissait d'une étude monocentrique prospective menée au CHU de Nantes sur une période de 3 ans. Tous les patients adultes recevant, soit une allogreffe de SP (groupe « SP »), soit une allogreffe de CSP provenant d'un donneur non-apparenté (groupe CSP) après RIC, et ayant accepté de participer à l'étude ont été inclus. Il n'y avait aucune restriction concernant la pathologie initiale, le statut de la maladie initiale au moment de la greffe ou le

type de conditionnement RIC administré (Bacigalupo *et al.*, 2009). En l'absence de décès ou de rechute précoce, les patients étaient suivis jusqu'au 6<sup>ème</sup> mois après l'allogreffe.

L'objectif principal de cette étude était de comparer concomitamment entre les deux groupes (SP vs CSP) l'incidence de survenue de cinq infections virales opportunistes (HHV-6, CMVH, EBV, ADV et BKPyV), et d'évaluer les conséquences cliniques et ou biologiques de ces infections chez les patients. Sur le plan clinique, les différents éléments recherchés étaient les suivants : présence ou absence, de fièvre, d'une éruption cutanée, de symptômes respiratoires, d'un syndrome méningé, d'une symptomatologie urinaire ou digestive. Les autres paramètres pris en compte étaient le délai de sortie d'aplasie, la survenue d'une GVHD aiguë, la rechute, la survie et le décès. Le suivi des patients n'étant que de 6 mois post-greffe, la GVHD chronique, la survie globale et la survie sans maladie non pas été considérées dans cette étude.

Le second objectif était d'évaluer la cinétique de reconstitution immune jusqu'au 6<sup>ème</sup> mois post-greffe et de comparer les données obtenues entre les deux groupes.

Les échantillons de sang total (ST) pour les analyses virologiques et immunologiques ont été prélevés pour chaque patient, le jour de la greffe (J0), tous les 15 jours jusqu'au 3<sup>ème</sup> mois post-greffe (J15, J30, J45, J60) puis une fois par mois jusqu'à la fin du suivi (M4, M5, M6).

Un consentement éclairé a été recueilli auprès de chaque patient inclus et l'étude a été approuvée par la commission de révision du CHU de Nantes.

### Définitions

#### *Reconstitution hématopoïétique, prise de greffe et GVHD*

Les récupérations en polynucléaires neutrophiles et en plaquettes étaient définies par un nombre absolu de polynucléaires neutrophiles supérieur à  $0,5 \cdot 10^9/L$  et un nombre de plaquettes supérieur à  $50 \cdot 10^9/L$  dans le sang périphérique, durant au moins deux jours consécutifs, sans support transfusionnel. La prise de greffe était définie par l'obtention prolongée d'un nombre absolu de polynucléaires neutrophiles supérieur à  $0,5 \cdot 10^9/L$ , associé à un chimérisme donneur supérieur à 5% (les deux unités combinées pour les patients du groupe SP). Le diagnostic et le score de GVHD étaient évalués selon les critères standards établis par l'équipe de Seattle (Glucksberg *et al.*, 1974; Shulman *et al.*, 1980).

### *Réactivation, infection active et maladie virales*

Une réactivation virale était définie par le fait d'avoir au moins une PCR positive dans le ST quelle que soit la valeur de CV.

Une infection virale active était définie par l'obtention d'au moins une PCR positive avec une CV sanguine supérieure à 3 log<sub>10</sub> de copies de génome viral (log<sub>10</sub>cop) par mL de ST, pour 10<sup>6</sup> cellules ou pour 10<sup>5</sup> cellules en fonction du virus recherché (*voir paragraphe « Méthodes de diagnostic des infections virales »*) ou par l'obtention de 2 PCR positives consécutives avec une CV sanguine supérieure à 2 log<sub>10</sub>cop/mL de ST.

Le diagnostic de maladie virale était porté devant la détection du virus par PCR dans un prélèvement normalement stérile (LCR, lavage broncho-alvéolaire(LBA), urines ou biopsie d'organes) associée à des symptômes cliniques, ou devant la présence d'anomalies histopathologiques (inclusions virales tissulaires) associées à des symptômes cliniques sans autre cause identifiable (Dropulic & Jones, 2008; Ljungman *et al.*, 2008; Matthes-Martin *et al.*, 2012).

Un lymphome EBV induit ou PTL (*post-transplant lymphoproliferative disorder*) était défini par la présence d'anomalies histopathologiques évocatrices de lymphome sur une biopsie ganglionnaire ou par la présence concomitante d'une réactivation EBV associée à des anomalies à l'examen tomodensitométrique compatibles avec un syndrome lymphoprolifératif (Curtis *et al.*, 1999; Gärtner *et al.*, 2002; Hoshino *et al.*, 2001).

### *Traitement antiviraux*

La stratégie antivirale est appliquée selon les recommandations de la Conférence Européenne sur la prise en charge des infections survenant chez le patient leucémique (ECIL, *European conference on infections in leukemia*) (Ljungman *et al.*, 2008; Matthes-Martin *et al.*, 2012; Styczynski *et al.*, 2009).

Durant les 6 mois de suivi, les patients ont tous reçu du valaciclovir (1 g par jour) en prophylaxie des infections à HSV. Les infections ou maladies à CMV ont été traitées de manière préemptive ou curative par GCV en intraveineuse (IV) (10 mg/kg/j) ou par du PFAIV (180 mg/kg /j) jusqu'à l'obtention de 2 PCR négatives consécutives. Les mêmes molécules ont été utilisées pour le traitement des infections à HHV-6. Le rituximab (anticorps monoclonal anti-CD20) à la dose de 375 mg/m<sup>2</sup>/semaine durant 4 semaines consécutives a été administré en préemptif chez les patients présentant une infection à EBV ou en curatif pour le traitement des lymphomes à EBV et de la GVHD chronique réfractaire. Les infections à ADV ont été traitées par CDVIV à la dose 5mg/kg/semaine pendant 2 semaines puis à la dose

de 5 mg/kg/semaine les semaines suivantes jusqu'à obtention de 2 PCR négatives consécutives. Le même protocole de traitement a été appliqué en cas d'infections sévères à BKPyV jusqu'à la disparition des symptômes cliniques. Les patients atteints de cystites hémorragiques à BKPyV ont reçu dans tous les cas un traitement par immunoglobulines polyvalentes IV (IgIV) à la dose de 10 g/semaine, jusqu'à disparition des signes cliniques.

#### Méthodes de diagnostic des infections virales

Les acides nucléiques totaux ont été extraits à partir de 200 µL de ST sur l'automate QIASymphony® avec la trousse d'extraction QIASymphony® DNA minikit (Qiagen, Courtaboeuf, France) en suivant les recommandations du fabricant. La détection des génomes viraux était réalisée par PCR quantitatives en temps réel « maison » précédemment décrites et adaptées au laboratoire (Bressollette-Bodin *et al.*, 2005, 2009; Gautheret-Dejean *et al.*, 2002; Heim *et al.*, 2003). Brièvement, les ADN d'HHV-6 (gène U65-U66), du CMVH (gène US8), de l'EBV (gène BNFR-1), de l'ADV (gène d'une protéine de capsid) et du BKPyV (gène de l'antigène T) ont été quantifiés à partir de 5 µL d'extrait. Toutes les PCR ont été réalisées avec le Mastermix Taqman® Gene Expression (Applied Biosystem®, USA) sur Rotorgene® (Corbett Life, Sydney, Australie). Les CV sont exprimées en  $\log_{10}$  cop par mL de ST pour l'HHV-6, l'ADV et le BKPyV, en  $\log_{10}$  cop pour  $10^6$  cellules pour le CMV et en  $\log_{10}$  cop pour  $10^5$  cellules pour l'EBV.

#### Analyse des reconstitutions hématologiques et immunes

Les numérations formules sanguines ont été mesurées sur un analyseur automatisé (XE2100, Sysmex) au laboratoire d'hématologie du CHU de Nantes. Les sous-populations lymphocytaires (lymphocytes T CD3+ (valeurs normales (VN) : 0.9-1.8 Giga/L) ; lymphocytes T CD4+ (VN : 0.5-1.2 Giga/L) et CD8+ (VN : 0.3-0.7 Giga/L) ; lymphocytes B CD19+ (VN : 0.1-0.4 Giga/L) ; cellules NK CD56+ (VN : 0.1-0.4 Giga/L)) ont été quantifiées par cytométrie en flux au laboratoire d'immunologie du CHU de Nantes. Les valeurs absolues de chaque sous-population ont été déterminées à l'aide des réactifs BD Multitest™ CD3/CD8/CD45/CD4 ou BD Multitest™ CD3/CD19/CD16+56/CD45 dans des tubes BD Trucount™ Tubes (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

### Analyses statistiques

La comparaison des caractéristiques des patients et des évènements liés à la greffe entre les deux groupes ainsi que l'évaluation d'une association entre chacune des infections virales et les variables d'intérêt ont été réalisées à l'aide du test de Khi<sup>2</sup> ou du test exact de Fisher bilatéral pour les proportions, et du test non-paramétrique de Wilcoxon pour les données quantitatives. Les facteurs de risque de développer une réactivation/infection virale avec une valeur-p<0.2 en analyse univariée ont été inclus dans la construction du modèle de régression logistique final pour l'analyse multivariée. Seuls les patients avec prise de greffe ont été considérés pour l'étude de la reconstitution immune, qui a été analysée à l'aide de modèles mixtes linéaires. Une valeur-p <0.05 a été considérée comme statistiquement significative. Les analyses statistiques ont été réalisées par Mme Lucie Planche (Département de promotion à la recherche clinique, cellule Biostatistique) à l'aide du logiciel SAS 9.3 (SAS Institute Inc., NC, USA).

### **1.3. Résultats**

#### *Caractéristiques des patients et comparaison entre les deux groupes en fonction du type de greffe*

Soixante-cinq patients adultes ayant reçu entre décembre 2009 et août 2012 soit une greffe de CSP d'un donneur non apparenté (groupe CSP, n=34), soit une greffe de SP (groupe SP, n=31) après un conditionnement RIC ont été successivement inclus dans l'étude. Les caractéristiques des patients, décrites dans le Tableau 8, étaient similaires entre les deux groupes à l'exception de l'utilisation de SAL, qui était significativement plus fréquente dans le groupe CSP. Les nombres de cellules nucléées totales et de cellules CD34+ infusées étaient significativement plus faibles dans le groupe SP. Les types de conditionnement RIC étaient également différents entre les 2 groupes. Les patients du groupe CSP ont reçu un conditionnement RIC de type FB2A2 (Oudin *et al.*, 2014) ou CLOB2A2 (Chevallier *et al.*, 2014) alors que les patients du groupe SP ont tous, à l'exception de deux, reçu le conditionnement RIC dénommé TCF-RIC développé par l'équipe de Minneapolis (Brunstein *et al.*, 2012). Les deux autres patients ont reçu le même conditionnement additionné d'une dose de 5mg/kg de thiotépa (Ponce *et al.*, 2013). La composition des conditionnements RIC et les molécules utilisées en prophylaxie de la GVHD sont détaillées dans le Tableau 8.



**Tableau 8. Caractéristiques des patients allogreffés inclus dans l'étude.**

	Groupe CSP (n=34)	Groupe SP (n=31)	p-value
<i>Sexe: masculin, n (%)</i>	21 (61.8)	19 (61.3)	NS
<i>Age médian à la greffe: années (intervalle)</i>	60 (26-70)	54 (22-70)	NS
<i>Délai médian entre le diagnostic initial et l'allogreffe: mois (intervalle)</i>	10.5 (3 - 255)	12 (4 - 187)	NS
<i>Pathologie initiale, n (%)</i>			
Leucémie aiguë myéloïde	9 (26.5)	15 (48.4)	NS
Leucémie aiguë lymphoïde	8 (23.5)	1 (3.2)	
Syndrome myélodysplasique	5 (14.7)	5 (16.1)	
Lymphome non-hodgkinien	5 (14.7)	6 (19.3)	
Lymphome de Hodgkin	2 (5.6)	3 (9.7)	
Syndrome myéloprolifératif	2 (5.6)	1 (3.2)	
Myélome	2 (5.6)	0	
Leucémie lymphoïde chronique	1 (2.3)	0	
<i>Statut de la pathologie initiale à la greffe</i>			
Première rémission complète	13	13	NS
Deuxième/troisième rémission complète	9	8	
Maladie active	12	10	
<i>Compatibilité HLA<sup>a</sup>, n (%)</i>			
Donneur non-apparenté			
10/10	31 (91.2)	-	
9/10	3 (8.8)	-	
Double unités de sang placentaire			
6/6 et 6/6	-	1 (3.2)	
5/6 et 5/6	-	20 (64.5)	
5/6 et 4/6	-	7 (22.6)	
4/6 et 4/6	-	3 (9.7)	
<i>Conditionnement<sup>b</sup>, n</i>			
FB2A2-RIC	30	-	
CLOB2A2-RIC	4	-	
TCF-RIC	-	31	
<i>Prophylaxie de la GVHD<sup>c</sup>, n</i>			
CsA + MMF	28	28	NS
CsA + méthotrexate	2	2	
CsA seule	4	1	
<i>SAL: oui, n (%)</i>	30 (88.2)	4 (12.9)	<b>&lt;0.0001</b>
<i>Nombre de cellules injectées</i>			
Cellules nucléées totales, x10 <sup>8</sup> /kg, médiane (intervalle)	10.4 (1.2-18.3)	0.48 (0.17-0.78)	<b>&lt;0.0001</b>
Cellules CD34+, x10 <sup>6</sup> /kg, médiane (intervalle)	7 (1.1-10)	0.11 (0.05-0.25)	
<i>Sérologie CMV du receveur - n (%)</i>			
Positive	15 (44.1)	12 (38.7)	NS
Négative	19 (55.9)	19 (61.3)	

Sérologie EBV du receveur - n (%)

Positive	33 (97.1)	30 (96.8)	NS
Négative	1 (2.9)	1 (3.2)	

---

Abréviations : CSP, cellules souches périphériques d'un donneur non apparenté; SP, sang placentaire (2 unités par patient); RIC, conditionnement d'intensité réduite; GVHD, maladie du greffon contre l'hôte; CsA, ciclosporine A; MMF, mycophénolate mofetil; SAL, sérum anti-lymphocytaire; NS, non significatif

<sup>a</sup>La compatibilité entre les 2 unités de SP devait être supérieure à 3 antigènes HLA sur 6 (prise en compte des loci A, B et DRB1); une compatibilité donneur non-apparenté/receveur supérieure ou égale à 9 antigènes HLA sur 10 était autorisée dans le groupe CSP (prise en compte des loci A, B, Cw, DRB1 et DQB1)

<sup>b</sup>Les conditionnements RICFB2A2 ou CLOB2A2 combinent de la fludarabine 30 mg/m<sup>2</sup>/j (n=30) ou de la clofarabine 30 mg/m<sup>2</sup>/j (n=4) pendant 5-6 jours (jours -6 or -5 à -2) à du busulfan 3.2 mg/kg/j i.v. pendant 2 jours (jours -3 et -2) et de SAL 2.5 mg/kg/j aux jours -2 et -1. Le conditionnement TCF-RIC combine de la fludarabine 200 mg/m<sup>2</sup>/j pendant 5 jours (jours -6 à -2), du cyclophosphamide 50 mg/kg/j pendant 1 jour (jour -6), et une faible dose (2 Grays) d'irradiation corporelle totale au jour -1.

<sup>c</sup>Les patients avec un RIC FB2A2 ont reçu de la ciclosporine plus du mycophénolate mofetil (n=28) ou plus du méthotrexate (n=2) en prophylaxie de la GVHD alors que les patients avec un RIC CLOB2A2 ont reçu de la ciclosporine seule. Tous les patients du groupe SP ont reçu de la ciclosporine et du mycophénolate mofetil en prophylaxie de la GVHD, 5 d'entre eux ont également reçu de SAL 2.5 mg/kg/j pendant 2 jours (jours -2 et -1) pour favoriser la prise de greffe.

*Evènements cliniques en période post-greffe et comparaison entre les 2 groupes*

Le devenir des patients est résumé dans le Tableau 9. Le taux de prise de greffe et les incidences de GVHD aiguë, de rechute et de décès étaient comparables entre les deux groupes durant les 6 mois de suivi post-greffe. Comme attendu, les délais de récupérations en neutrophiles et en plaquettes étaient significativement plus élevés après greffe de SP.

**Tableau 9. Comparaison des évènements liés à la greffe entre les 2 groupes de patients.**

	Groupe CSP (n=34)	Groupe SP (n=31)	<i>p</i> -value
Taux de prise de greffe	33 (97%)	27 (87%)	0.1838
Délai médian (jours) de récupération en neutrophiles (intervalle)	15 (1-23)	20 (6-53)	<b>0.0126</b>
Délai médian (jours) de récupération en plaquettes (intervalle)	12 (1-44)	44 (11-180)	<b>&lt;0.0001</b>
GVHD aiguë : oui			
Grade 1-2	17 (50%)	16 (51.6%)	0.4568
Grade 3-4	3 (8.8%)	5 (16.1%)	
Rechutes	7 (20.6%)	4 (12.9%)	0.4092
Décès	4 (11.8%)	3 (9.7)	0.7863
<i>Cause du décès</i>			
GVHD	2	1	
Rechute	0	1	
Infection	2 <sup>a</sup>	1 <sup>b</sup>	

Abréviations : CSP, cellules souches périphériques d'un donneur non apparenté ; SP, sang placentaire ; GVHD, maladie du greffon contre l'hôte

<sup>a</sup>une aspergillose invasive, un cas d'infections multiples (aspergillose pulmonaire + septicémie bactérienne)

<sup>b</sup>défaillance viscérale multiple dans un contexte de sepsis

*Réactivations, infections et maladies virales, facteurs de risque et influence sur le devenir des patients*

1- Données globales

Au cours de l'étude, 608 prélèvements sanguins (groupe CSP, n=312 ; groupe SP, n=296) ont été analysés au laboratoire de Virologie du CHU de Nantes. Le protocole de prélèvement prévu lors de la mise en place de l'étude a été respecté pour la grande majorité des patients avec une médiane du nombre d'échantillons collectés de 10 par patient (intervalle : 5-10). En considérant l'ensemble de la cohorte (n=65), les PCR HHV-6, EBV, CMVH, BKPyV et ADV ont été au moins une fois positives chez 33 (51%), 24 (37%), 28 (43%), 29 (44%) et 4 (6%) patients, respectivement. Seuls 6 patients (9%), principalement dans le groupe CSP (n=5), n'ont présenté aucune des réactivations virales recherchées. Considérant l'ensemble des virus étudiés, 16 (25%), 30 (46%), 10 (15%) et 3 (5%) patients ont présenté une réactivation avec un, deux, trois et quatre virus, respectivement. Considérant seulement les *Herpesviridae*, 26 (40%), 28 (43%) et 1 (2%) patients ont présenté une réactivation à un, deux ou trois herpesvirus, respectivement. Aucune association n'a été retrouvée entre l'une ou l'autre des infections virales et aucun lien n'a été établi entre une infection virale quelle qu'elle soit et la survenue d'une GVHD aiguë ou d'un décès. La comparaison des résultats obtenus pour chacune des infections virales (nombre de patients infectés, nombre de prélèvements positifs par rapport au nombre de prélèvements total, nombre médian de prélèvements positifs par patient et valeur médiane des CV) sont détaillés dans le Tableau 10.

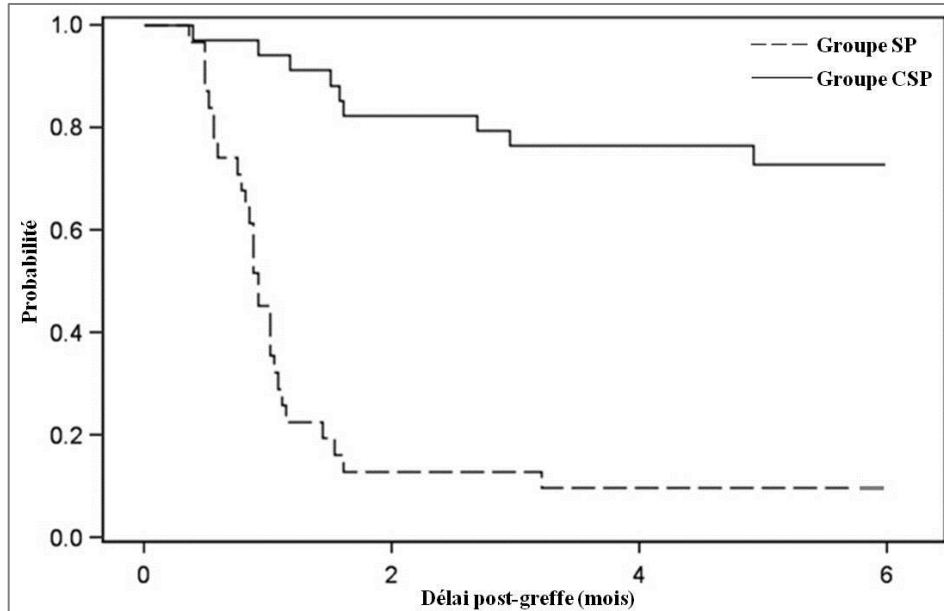
**Tableau 10. Comparaison des données virologiques entre les deux groupes de patients.**

	uPBSC group (n=34)	dUCB group (n=31)	<i>p</i> -value
<i>HHV-6</i>			
Nombre de patients infectés	7 (21%)	26 (84%)	<0.0001
Nombre de plvts positifs/plvts totaux	22/312 (7%)	166/296 (56%)	<0.0001
Médiane de plvts positifs/patient (intervalle)	0/10 (0-5)	6/10 (0-9)	<0.0001
CV médiane: log <sub>10</sub> cop/mL (intervalle)	2.6 (2.0-4.5)	3.0 (2.0-4.8)	NS
<i>CMVH</i>			
Nombre de patients infectés	12 (35%)	12 (39%)	NS
Nombre de plvts positifs/plvts totaux	46/312 (14%)	45/296 (15%)	NS
Médiane de plvts positifs/patient (intervalle)	3.5/10 (3-7)	4/10 (2-7)	NS
CV médiane: log <sub>10</sub> cop/10 <sup>6</sup> cells (intervalle)	2.5 (<2.0-4.1)	2.6 (<2.0-4.5)	NS
<i>EBV</i>			
Nombre de patients infectés	24 (71%)	8 (26%)	0.0003
Nombre de plvts positifs/plvts totaux	71/312 (23%)	14/296 (5%)	<0.0001
Médiane de plvts positifs/patient (intervalle)	3/10 (1-8)	1/10 (1-4)	NS
CV médiane: log <sub>10</sub> cop/10 <sup>5</sup> cells (intervalle)	2 (<1.0-5.9)	1.9 (<1.0-3.1)	NS
<i>BKv</i>			
Nombre de patients infectés	11 (32%)	18 (58%)	0.03
Nombre de plvts positifs/plvts totaux	29/312 (9%)	73/296 (25%)	<0.0001
Médiane de plvts positifs/patient (intervalle)	2/10 (1-5)	3.5/10 (1-9)	NS
CV médiane: log <sub>10</sub> cop/mL (intervalle)	2.8 (<2.0-5.2)	3.1(<2.0-5.3)	NS
<i>ADV</i>			
Nombre de patients infectés	0	4 (6%)	NA
Nombre de plvts positifs/plvts totaux	0/312	7/296 (1%)	NA
CV médiane: log <sub>10</sub> cop/mL (intervalle)	NA	3.3 (2.9-4.5)	NA

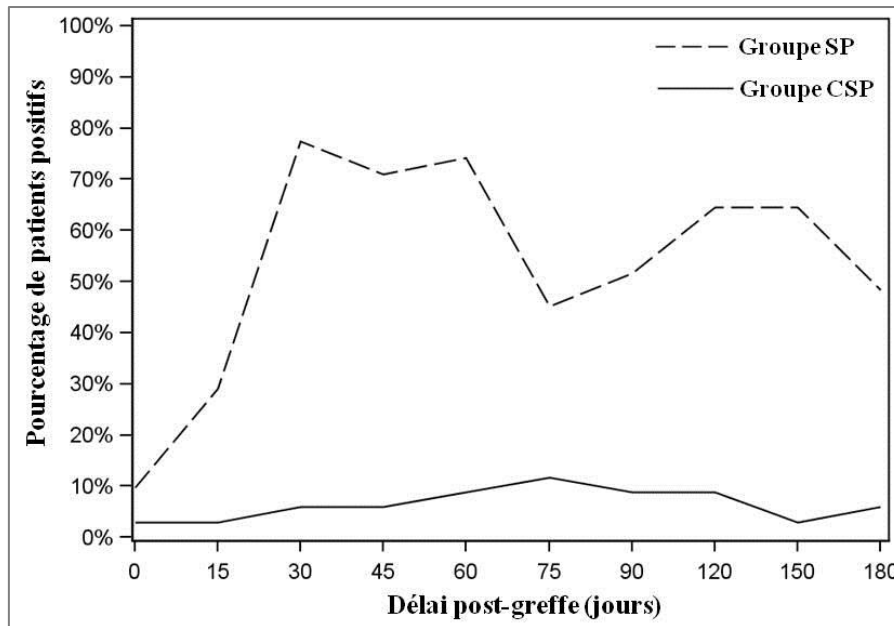
Abréviations : CSP, cellules souches périphériques d'un donneur non apparenté; SP, sang placentaire; Plvts, prélèvements; CV, charge virale; NS, non significatif; NA, non applicable

2- Les infections à HHV-6, BKPyV et ADV sont associées aux greffes de SP

Trent-huit patients (59%) ont présenté une réactivation à HHV-6 dans un délai médian de 0.9 mois post-greffe (intervalle : 0.8-1.0) (Figure 17). Trente-trois patients (52%) ont été considérés comme infectés par l'HHV-6. L'incidence de ces infections était significativement plus élevée dans le groupe SP (84% vs 21% ;  $p < 0.0001$ ) (Figure 18). Les infections à HHV-6 survenaient plus tôt dans le groupe SP (Figure 18) et leur durée était significativement plus longue dans ce même groupe (durée médiane : 148 vs 31 jours ;  $p < 0.0024$ ). Le nombre médian de prélèvements positifs par patient était également plus élevé dans le groupe SP. La comparaison des médianes de CV entre les 2 groupes n'a pas mis en évidence de différence significative mais les patients ayant présenté un pic de CV supérieur ou égal à  $4 \log_{10} \text{cop/mL}$  étaient plus fréquemment observés dans le groupe SP ( $n=8$ ) que dans le groupe CSP ( $n=2$  ;  $p=0.03$ ) (Tableau 10). Par ailleurs, aucun cas de ciHHV-6 n'a été mis en évidence au cours de l'étude.



**Figure 17. Probabilité d'être indemne d'infection à HHV-6 en fonction du type de greffe estimée par la méthode de Kaplan-Meier.  $\text{Log-rank} < 0.0001$ .**



**Figure 18. Pourcentage de patients positifs pour l'HHV-6 au cours du temps et en fonction du type de greffe.**

A la fin du suivi, 73% (n=19/26) des patients du groupe SP présentaient une infection à HHV-6 persistante contre 0% dans le groupe CSP ( $p < 0.0001$ ).

Aucun cas de maladie à HHV-6 n'a été observé au sein de la cohorte, cependant un patient du groupe SP ayant présenté une CV à 4.5  $\log_{10}$ cop/mL dès J15 post-greffe a reçu un traitement préemptif par GCV IV pour prévenir la survenue de manifestations cliniques.

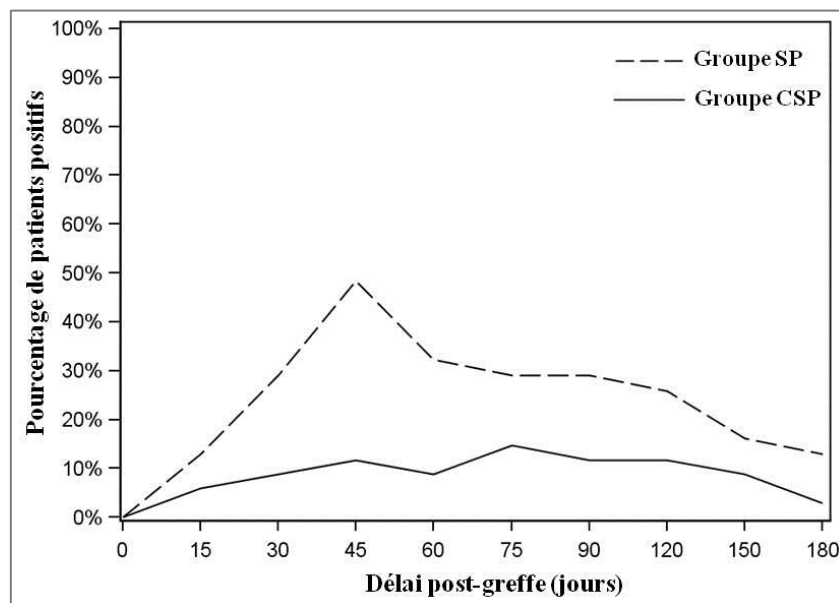
En analyse univariée, les facteurs associés à une incidence accrue d'infections à HHV-6 étaient l'utilisation d'un greffon de SP (Odds ratio [OR]: 19.3; intervalle confiance à 95% [95%IC]: 5.42–68.7;  $p < 0.0001$ ) et l'absence d'administration de SAL (OR: 9.00; 95%IC: 2.81–28.9;  $p = 0.0002$ ). Néanmoins, l'injection de SAL étant très liée au type de donneur (88.2% dans le groupe CSP vs 12.9% dans le groupe SP), cette variable n'a pas été intégrée dans le modèle multivarié. Ainsi, le seul facteur indépendant associé à un risque accru était le fait de recevoir une greffe de SP (OR: 19.0; 95%IC: 5.2–69.1;  $p < 0.0001$ ).

La comparaison des données cliniques et biologiques entre le groupe de patients infectés par HHV-6 et le groupe de patients non infectés a mis en évidence une association entre infection à HHV-6 et le retard à la récupération des neutrophiles et des plaquettes (médiane : 20 vs 15 jours,  $p = 0.002$  et 40 vs 12 jours,  $p < 0.0001$ , respectivement). Ce retard était encore plus marqué lorsque la réactivation à HHV-6 survenait précocement en période post-greffe, avant la sortie d'aplasie (délai médian de récupération des neutrophiles : 28 vs 17

jours ; $p=0.0054$  et des plaquettes : 56 vs 15 jours ;  $p=0.0004$ ). Ces retards à la récupération hématologique ont été consécutivement associés, de manière significative, chez les patients infectés par HHV-6, à un besoin transfusionnel en culots globulaires et plaquettaires plus important comparativement aux patients non infectés (nombre médian de culot globulaires par patient = 8 vs 2 ;  $p=0.006$  et nombre médian de culots plaquettaires par patient = 11 vs 1 ;  $p<0.0001$ ).

Par ailleurs, dans notre étude l'infection à HHV-6 n'a pas été associée à une fréquence accrue de survenue de fièvre, de rash cutané, de GVHD ou d'infection virale autre.

Au sein de la cohorte, 45% ( $n=29/65$ ) des patients ont présenté une réactivation à BKPyV dans un délai médian de 1.6 mois post-greffe (intervalle : 1.1-2.6). L'incidence de ces réactivations étaient là encore significativement plus élevée dans le groupe SP que dans le groupe CSP (58% vs 32% ;  $p= 0.03$ ) (Tableau 10 et Figure 19). Les infections à BKPyV tendaient à durer plus longtemps dans le groupe SP sans qu'une différence statistique n'ait pu être mise en évidence (durée médiane : 54 vs 31 jours ;  $p=0.07$ ). Les médianes de CV étaient équivalentes entre les deux groupes et les valeurs élevées de CV ( $\geq 4 \log_{10} \text{cop/mL}$ ) étaient observées aussi bien dans le groupe SP ( $n=5$ ) que dans le groupe CSP ( $n=2$ ).



**Figure 19. Pourcentage de patients présentant une réactivation à BKPyV au cours du temps et en fonction du type de greffe.**



Dix patients (15%) ont présenté une cystite hémorragique à BKPyV, diagnostiquée devant la présence de signes urinaires (douleurs, brûlures mictionnelles, hématurie) et d'une CV urinaire positive (CV médiane = 8.9 log<sub>10</sub>cop/mL ; intervalle : 6.2-10.3). Les cas d'infections symptomatiques ont été observés aussi fréquemment dans le groupe SP (n=6) que dans le groupe CSP (n=4). Les 10 patients ont tous reçu un traitement anti-douleur, des IgIV et une hyperhydratation. Seuls 2 d'entre eux ont reçu, en plus, un traitement par CDV IV : un pour une cystite hémorragique à BKPyV isolée et l'autre pour une cystite hémorragique sévère à BKPyV concomitante à une infection à ADV.

En analyse univariée, les facteurs associés à un risque accru d'infections à BKPyV étaient l'utilisation du greffon de SP (CSP vs SP, OR: 0.35; 95%IC: 0.13–0.95; p=0.039) et l'absence d'administration de SAL (OR : 3.12 ; 95%IC : 1.09-8.92 ; p=0.034). Pour la même raison que celle évoquée précédemment, l'utilisation de SAL a été exclue de l'analyse multivariée. Cette dernière, n'a retrouvé aucun facteur de risque indépendant d'infections à BKPyV en post-greffe, y compris le type de greffon.

Quatre patients (6%), tous dans le groupe SP, ont présenté une réactivation à ADV à des temps variables en période post-greffe (J62, J80, J160 et J175). Trois d'entre eux ont été considérés comme infectés par l'ADV et deux d'entre eux avaient des signes évocateurs d'une maladie à ADV. Deux patients ont été traités par CDV IV, un pour une maladie à ADV, l'autre pour une infection à ADV concomitante d'une cystite hémorragique sévère à BKPyV. Le troisième patient, pour lequel aucun traitement antiviral n'a été initié, était en soins palliatifs pour cause de rechute de la pathologie initiale. Au vu du faible nombre de cas d'infections à ADV, aucune analyse statistique n'a été réalisée.

### 3- Les infections à EBV sont associées à la greffe de CSP.

Une réactivation à EBV a été observée chez 49% des patients (n=32/65) dans un délai médian de 2.8 mois (intervalle : 1.4-5.5) après la transplantation (Figure 20). L'incidence de ces réactivations était significativement plus élevée dans le groupe CSP (71% vs 26% ; p=0.0003). Les médianes de CV étaient équivalentes entre les 2 groupes mais les CV les plus élevées ( $\geq 4 \log_{10}\text{cop}/10^5$  cellules) ont été observées chez 3 patients du groupe CSP (Tableau 10).

Cinq patients du groupe CSP ont bénéficié d'un traitement préemptif par rituximab pour une infection EBV. Deux patients, un dans chaque groupe, ont développé un lymphome EBV

induit en période post-transplantation pour lequel ils ont reçu un traitement curatif. L'évolution a été favorable dans les deux cas.

L'analyse univariée a fait ressortir l'utilisation d'un greffon de CSP (CSP > SP, OR: 6.90; 95%IC: 2.32-20.6; p=0.0005) et l'administration de SAL (Absence vs présence, OR: 0.12; 95%CI: 0.04-0.38; p=0.0003) comme étant les facteurs influençant la survenue d'une infection à EBV. Comme précédemment, l'utilisation de SAL a été exclue du modèle de régression logistique. Après l'analyse multivariée, les facteurs indépendants associés à un risque accru d'infection à EBV étaient le type de greffe (CSP > SP ; OR: 29.9; 95%IC: 5.68–158; p< 0.0001), le type de pathologie initiale (myéloïde > lymphoïde ; OR: 12.2; 95%CI: 2.43–61.3; p=0.002) et l'âge (jeune > plus âgé ; OR: 0.90; 95%CI: 0.84–0.96]; p= 0.002).

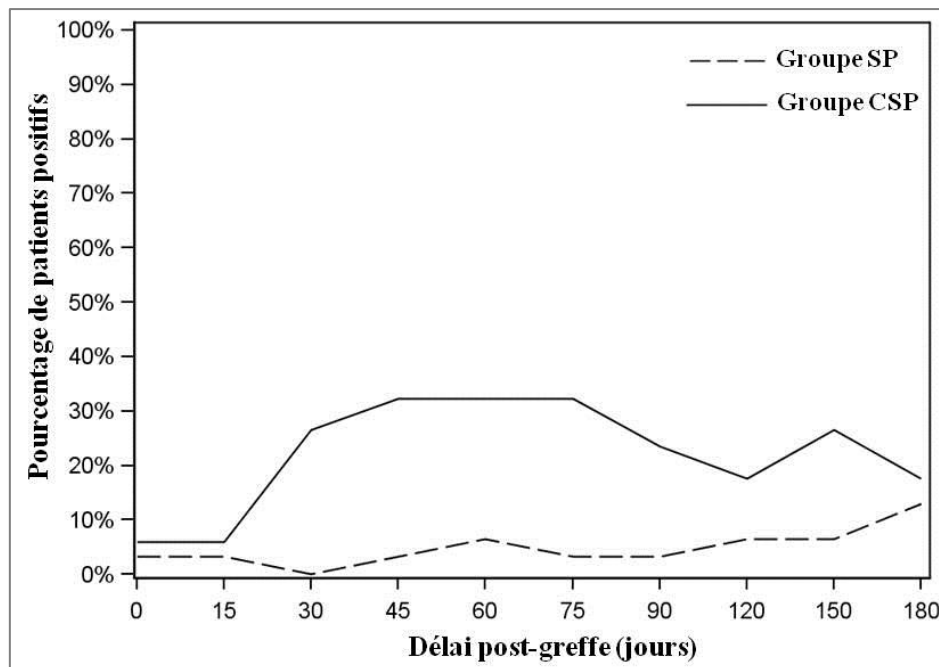


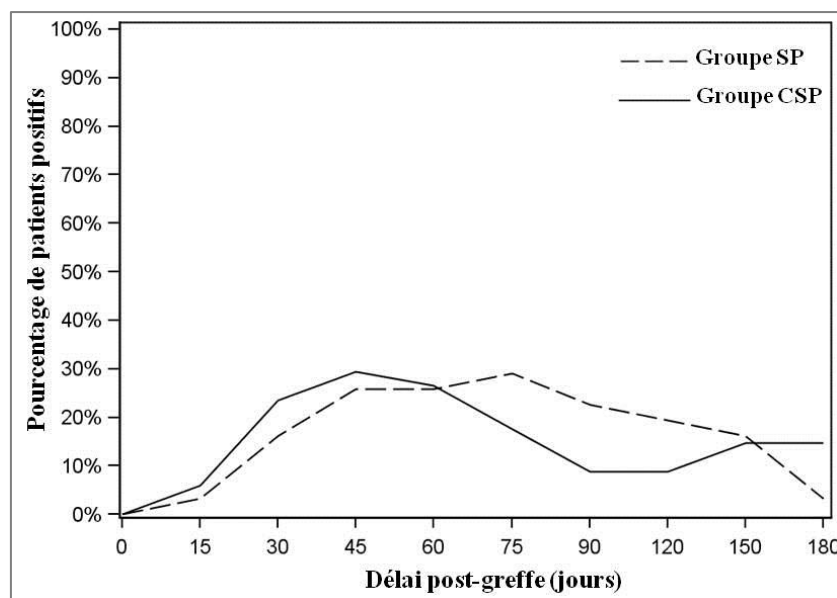
Figure 20. Pourcentage de patients positifs pour l'EBV au cours du temps et en fonction du type de greffe.

- 4- L'incidence des infections à CMV est équivalente entre les 2 groupes de patients étudiés.

Vingt-quatre patients (37%) ont présenté une réactivation à CMVH avec un délai médian de survenue de 1.4 mois post-greffe (intervalle : 0.4-2.5). L'incidence de ces réactivations était similaire entre les deux groupes (Figure 21).

Quinze patients (groupe CSP, n=9 (26%) vs groupe SP, n=6 (19%) ; p=0.49) ont reçu une thérapie préemptive par GCV ou FCV. Trois maladies à CMVH (une colite, une colite associée à une encéphalite et une maladie disséminée) ont été documentées et prises en charge par l'instauration d'un traitement curatif anti-CMVH (groupe CSP, n=2 vs groupe SP, n=1). Parmi les 18 patients ayant reçu une chimiothérapie antivirale spécifique, un patient du groupe SP est décédé, dans les suites de son infection à CMVH, d'une défaillance multi-viscérale dans un contexte d'infections multiples. Sept des 18 patients traités (dont 5 patients du groupe SP) ont présenté une infection concomitante à HHV-6 et sont restés positifs pour l'HHV-6 pendant toute la durée du traitement anti-CMVH.

Comme attendu, les patients à risque de réactivation/infection à CMVH étaient ceux qui avaient une sérologie CMVH positive en pré-greffe. En effet, une réactivation à CMV a été observée chez 81.4% (n=22/27) des patients séropositifs contre seulement 5.3% (n=2/38) des patients séronégatifs. En analyse univariée, le seul facteur associé à un risque plus élevé de réactivation à CMVH était l'âge du patient au moment de la transplantation (OR: 1.08; 95%CI: 1.02-1.1; p=0.0077).



**Figure 21. Pourcentage de patients positifs pour le CMVH au cours du temps et en fonction du type de greffe.**

*Reconstitution immune post-greffe et comparaison entre les 2 groupes de patients.*

Seuls les patients avec prise de greffe (groupe SP, n=27 ; groupe CSP, n=33) ont été considérés pour l'analyse de la reconstitution immune post-greffe.

Au total, 533 prélèvements de sang périphérique (groupe CSP, n=284 ; groupe SP, n=249) ont été analysés par immunophénotypage (médiane de 8 prélèvements par patient ; intervalle : 3-10). Les résultats obtenus pour les différentes sous-populations lymphocytaires et pour les monocytes sont présentés Figure 22.

Une lymphopénie T a été observée dans les deux groupes durant toute la durée du suivi sans différence significative, à l'exception du J+60 pour lequel la médiane de lymphocytes T CD3+ était plus élevée dans le groupe CSP (Figure 22A). Les médianes de valeurs absolues étaient inférieures aux valeurs normales pour les lymphocytes T CD4+ dans les 2 groupes et tendaient vers des valeurs significativement plus élevées dans le groupe SP à J+30, J+45 et de J+90 à J+180 (Figure 22B).

La reconstitution en lymphocytes T CD8+ était plus rapide dans le groupe CSP, avec des valeurs normales atteintes dès J+90 alors qu'une lymphopénie T CD8+ était observée jusqu'à J+180 pour le groupe SP. Les médianes de lymphocytes T CD8+ étaient significativement plus élevées dans le groupe CSP de J+45 à J+90 (Figure 22B).

A l'inverse, la reconstitution en lymphocytes B était plus rapide dans le groupe SP, avec une médiane des valeurs absolues atteignant des valeurs normales dès J+60 et dépassant ces dernières à partir de J+75. Une lymphopénie B est observée dans le groupe CSP pendant toute la durée de l'étude avec des médianes de valeurs absolues significativement plus faibles dès J+75 dans ce groupe comparativement au groupe SP (Figure 22D).

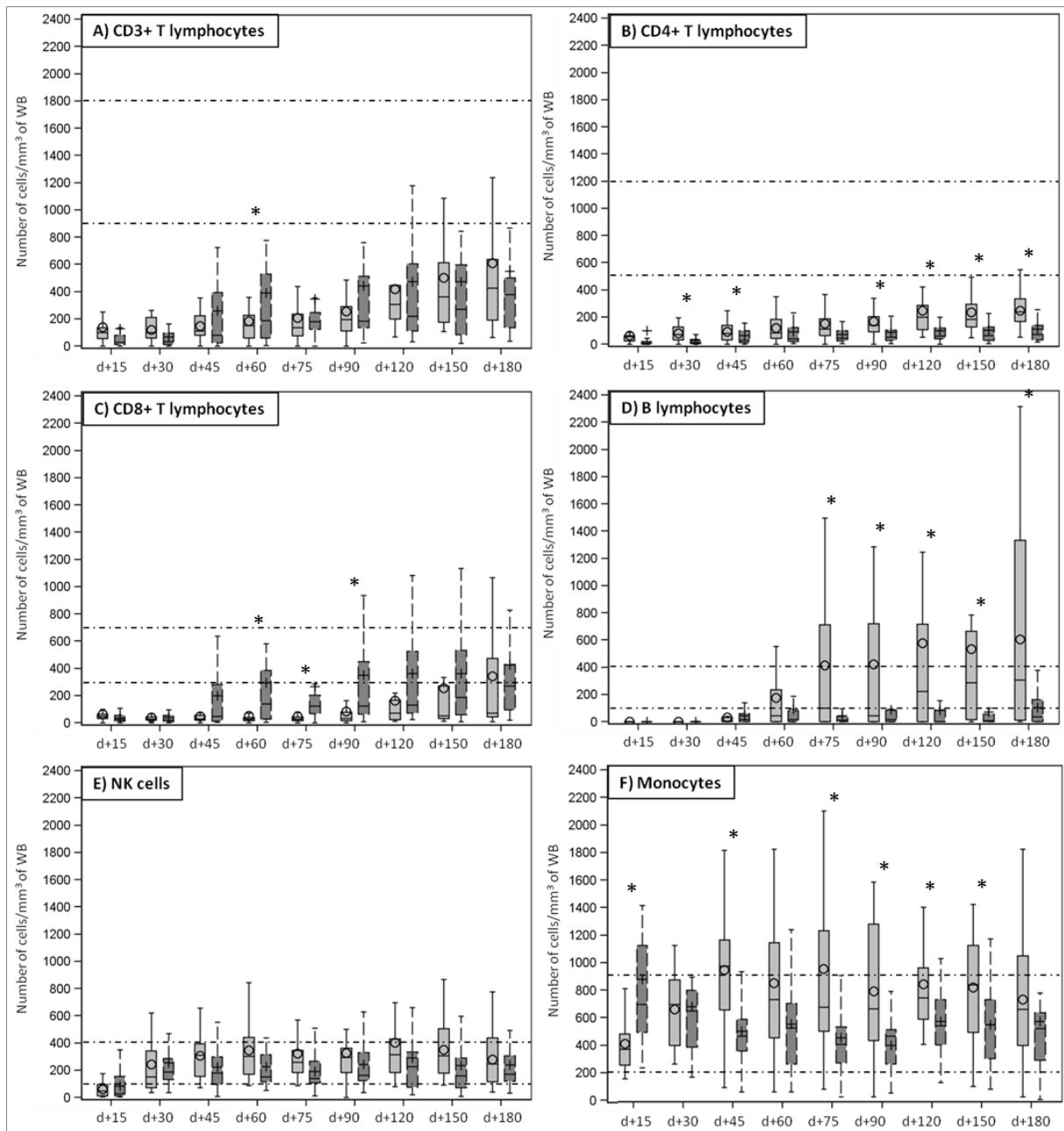
Les cellules NK constituaient la première sous-population lymphocytaire à reconstituer après l'allogreffe et les valeurs normales étaient atteintes dès J+30 dans les 2 groupes. Les médianes de valeurs absolues étaient équivalentes entre les deux groupes à chaque point de suivi (Figure 22E).

Enfin, les taux médians de monocytes étaient retrouvés dans les valeurs normales tout le long du suivi dans le groupe CSP, à l'exception du J+15 pour lequel la médiane des valeurs absolues se situait dans les valeurs normales hautes. Dans le groupe SP, les valeurs absolues de monocytes étaient dans la norme durant le premier mois puis atteignaient des valeurs normales hautes voire les dépassaient de J+45 à J+180. Ces valeurs étaient significativement

plus élevées que celles observées dans le groupe CSP à J+45 puis de J+75 à J+150 (Figure 22F).

Au total, en considérant les cinétiques de reconstitution immune durant les 6 mois de suivi et en utilisant des modèles mixtes linéaires pour l'analyse, les deux populations cellulaires pour lesquelles une différence significative a été observée entre les deux groupes étaient les lymphocytes B ( $p < 0.0001$ ) et les monocytes ( $p = 0.0007$ ) qui reconstituent plus rapidement et à des taux plus élevés dans le groupe SP.

Malgré les différences ponctuelles observées au cours du suivi post-greffe, concernant les sous-populations lymphocytaires T, l'analyse en modèle mixte linéaire n'a pas mis en évidence de différence significative. Cependant elle a permis de dégager des tendances : les lymphocytes T CD4+ tendent en effet, à reconstituer plus rapidement à des taux plus élevés dans le groupe SP ( $p = 0.09$ ) alors que l'inverse est observé pour les lymphocytes T CD8+ ( $p = 0.06$ ).



**Figure 22. Comparaison de la reconstitution immunitaire au cours du temps post-transplantation en fonction du type de greffe.** Les données pour les patients du groupe SP (n=27) sont représentées par les box plots gris clairs (■) et celles pour les patients du groupe CSP (n=33) sont illustrées par les box plots gris foncés (■). A : lymphocyte T total ; B : lymphocytes T CD4+ ; C : lymphocytes T CD8+ ; D : lymphocytes B ; E : cellules NK ; F : monocytes. Les valeurs normales hautes et basses sont figurées par les traits horizontaux hachurés. Axes des abscisses : délai post-greffe en jours ; axes des ordonnées : nombre de cellules par mm<sup>3</sup> de sang total. Les astérisques indiquent les différences significatives (p<0.05).

#### 1.4. Discussion

Dans cette étude nous avons évalué l'impact de l'utilisation de la greffe de SP comme source alternative de CSH sur la reconstitution immune et sur l'incidence des cinq principales infections virales opportunistes rencontrées après allogreffe de CSH. Pour répondre à nos objectifs, nous avons comparé de manière prospective deux cohortes homogènes de patients adultes recevant soit une greffe de SP soit une greffe de CSP d'un donneur non apparenté. Alors que les incidences de prise de greffe, de rechute, de GVHD aiguë et de mortalité étaient similaires entre les deux groupes, confirmant le fait que le SP constitue une alternative fiable comme source de greffon pour les patients (Le Bourgeois *et al.*, 2013a; Brunstein *et al.*, 2007, 2012), nous avons pu mettre en évidence des corrélations étroites entre type de greffe et certaines infections virales et entre type de greffe et cinétique de reconstitution immune.

Considérant les infections virales, les deux principaux points que nous avons démontrés sont l'association significative entre infection à HHV-6 et greffe de SP et entre infections à EBV et greffe de CSP. La comparaison des données de la reconstitution immune, nous a permis de mettre en évidence des cinétiques de reconstitution significativement différentes entre les deux groupes.

Sans surprise, le premier résultat que nous confirmons est l'incidence élevée des infections à HHV-6 après allogreffe de SP (ici, 84% des patients) (Betts *et al.*, 2011; Chevallier *et al.*, 2010; Hill *et al.*, 2012; Yamane *et al.*, 2007; Zerr *et al.*, 2012). Les réactivations à HHV-6 surviennent dans le premier mois qui suit la greffe, persistent au-delà du sixième mois chez la plupart des patients, et peuvent même être observées jusqu'à 4 ans post-greffe comme nous l'avons montré dans une étude récente (Illiaquer *et al.*, 2014) (voir partie expérimentale n°3).

Il n'existe actuellement aucun argument permettant d'expliquer ce phénomène. L'absence de lymphocytes T spécifiquement dirigés contre l'HHV-6 pourrait expliquer en partie un mauvais contrôle de la réplication après greffe de SP. Cependant, l'absence de lymphocytes T EBV- ou CMVH-spécifiques est également une des caractéristiques des greffes de SP alors que ces deux infections virales ne sont pas plus fréquentes dans ce contexte. Une des hypothèses envisageable était que le greffon de SP puisse constituer une source de virus exogène. Ceci est peu probable pour les SP car la proportion de nouveau-nés contaminés *in utero*, principalement par transmission de ciHHV6 d'un des parents, ne paraît pas excéder 1% (Hall *et al.*, 2004). Nous avons exclu cette hypothèse dans l'étude précédente en montrant l'absence de détection d'ADN d'HHV-6 dans les échantillons de SP testés (Chevallier *et al.*,

2010), ce qui est un argument plutôt en faveur d'une réactivation d'un virus endogène du receveur. Nous avons, au tout début de l'étude, évoqué l'implication du seul récepteur connu à l'époque, le CD46 et suggéré une expression plus importante du CD46 sur une ou plusieurs populations cellulaires contenues dans le greffon de SP ou sur les lymphocytes T, cible privilégiée de l'HHV-6, au cours de la reconstitution immunitaire après ce type de greffe. Cependant, un travail mené au laboratoire visant à comparer le niveau d'expression du CD46 entre les trois sources de greffons (MO, CSP et SP) a montré une expression significativement diminuée non seulement sur les cellules CD34+, mais sur quasiment toutes les populations cellulaires étudiées (Chevallier *et al.*, 2013b). De plus, l'étude de l'expression du CD46 sur les lymphocytes T au cours de la reconstitution immunitaire, a révélé un niveau d'expression équivalent après SP ou CSP (données non présentées). Ces résultats nous avaient alors conduits à la conclusion que le CD46 n'était pas impliqué dans la survenue plus fréquente des infections à HHV-6 après greffe de SP. Au cours de cette thèse, des travaux de l'équipe japonaise de Mori *et al.* ont mis en évidence l'existence d'un autre récepteur pour l'HHV-6B (Tang *et al.*, 2013), qui est le virus majoritairement impliqué dans les cas de réactivations après allogreffe (Boutolleau *et al.*, 2006b; de Pagter *et al.*, 2008b; Zerr *et al.*, 2005b). Ce récepteur putatif, le CD134 ou OX-40, qui est exprimé à la surface des lymphocytes T CD4+ activés, c'est-à-dire à la surface de la cellule la plus permissive à l'infection par HHV-6B (Lusso *et al.*, 1988; Takahashi *et al.*, 1989), pourrait jouer un rôle sur l'incidence plus élevée d'infections à HHV-6 observée chez les receveurs de SP. Il est à présent nécessaire de réaliser des études de l'expression de cette molécule au cours de la reconstitution immunitaire chez des patients allogreffés de SP, afin de déterminer son implication éventuelle dans la survenue des infections à HHV-6 après ce type de greffe.

Comme nous l'avons évoqué dans les rappels bibliographiques le pouvoir pathogène de l'HHV-6 est encore controversé.

Nos résultats confirment que les patients infectés précocement après la greffe par HHV-6 présentent des retards significatifs à la sortie d'aplasie et de fait nécessitent plus de transfusions en culots globulaires et plaquettaires (Boutolleau *et al.*, 2003; Chevallier *et al.*, 2010; Dulery *et al.*, 2012; Imbert-Marcille *et al.*, 2000). Au cours de notre étude, nous n'avons pas observé de manifestations cliniques sévères associées à l'HHV-6, en particulier dans le groupe SP, et ce malgré l'incidence très élevée d'infections et la détection dans un certain nombre de cas de CV HHV6 élevées (supérieures à  $10^3$ - $10^4$  voire  $10^5$  cop/mL de ST), comme l'ont montré d'autres équipes (Jeulin *et al.*, 2013). Nous n'avons pas mis en évidence de lien



entre infection à HHV-6 et mortalité ou survenue de GVHD aiguë comme l'ont rapporté d'autres études (de Pagter *et al.*, 2008a, 2013; Yamane *et al.*, 2007; Zerr *et al.*, 2012). De plus, aucun cas d'encéphalite n'a été diagnostiqué y compris dans le groupe SP (Hill *et al.*, 2012; Ogata *et al.*, 2015; Scheurer *et al.*, 2012). L'absence de telles complications dans notre cohorte de patients greffés de SP pourrait s'expliquer, en partie, par l'intensité du conditionnement (RIC dans notre étude) et/ou par le type de conditionnement RIC utilisé. En effet, l'impact délétère des réactivations à HHV-6 a principalement été décrit chez des patients recevant un conditionnement myéloablatif, notamment au sein de cohortes pédiatriques, pour lesquelles ce type de conditionnement est prédominant (de Pagter *et al.*, 2013). Tous les patients du groupe SP ont reçu un conditionnement TCF RIC, développé par l'équipe de Minneapolis il y a plus de dix ans, qui est le RIC standard couramment utilisée chez l'adulte (Brunstein *et al.*, 2007). Il a la particularité de ne pas comprendre l'utilisation de SAL, qui a été décrite comme étant un facteur de risque d'une mauvaise survie et d'une mortalité, non liée à la rechute, plus élevée après greffe de SP (Pascal *et al.*, 2015). L'utilisation de SAL dans le contexte des greffes de SP a également été associée à la survenue d'infections sévères à EBV, dans une étude où l'HHV-6 n'a pas été recherché (Brunstein *et al.*, 2006). Une étude récente a montré que l'utilisation de SAL pourrait être un facteur de risque d'encéphalite à HHV-6 après greffe de SP (Olson *et al.*, 2014). Ainsi, pour toutes les raisons évoquées ci-dessus, l'utilisation de SAL n'est pas recommandée en prophylaxie de la GVHD chez les patients recevant une greffe de SP.

D'autre part, nous n'avons pas mis en évidence d'association entre infection HHV-6 et les autres infections virales opportunistes recherchées, en particulier avec les infections à CMVH comme cela a été rapporté par d'autres équipes (Betts *et al.*, 2011; Yamane *et al.*, 2007; Zerr *et al.*, 2012). Le CMVH, est un virus proche de l'HHV-6. Ils appartiennent à la même sous-famille virale, la famille des  $\beta$ -*Herpesvirinae* et partagent un tropisme commun pour les monocytes-macrophages et les progéniteurs hématopoïétiques (De Bolle *et al.*, 2005; Crough & Khanna, 2009). Le fait que nous mettions en évidence que le type de greffon n'influence pas la survenue d'infections à CMVH (incidence similaire d'infections à CMVH entre les deux groupes de patients étudiés) comme cela a déjà été rapporté (Walker *et al.*, 2007), renforce l'étroitesse du lien entre HHV-6 et greffe de SP. L'incidence d'infections à CMVH au sein de notre cohorte (37%) est relativement faible par rapport à d'autres études, en particulier après SP (Matsumura *et al.*, 2007). Ceci pourrait s'expliquer par la faible séroprévalence du CMVH dans notre région (30%-40%). Comme attendu, les patients

séropositifs pour leCMVH en pré-greffe sont plus à risque de développer des réactivations en post-greffe(Beck *et al.*, 2010; Ruggeri *et al.*, 2011).

L'étude des réactivations à BKPyV nous a permis de confirmer de manière prospective une association significative entre ce type de réactivations virales et la greffe de SP(Rorije *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2010). Cependant,l'incidence des cystites hémorragiques à BKPyV était équivalente entre les deux groupes. Ainsi dans notre étude le fait d'avoir une virémie BKPyV positive ne constitue pas un facteur de risque de développer une cystite hémorragique après la greffe comme cela a été rapporté par plusieurs auteurs(Erard *et al.*, 2005; Laskin *et al.*, 2013; O'Donnell *et al.*, 2009) et ce malgré des valeurs de CV parfois élevées. Il est d'ailleurs intéressant de noter que parmi les 10 patients ayant développé une cystite hémorragique, seul un patient avait une CV sanguine élevée (supérieure à  $4\log_{10}\text{cop/mL}$ ) les autres avaient des CV sanguines négatives ( $n=3$ ) ou inférieures à  $4\log_{10}\text{cop/mL}$  ( $n=6$ ). Le faible nombre de cas symptomatiques dans notre étude, et en particulier dans le groupe SP, pourrait s'expliquer, là encore, par le type de conditionnement utilisé (Silva *et al.*, 2010) et l'absence d'utilisation de SAL(Gaziev *et al.*, 2010).

Le rôle du SP sur les réactivations à BKPyV n'est pas clairement défini mais un déficit quantitatif et qualitatif de l'immunité spécifique anti-BKPyV en post-greffe (Laskin *et al.*, 2013)pourrait expliquer d'une part, la difficulté des patients à contrôler la réactivation et d'autre part, l'absence d'infections symptomatiques malgré une incidence de réactivation élevée (Dropulic & Jones, 2008). En effet, la physiopathologie de la cystite hémorragique à BKPyV après greffe de CSH est mal définie mais certains auteurs évoquent un rôle direct des CTLs anti-BKPyV dans la survenue des lésions muqueuses et de l'hémorragie au niveau du tractus génito-urinaire (Dropulic & Jones, 2008). Ainsi, un taux plus faible ou un déficit fonctionnel de ces lymphocytes après greffe de SP, pourrait expliquer la faible incidence des cas d'infections symptomatiques à BKPyV.

Les infections à ADV ont été retrouvées avec une faible incidence uniquement dans le groupe SP, ce qui confirme que les patients recevant une greffe de SP sont plus à risque de développer ce type d'infections, comme cela a été rapporté précédemment par d'autres auteurs (Benjamin *et al.*, 2002; Robin *et al.*, 2007). Là encore, les raisons de l'association ADV et greffe de SP ne sont pas clairement établies et ne s'expliquent pas, par exemple, par une expression plus importante d'un de ses récepteurs, le CD46 dans les greffons d'origine placentaire comparativement aux autres types de greffons(Chevallier *et al.*, 2013b)ou au cours de la reconstitution immune.

A l'inverse de ce que nous avons observé pour l'HHV-6, nous avons mis en évidence une association étroite entre l'utilisation des greffons de CSP et le risque de survenue de réactivations à EBV. Nous n'avons pas retrouvé cette association lors de la première étude (Chevallier *et al.*, 2010), probablement à cause de l'hétérogénéité de la cohorte de patients inclus et au caractère rétrospectif de cette étude. Ce résultat est discordant avec ceux obtenus par Jacobson *et al.* (2012) qui ont montré que l'incidence de survenue de PTLD était plus élevée après greffe de SP comparativement à des patients greffés de CSP. Par ailleurs, la fréquence élevée de réactivations à EBV, que nous mettons en évidence après greffe de CSP, est probablement plutôt liée à l'utilisation de SAL dans ce groupe de patients qu'à la source de CSH. En effet, plusieurs études comparant les conditionnements contenant du SAL à ceux qui n'en contiennent pas, ont montré que le fait de recevoir du SAL constitue le principal facteur de risque de développer une infection à EBV et/ou un PTLD, aussi bien après greffe de CSP (van Esser *et al.*, 2002; Peric *et al.*, 2011) qu'après greffe de SP (Brunstein *et al.*, 2006; Dumas *et al.*, 2013). Néanmoins, l'introduction d'un traitement pré-emptif par rituximab permet de prévenir la survenue de PTLD avec une bonne balance entre efficacité et toxicité (Peric *et al.*, 2011).

Enfin, une grande majorité des patients inclus dans notre étude (66%, n=43/65), a présenté des réactivations/infections virales multiples en période post-greffe. Ce point renforce l'intérêt et la pertinence clinique de développer des alternatives thérapeutiques comme la génération rapide *in vitro* de CTLs multivirus-spécifiques permettant de traiter plusieurs infections virales en même temps (Papadopoulou *et al.*, 2014).

Concernant l'étude de la reconstitution immunitaire, les résultats les plus significatifs, en comparant nos deux groupes de patients, ont été observés pour les lymphocytes B et les monocytes.

Les lymphocytes B reconstituent plus rapidement et avec des taux beaucoup plus élevés après greffe de SP. Ce phénomène a déjà été rapporté par d'autres équipes aussi bien après conditionnement RIC (Jacobson *et al.*, 2012) que myéloablatif (Kanda *et al.*, 2012) et persiste bien au-delà du 6<sup>ème</sup> mois post-greffe, comme nous l'avons montré dans une étude récemment publiée (Illiaquer *et al.*, 2014) (voir partie expérimentale n°3). Par ailleurs, il a été montré que BAFF (*B cell activating factor*), qui est un membre de la famille du TNF et qui joue un rôle majeur dans la reconstitution des cellules B après myéloablation (Gorelik *et al.*, 2003), était détecté à des niveaux plus élevés après greffe de SP comparativement à des greffes de CSP (Jacobson *et al.*, 2012). Cette sécrétion plus importante de BAFF pourrait contribuer à

expliquer les taux élevés de lymphocytes B observés après ce type de greffe. Il est intéressant de noter que malgré des taux significativement plus élevés de lymphocytes B (site de latence de l'EBV) après greffe de SP, les patients greffés avec ce type de greffon, ne sont pas plus à risque de développer un PTLD. Il est possible que la reconstitution rapide en lymphocytes B en pré-greffe compense le déficit précoce en lymphocytes T observé après greffe de SP (Kanda *et al.*, 2012). La même hypothèse peut être émise concernant la reconstitution significativement plus rapide et à des taux plus élevés des monocytes que nous mettons en évidence dans notre étude. A notre connaissance aucune étude n'a investigué la reconstitution monocyttaire après greffe de SP, il serait intéressant de confirmer nos résultats car des travaux rétrospectifs ont montré qu'une valeur absolue plus élevée de monocytes en période précoce post-greffe est associée à un meilleur devenir des patients après greffe de CSP (Le Bourgeois *et al.*, 2013b) et de SP (Le Bourgeois *et al.*, 2015).

Nous ne retrouvons pas ici les différences observées lors de l'étude rétrospective concernant les reconstitutions en lymphocytes T CD8+ et en NK. Ceux-ci avaient mis en évidence des taux significativement plus élevés de lymphocytes T CD8+ à M3 et M6 post-greffe dans le groupe CSP et un taux plus élevé de cellules NK à M3 dans le groupe SP (Chevallier *et al.*, 2010). Nous mettons cependant en évidence une tendance à la reconstitution plus rapide des lymphocytes T CD8+ dans le groupe CSP malgré l'absence de significativité statistique avec le modèle utilisé pour l'analyse des données immunologiques.

En conclusion, notre étude montre que l'incidence des infections à HHV-6 en post-allogreffe est dépendante du type de greffon utilisé. Nous confirmons l'existence d'une relation spécifique entre HHV-6 et greffe de SP dont l'explication n'est, à l'heure actuelle, pas encore formellement établie. Par ailleurs, les données cliniques recueillies montrent que les infections à HHV-6 après greffe de SP et conditionnement RIC ne semblent pas avoir un impact majeur sur le devenir des patients et que, par conséquent, il ne paraît pas pertinent de recommander la mise en place d'un traitement systématique antiviral spécifique dans ce contexte. Enfin, les cinétiques de reconstitution immune diffèrent en fonction du type de source de CSH utilisée mais ne permettent pas d'expliquer les différences observées sur l'incidence d'infections virales entre les deux groupes.

Ce premier travail a fait l'objet de plusieurs communications orales et affichées dans des congrès nationaux et internationaux et d'un article soumis dans *Haematologica* (*Article n°1 dans l'annexe 1, p194*))

## **2. Détection du génome d'HHV-6 sur différentes sous-populations leucocytaires au cours de la reconstitution immune après greffe de sang placentaire.**

Comme nous l'avons évoqué observé au cours de l'étude rétrospective, les différences de reconstitution immune en période post-greffe observées au cours de l'étude rétrospective entre les patients recevant une greffe de SP et ceux recevant une greffe de CSP, nous avaient conduit à émettre l'hypothèse qu'une sous-population leucocytaire majoritaire après greffe de SP puisse être le siège d'une répllication de l'HHV-6. Ceci permettrait d'expliquer l'incidence plus élevée de ce type d'infections dans ce contexte. Pour répondre à cette problématique, nous avons prévu, lors de la mise en place du protocole prospectif, de recueillir des PBMCs chez les patients inclus, afin de réaliser des tris des différentes sous-populations leucocytaires (lymphocytes T, lymphocytes B, cellules NK et monocytes) et de rechercher le génome d'HHV-6 par PCR dans chacune des fractions cellulaires.

### **2.1. Matériels et méthodes**

#### *Isolement des PBMCs à partir du sang périphérique des patients infectés par l'HHV-6*

Les PBMCs sont isolées par séparation sur gradient de densité (Ficoll) au laboratoire de Virologie du CHU de Nantes à partir des prélèvements de sang périphérique recueillis sur tubes héparinés. Deux volumes de sang dilué en RPMI (PAA Laboratories GmbH, Pishing, Autriche) sont déposés sur un volume de milieu de séparation de lymphocytes (MSL, PAA Laboratories GmbH, Pishing, Autriche). Après centrifugation pendant 25 minutes à 1500 tours/min sans frein, l'anneau de cellules mononucléées formé à l'interface du plasma et du MSL est récupéré, puis lavé avec du RPMI à plusieurs reprises. Le culot de PBMCs obtenu est alors repris dans un milieu contenant du RPMI supplémenté avec 50% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté et de 10% de DMSO à la concentration de  $1.10^7$  cellules/mL avant congélation en azote pour analyses ultérieures.

Tris des différentes sous-populations leucocytaires par cytométrie en flux (CMF) à partir des PBMCs

▪ *Décongélation des PBMCs*

Les ampoules de PBMCs sont décongelées rapidement dans un bain-marie à 37°C sous agitation lente. Immédiatement après la décongélation, les tubes sont décontaminés avec une gaze imbibée d'alcool, les suspensions cellulaires sont alors transférées dans des tubes falcon de 15 mL, contenant 10 mL de RPMI + 50% de SVF. Ces tubes sont ensuite centrifugés 5 min à 1500 tours/min sans frein. Les surnageants sont éliminés par retournement et les culots cellulaires repris dans 3 mL de RPMI + 10% de SVF pour comptage.

Une fraction de  $5 \cdot 10^5$  cellules pour chaque ampoule de PBMCs décongelée est transférée dans un tube Eppendorff qui est centrifugé 10 min à 2500 tours/min. Après élimination du surnageant, le culot cellulaire est repris dans 200  $\mu$ L de PBS (*phosphate-buffered saline*) puis congelé à moins -80°C pour les analyses par biologie moléculaire.

Les cellules restantes sont à nouveau centrifugées 5 mn à 1500 tours/min en vue de la réalisation du marquage.

▪ *Marquage des PBMCs pour réalisation des tris en CMF*

Après élimination du surnageant, les culots cellulaires sont repris dans une suspension de PBS et d'anticorps monoclonaux (AcMo) directement couplés à des fluorochromes à la concentration de  $5 \cdot 10^8$  cellules/300 $\mu$ L puis incubés 20 min à 4°C à l'abri de la lumière. Les AcMo utilisés pour le marquage sont détaillés dans le Tableau 11. Après incubation, les cellules sont lavées par ajout de 4 mL de PBS, centrifugées 5 min à 1500 tours/min puis après élimination du surnageant, reprises dans une solution de PBS + 2% de SVF + 2mM EDTA à la concentration finale de  $3 \cdot 10^7$  cellules/mL.

**Tableau 11. Caractéristiques des AcM utilisés pour le marquage des PBMCs avant tri cellulaire.**

Dénomination	Clone BD	Cible antigénique	Fluorochrome	Concentration
Anti-CD3	UCHT-1	Récepteur des cellules T (TCR)	PerCP	1/12 <sup>e</sup>
Anti-CD19	HIB19	Récepteur des cellules B (BCR)	FITC	1/200 <sup>e</sup>
Anti-CD14	M $\phi$ P9	Antigène monocytaire	PE	1/100 <sup>e</sup>
Anti-NKp46	9E2/NKp46	Récepteur activateur des NK	APC	1/20 <sup>e</sup>

Abréviations : BD, Becton Dickinson (San Jose, CA, USA); PerCP, Peridin-chlorophyll-protein complex; FITC, isotiocyanate de fluorescéine; PE, Phycoérythrine; APC, allophycocyanine

- *Tris cellulaires par CMF*

Avant passage sur l'analyseur, les cellules sont filtrées puis marquées avec une solution de DAPI ou 4',6'-diamidino-2-phénylindole (concentration 1/100<sup>e</sup>) afin de différencier les cellules mortes des cellules vivantes. Un immunophénotypage des PBMCs avant tri est réalisé sur les cellules vivantes (DAPI négatives) afin de s'assurer de la présence de toutes les fractions cellulaires d'intérêt. Les tris cellulaires sont ensuite réalisés sur les cellules vivantes à l'aide de l'analyseur FACS Aria II (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) en collaboration avec l'équipe INSERM UMR1064. Après tri, la pureté est évaluée, sur le même cytomètre, pour chacune des fractions leucocytaires recueillies (lymphocyte T, lymphocytes B, cellules NK et monocytes).

Parmi les cellules vivantes, les lymphocytes et les monocytes sont sélectionnés sur des critères de taille (FSC, *forward scatter*) et de granulométrie (SSC, *side scatter*). Les différentes sous-populations sont ensuite triées en fonction de l'expression du CD3 pour les lymphocytes T, du CD19 pour les lymphocytes B, du NKp46 pour les cellules NK et du CD14 pour les monocytes.

Les suspensions de cellules triées sont ensuite centrifugées 10 min à 2500 tours/min. Après élimination du surnageant, le culot est repris dans 200 µL de PBS puis congelé à -80°C pour les analyse par biologie moléculaire.

### Amplification génique

- *Extraction des acides nucléiques*

Les acides nucléiques sont extraits à partir des culots cellulaires recueillis avant et après tri. Le protocole utilisé pour l'extraction d'ADN est détaillé en annexe 2A. Brièvement, l'ADN est extrait à partir des culots cellulaires (stockés à -80°C), à l'aide d'une trousse commercialisée (DNeasy minikit, Qiagen S.A., Courtaboeuf, France), selon les recommandations du fabricant. Après une phase de lyse cellulaire, l'ADN est fixé sur une colonne de silice, puis les impuretés sont éliminées avec différents tampons alcooliques. L'ADN est ensuite élué dans 100 µl de tampon TE.



- *Détection de l'ADN viral par PCR en temps réel*

La quantification de l'ADN viral (gène U65-66, adaptée de Gautheret-Dejean *et al.* (2000)) est réalisée sur le Rotor Gene™ 6000 (Corbett Research, Sydney, Australie). Une quantification du gène de l'albumine est conduite en parallèle afin de s'assurer de l'efficacité de l'extraction. Les amorces, les mélanges réactionnels et les programmes d'amplification utilisés sont détaillés en annexe 2B.

## 2.2. Résultats

Des tris par CMF ont été réalisés sur 14 PBMCs de patients greffés de SP, présentant une CV positive en HHV-6 à différents temps post-greffe. La liste des PBMCs sélectionnés pour cette étude ainsi que les temps post-greffe et les CV sanguines HHV-6 sont présentés dans le Tableau 13.

Les tris ont permis de recueillir des cellules pour les 4 sous-populations d'intérêt (lymphocyte T, lymphocytes B, cellules NK et monocytes) à partir de la majorité des PBMCs, à l'exception des PBMCs NE/MA J121 et HA/CL J112, pour lesquels nous n'avons pas recueilli de lymphocytes B, du fait de la lymphopénie B présentée par les patients au moment du prélèvement.

La pureté a été évaluée sur l'ensemble des sous-populations leucocytaires obtenues. Après tris était très satisfaisante dans la majorité des cas : médiane 99,4 % (intervalle : 81,8-99,9%) à l'exception de deux tris effectués à partir des PBMCs PO/GH J150 et HA/CL J112 pour lesquels les puretés de chacune des fractions recueillies sont présentées Tableau 12.

**Tableau 12. Puretés des fractions cellulaires recueillies après tris pour les échantillons de PBMCs PO/GH J150 et HA/CL J112.**

Echantillons	HA/CL J112	PO/GH J150
Lymphocytes T	39,30%	79,40%
Lymphocytes B	NA	12,2% CD19+ et 46,3% CD19faible + 3,5 % lymphocytes T
Cellules NK	5,4% NK + 65,4% monocytes + 6,9% lymphocytes T	87,8% et 7,2% monocytes
Monocytes	95,20%	98,20%

Les résultats des PCR HHV-6 réalisées sur les PBMCs totaux et sur chacune des fractions cellulaires recueillies après tri sont présentés Tableau 13.

**Tableau 13. PBMCs sélectionnés pour les tris et résultats des PCR HHV-6 réalisées sur le sang total et sur les différentes sous-populations leucocytaires**

Identité prélèvement	Temps post- greffe (jours)	PCR HHV-6 sur ST			PCR HHV-6 sur les fractions cellulaires				
		Résultat qualitatif	CV (log <sub>10</sub> cop/mL)	CV(cop/mL)	PBMCS totaux	Lymphocytes T	Lymphocytes B	Cellules NK	Monocytes
SI/AL <sup>†</sup>	J36	P	4	10000	+	+	-	-	+
LER/AN	J41	P	3,7	4500	+	+	-	+	-
GE/AM	J62	P	3,6	3700	+	+	-	-	-
RE/AU	J75	P	3,7	5200	+	+	-	-	-
HA/CL	J112	P	3,4	2800	+	+	NA	+	I
GO/EM	J118	P	3,2	1500	+	+	-	-	-
JO/MA	J118	P	3,4	2700	+	+	-	-	-
VE/DE	J120	P	3,3	1300	+	+	-	-	+
NE/MA	J121	P	3,1	1300	+	+	NA	-	
VE/JO	J130	P	3,1	1200	+	+	-	-	-
PO/GH	J150	P	3,6	3900	+	+	-	+	+
DU/GU	J154	PFA	2,8	600	+	+	-	-	-
GU/MA	J160	P	3,5	3100	+	+	-	-	-
SI/AL <sup>†</sup>	J170	P	3,0	1000	+	+	+	+	-

Abréviations: P, positif; PFA, positif faible; ST, sang total; CV, charge virale; NA, non applicable; I inhibiteur

<sup>†</sup> Echantillons prélevés chez le même patient à deux temps différents

Le génome d'HHV-6 a été détecté dans tous les échantillons de PBMCs totaux et dans les lymphocytes T pour tous les prélèvements testés (n=14). Une fraction de lymphocytes B (échantillon SI/AL J170), 4 de cellules NK (échantillons LER/AN J41, HA/CL J112, PO/GH J150 et SI/AL J170) et 3 de monocytes (échantillons SI/AL J36, VE/DE J120 et PO/GH J150) se sont révélées positives par PCR HHV-6. La PCR réalisée sur la fraction de monocytes pour le patient HA/CL était ininterprétable du fait de la présence d'un inhibiteur dans le prélèvement. Il faut néanmoins noter que la pureté des fractions de cellules NK pour HA/CL J112 et PO/GH J150 n'était pas satisfaisante (Tableau 12). La fraction HA/CL J112 comprenait des lymphocytes T positifs en PCR HHV-6 et des monocytes pour lesquels la PCR HHV-6 était ininterprétable. Celle de PO/GH J150 contenait 7,2% de monocytes eux-mêmes positifs en HHV-6, ce qui ne permet pas d'exclure que la positivité des cellules NK pour ce patient soit liée à la présence de monocytes dans cette fraction cellulaire.

### 2.3. Discussion

Sans surprise, la détection du génome d'HHV-6 est positive dans toutes les fractions de lymphocytes T testées. En effet, les HHV-6 sont décrits comme étant des virus lymphotropes et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés constituent le système cellulaire le plus permissif à l'infection par les deux espèces d'HHV-6 (Lusso *et al.*, 1988; Takahashi *et al.*, 1989). Nous n'avons pas pu, pour des modalités techniques, séparer les lymphocytes TCD4<sup>+</sup> des lymphocytes TCD8<sup>+</sup>. Nous pouvons néanmoins supposer que le génome d'HHV-6 retrouvé dans cette sous-population lymphocytaire provient très probablement des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

La détection d'HHV-6 dans d'autres types leucocytaires n'est pas corrélée aux valeurs de CV sanguine puisque la détection simultanée du génome dans 3 types cellulaires différents n'a été retrouvée qu'une seule fois, pour le patient SI/AL J170 qui avait une des CV sanguines les plus faibles ( $3.10^3 \log_{10}\text{cop/mL}$ ).

Les résultats positifs obtenus pour les autres sous-populations leucocytaires sont difficiles à interpréter puisqu'ils ne sont pas retrouvés de manière constante pour tous les échantillons triés et testés en PCR HHV-6. De plus, pour le patient SI/AL, pour lequel nous avons trié deux échantillons prélevés à des temps différents post-greffe, le génome est détecté dans les fractions de lymphocytes T et de monocytes au moment où le patient avait une CV sanguine de  $4.10^4 \log_{10}\text{cop/mL}$  alors qu'à J170, le génome est détecté dans 3 fractions cellulaires

(lymphocytes T, lymphocytes B et cellules NK) quand le patient avait une CV à  $3.10^3 \log_{10} \text{cop/mL}$ .

Néanmoins, la détection de l'HHV-6 dans 3 fractions de monocytes (3/14) est cohérente avec ce qui est décrit dans la littérature. En effet, il a été montré que les monocytes constituent une cible pour l'HHV-6B *in vitro* et *in vivo*, et sont supposés être un réservoir *in vivo* (Burd & Carrigan, 1993; Kondo *et al.*, 1991). Comme nous l'avons déjà évoqué, le fait que ces cellules puissent supporter une infection productive est encore controversé (voir paragraphe 4.3.1 de nos rappels bibliographiques). Suite à ces premiers résultats, une étudiante en master 2 a conduit au sein de notre laboratoire des essais d'infections sur une lignée monocyttaire, la lignée THP-1 (CD134 négative) afin de déterminer si ces cellules pouvaient être un site d'infection productive à une infection par la souche HST (HHV-6B). Ces résultats ont mis en évidence une absence de permissivité de ces cellules à une infection par cette souche virale (données non présentées) ce qui laisse penser que le génome détecté dans les monocytes au cours de notre étude pourrait correspondre à du virus latent. Ceci serait concordant avec l'étude de Kondo *et al.* (1991) qui a montré que l'ADN d'HHV-6B est détecté dans les monocytes circulants en l'absence de marqueur d'infection active. Ceci suggère que ces cellules puissent constituer un réservoir *in vivo* de l'infection latente (Kondo *et al.*, 1991). Cependant, les monocytes du sang périphérique sont décrits comme étant CD134 négatifs (Croft, 2010). Le mécanisme d'entrée de l'HHV-6B dans ce type cellulaire, via par exemple l'utilisation d'un autre récepteur, reste à établir.

Lors de l'étude rétrospective nous avons mis en évidence des taux significativement plus élevés de cellules NK à M3 chez les patients allogreffés de SP et nous avons supposé que ces cellules, décrites comme étant permissives à une infection par l'HHV-6A (Lusso *et al.*, 1993), puissent être le site privilégié d'une infection lytique à HHV-6B.

Les résultats obtenus au cours de notre étude montrent que les cellules NK ne constituent pas une cible majeure de l'HHV-6B dans ce contexte, puisque la détection du génome viral dans ce type cellulaire n'est pas retrouvée dans tous les échantillons testés. La détection du génome de l'HHV-6 dans 4 fractions de cellules NK, dont deux ayant des puretés de 98,50 et 99,9% (LER/AN J41 et SI/AL J170) suggère que ces cellules puissent être le siège d'une infection à HHV-6 dans certains cas. Certains auteurs ont décrit que les cellules NK peuvent exprimer de manière transitoire, la molécule CD134 (Croft, 2010). Par ailleurs, au cours d'un travail précédemment mené au laboratoire, nous avons réalisé des essais d'infections par la souche HST, de cellules NK isolées de PBMCs et mises en culture *in vitro*, ainsi que d'une

lignée de NK (NK92). Ces essais d'infections avaient mis en évidence l'absence de permissivité de ces cellules à une infection par HHV-6B. Ainsi, l'ensemble de nos résultats laissent supposer que les cellules NK pourraient être un site d'infection latente à HHV-6. Ce point n'a cependant jamais été décrit et reste à démontrer.

Enfin, de manière plus surprenante, le génome a été détecté dans les lymphocytes B (pureté 99,6%) pour un patient à J170 post-greffe. Ce résultat est d'autant plus surprenant que ce patient, pour lequel 2 échantillons prélevés à des temps différents ont été triés, avait des PCR positives était positif uniquement dans les fractions de lymphocytes T et de monocytes à J36 alors qu'il avait une charge virale plus élevée qu'à J170. De plus, à la différence des lymphocytes T, les lymphocytes B ne semblent pas constituer une cible pour l'HHV-6. Il a été montré que des cellules B devenaient sensibles à une infection par HHV-6A après immortalisation par l'EBV (Ablashi *et al.*, 1988). Ainsi, il est important de préciser que le patient SI/AL n'a pas présenté de PTLD au cours du suivi, il est donc peu probable que ce résultat puisse s'expliquer par une infection productive de l'HHV-6 dans les lymphocytes B chez ce patient. L'hypothèse selon laquelle les lymphocytes B pourraient constituer un site de latence en période post-greffe de SP ne semble pas pertinente puisque parmi les autres patients inclus dans cette étude, le génome de l'HHV-6 n'a pas été détecté dans cette sous-population leucocytaire ; ceci malgré la présence d'un taux élevé de lymphocytes B pour certains d'entre eux. De plus, les lymphocytes B n'ont jamais été décrits comme étant un site de latence de l'HHV-6 et n'expriment pas le CD134 (Croft, 2010). Enfin, cette positivité pourrait être liée à une contamination au moment du tri par du génome extracellulaire provenant des lymphocytes T, ce qui expliquerait que nous n'ayons mis en évidence une positivité des lymphocytes B que sur un seul des échantillons testés. Dans tous les cas, au vu de l'ensemble des résultats obtenus pour la fraction lymphocytes B, nous pouvons déduire que ces cellules ne constituent pas une cible majeure pour l'HHV-6B.

En conclusion, les tris des différentes sous-populations leucocytaires réalisés à partir de PBMCs de patients allogreffés de SP infectés par HHV-6 confirment que la cible cellulaire principale de l'infection par ce virus est constituée par le lymphocyte T. La détection du génome de l'HHV-6 dans des monocytes et des NK et l'absence de permissivité de ces deux types cellulaires à une infection productive par l'HHV-6, laisse supposer que ces cellules dans certains cas pourraient être des sites de latence pour ce virus mais ceci reste à démontrer.

### **3. Etude de la fréquence des infections à HHV-6 à distance de l'allogreffede CSH**

Après s'être intéressé aux infections précoces à HHV-6 après allogreffe de CSH et avoir confirmé l'existence d'une association étroite entre ce type d'infection virale et la greffe de SP, nous avons évalué, dans ce troisième travail, la fréquence et les conséquences cliniques éventuelles des réactivations à HHV-6 à distance de la transplantation. Nous avons comparé de manière prospective la fréquence des virémies positives à HHV-6 et le statut immunitaire entre deux groupes de patients allogreffés ayant reçu soit une greffe de SP soit une greffe de CSP provenant d'un donneur familial ou non-apparenté(*Article n°2, dans l'annexe 1, p 223*).

#### **3.1. Caractéristiques des patients inclus**

Nous avons inclus dans cette étude 48 patients adultes ayant reçu entre février 2006 et Janvier 2012 une allogreffe de SP (n=23) ou une allogreffe de CSP (n=25). Pour pouvoir être inclus dans cette étude, les patients devaient être en vie au-delà de un an post-greffe et être en rémission complète de leur maladie initiale. Les caractéristiques de ces patients (âge, sexe, type de pathologie, statut de maladie à la transplantation, type de conditionnement et âge médian à la transplantation) étaient similaires entre les deux groupes à l'exception de l'utilisation de SAL qui était significativement plus fréquente dans le groupe CSP (les caractéristiques des patients de la cohorte sont détaillées dans le Tableau 14). Des échantillons sanguins ont été prélevés pour chaque patient entre octobre 2012 et janvier 2013 lors des consultations de suivi systématique dans le service d'hématologie clinique, pour les analyses virologiques et immunologiques. Le délai médian entre le moment de la greffe et celui des prélèvements était de 3.9 ans (intervalle : 1.3-7.1) et était équivalent entre les deux groupes de patients étudiés.

**Tableau 14. Caractéristiques des patients de la cohorte**

	Groupe SP N=23	Groupe CSP N=25	P-value
<i>Age: années (intervalle)</i>	54 (20-69)	53 (38-69)	0.26
<i>Sexe: masculin</i>	10 (56%)	12 (55%)	0.75
<i>Maladie initiale</i>			
Leucémie aiguë myéloïde	9 (39%)	12 (48%)	
Syndrome myéloprolifératif	1 (4.5%)	1 (4%)	
Leucémie myéloïde chronique	1 (4.5%)	1 (4%)	
Lymphome non Hodgkinien	10 (43%)	6 (24%)	
Leucémie lymphoïde chronique	0	1 (4%)	
Leucémie aiguë lymphoïde	1 (4.5%)	2 (8%)	
Aplasie médullaire	1 (4.5%)	2 (8%)	0.52
<i>Myéloïde/lymphoïde*</i>	11/11	14/9	0.90
<i>Statut de la maladie initiale*</i>			
Risque standard	7 (32%)	12 (52%)	
Haut risque	15 (68%)	11 (48%)	0.38
<i>Année médiane de la transplantation(intervalle)</i>	2008 (2006-2012)	2009 (2006-2011)	0.44
<i>Type de conditionnement</i>			
Myéloablatif	4 (17%)	4 (16%)	
Intensité réduite	19 (83%)	21 (84%)	1
<i>SAL: oui</i>	2 (10%)	19 (93%)	<0.0001

Abréviations: SP, sang placentaire; CSP, cellules souches périphériques; SAL, sérum anti-lymphocytaire.

\*n'inclus pas l'aplasie médullaire



### 3.2. Résultats

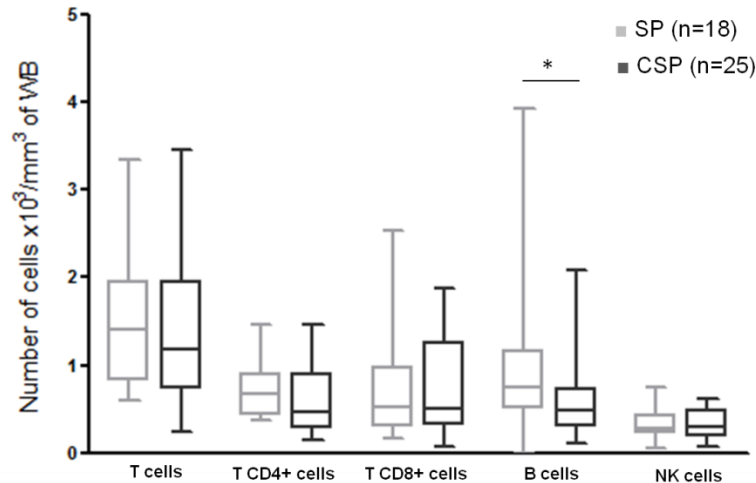
Parmi les 48 patients inclus, 12 (52%) avaient une virémie positive à HHV-6 dans le groupe SP avec une valeur de charge virale médiane de 2.7 log<sub>10</sub>cop/mL (intervalle 2 – 3.4) contre seulement un patient (4%) dans le groupe PBSC (charge virale : 2 log<sub>10</sub>cop/mL).

La comparaison entre infections précoces (survenant dans la première année post-greffe) et les résultats obtenus au cours de cette étude n'a été analysée que pour 37 des 48 patients à cause d'un suivi incomplet par PCR HHV-6 dans la première année pour 11 patients (1 du groupe SP et 10 du groupe CSP)

Parmi les 19 patients (86.4%) du groupe SP infectés par l'HHV-6 au cours de la première année post-greffe, 12 (63.1%) présentaient toujours une réactivation à distance de la greffe. Trois patients (13.6%) de ce même groupe avaient des PCR HHV-6 négatives tout au long du suivi. Dans le groupe CSP, 14 patients (93.3%) n'ont jamais présenté de réactivation à HHV-6 aux différents points de suivi, alors qu'un patient infecté au cours de la première année ne présentait plus de réactivation à distance de la greffe.

La comparaison des taux des différentes sous-populations lymphocytaires (présentés Figure 23) entre les deux groupes a mis en évidence des taux significativement plus élevés de lymphocytes B dans le groupe SP par rapport au groupe CSP. Aucune différence n'était observée concernant les taux de lymphocytes T totaux, de lymphocytes T CD4+, de lymphocytes T CD8+ ou de cellules NK. A noter, que comme dans l'étude n°1, il existe une très grande variabilité des taux de lymphocytes en fonction des individus. Les taux sériques d'immunoglobulines étaient équivalents entre les deux groupes. Dans le groupe SP, les patients ayant une valeur absolue élevée de lymphocytes B (>médiane : 0.74 G/L) ne présentaient pas plus de réactivations à HHV-6 (56% vs 67%, p=1). De plus, aucune corrélation significative n'a été mise en évidence entre les valeurs absolues de lymphocytes B et les réactivations à HHV-6.

Par ailleurs, aucun signe clinique particulier n'a été observé chez les patients ayant une réactivation persistante à HHV-6, parmi la cohorte étudiée.



**Figure 23. Comparaison des taux de lymphocytes à distance de l'allogreffe entre deux types de sources de CSH.** Délai post-greffe médian au moment de l'analyse : SP, 4 ans et CSP, 3.8 ans). Données manquantes pour 5 patients du groupe SP. \* $p < 0.05$ . Abréviations : SP, sang placentaire ; CSP, cellules souches périphériques

### 3.3. Discussion

A notre connaissance, notre étude est la première à s'être intéressée à l'évaluation des réactivations persistantes à HHV-6 après allogreffe de SP. Les allogreffes de SP représentent une alternative fiable et sont largement utilisées pour traiter des patients éligibles à l'allogreffe n'ayant pas de donneur vivant familial ou non-apparenté. Comme nous et d'autres équipes l'ont montré, la greffe de SP est associée à une incidence plus élevée des infections à HHV-6 chez les receveurs, comparativement aux greffes utilisant une autre source de greffon, principalement les CSP (Chevallier *et al.*, 2010; Hill *et al.*, 2012; Jeulin *et al.*, 2013). Nous montrons ici, qu'une virémie à HHV-6 est toujours détectable chez la moitié des patients allogreffés de SP jusqu'à 4 ans post-transplantation. Comme attendu, une réactivation à HHV-6 ne semble pas associée à la survenue de symptômes cliniques particuliers chez les patients (Article n°1, annexe 1, p194). L'absence d'impact clinique pourrait cependant s'expliquer par le fait que nous avons inclus, dans cette étude, uniquement des patients en bonne santé et que de plus, les CV HHV-6 détectées au cours de notre étude étaient relativement faibles. Les différences observées au niveau de la reconstitution immune, avec des taux significativement plus élevés de lymphocytes B après greffe de SP, ne permettent pas d'expliquer, là encore, l'association entre HHV-6 et ce type de greffe. Par ailleurs, le risque d'infections virales après greffe de SP est généralement limité aux trois premiers mois post-greffe (Jacobson *et al.*, 2012) alors qu'un déficit en lymphocytes B retardé après la greffe est décrit comme étant le

principal facteur de risque de survenue d'infections tardives (Corre *et al.*, 2010). Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que les réactivations à HHV-6 observées après greffe de SP pourraient s'expliquer par un déficit qualitatif des cellules effectrices du système immunitaire après ce type de greffe, néanmoins comme nous l'avons montré dans la partie expérimentale n°1, l'incidence d'autres réactivations de virus proches de l'HHV-6, tels que le CMV ou l'EBV n'est pas plus élevée après ce type de greffe. Une autre hypothèse, déjà évoquée, est que les caractéristiques des cellules qui reconstituent après la greffe diffèrent en fonction de la nature de la source de CSH et influencent la survenue de ces réactivations tardives à HHV-6. Ainsi, nous pouvons supposer que les cellules d'origine placentaire et, en particulier les lymphocytes T CD4+, pourraient être plus sensibles à une infection permissive à HHV-6 même à distance de la greffe. Il faudrait à présent réaliser une étude de l'expression du CD134, sur les lymphocytes T CD4+ des patients, non seulement en période précoce post-greffe mais également à distance de celle-ci, en comparant des patients allogreffés de SP à ceux ayant reçu un greffon de CSP, afin de voir si cette molécule est plus fortement exprimée dans le premier cas.

Un autre point intéressant de notre travail est d'avoir évalué les statuts immunitaires à distance de la greffe en comparant des patients allogreffés de SP à des patients allogreffés de CSP. En effet, les données sur la reconstitution immune proviennent généralement de résultats obtenus au cours de la première année post-greffe. Seules de rares études ont investigué le statut immunitaire à long terme après allogreffe de SP et ce uniquement jusqu'à 2-3 ans post-transplantation (Cohen *et al.*, 2006; Jacobson *et al.*, 2012). Dans notre travail expérimental n°1 nous avons mis en évidence des différences significatives de reconstitution immune chez les patients greffés de SP comparativement à ceux ayant reçu une greffe de CSP. Nous montrons ici, que des différences peuvent persister à long terme en fonction des types de sources de CSH utilisées pour la greffe, avec en particulier, la mise en évidence de taux significativement plus élevés de lymphocytes B même 4 ans après la greffe de SP. Le mécanisme à l'origine de cette hyperlymphocytose B persistante reste inexpliqué mais pourrait avoir un impact majeur sur la survie à long terme des patients comme ceux de notre étude, qui étaient tous en bonne santé sans support thérapeutique au moment de l'analyse (Corre *et al.*, 2010).

En conclusion, les réactivations à HHV-6 peuvent persister à distance de la greffe chez la moitié des patients allogreffés de SP sans avoir de conséquence clinique particulière. Les données de la reconstitution immune à distance de la greffe recueillies dans cette étude ne

permettent pas d'expliquer les mécanismes à l'origine de la persistance des réactivations à HHV-6 après greffe de SP.

## 4. Etude de l'interaction entre l'HHV-6B et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs)

### 4.1. Introduction

Un travail réalisé récemment au sein de notre équipe a montré que les greffons placentaires étaient caractérisés non seulement par un déficit quantitatif et qualitatif en cellules T et B mémoires mais également en pDCs (Chevallier *et al.*, 2013a). Ces déficits peuvent en partie expliquer l'incidence accrue d'infections après greffe de SP. Néanmoins, ceci n'explique pas le fait que la prévalence des infections à HHV-6 soit plus importante après ce type de greffe, (en comparaison des greffes de CSP) alors que l'incidence des infections à CMVH, un virus proche de HHV-6, est comparable. De plus, l'incidence des réactivations à EBV, qui appartient à la même famille virale est plus faible après ce type de greffe, comme nous l'avons montré dans la partie expérimentale n°1 (*Article 1 dans l'annexe 1,p194*). Une des hypothèses pourrait être l'absence de permissivité des pDCs pour le CMVH(Varani *et al.*, 2007)et l'EBV (Fiola *et al.*, 2010)alors que celle-ci existerait pour l'HHV-6(Takemoto *et al.*, 2009). Si cette hypothèse s'avérait juste, au vu des capacités d'immunomodulation de l'HHV-6 au sein de différents types cellulaires, et en particulier au niveau des cDCs, nous pourrions supposer que l'infection des pDCs par HHV-6 provoquerait des altérations phénotypiques et fonctionnelles de ces cellules. En raison de leur rôle primordial dans la mise en place de la réponse immunitaire antivirale, ceci constituerait un mécanisme d'évasion immune supplémentaire pour ce virus. Très peu de travaux rapportent des données sur l'interaction entre HHV-6 et pDCs, il nous a donc semblé intéressant d'investiguer ce sujet de recherche. Nous avons ainsi conduit des essais d'infections *in vitro* par HHV-6B de pDCs isolées à partir de sang périphérique de donneurs sains et de pDCs issues d'une lignée humaine dénommée GEN2.2. Cette lignée a été développée par l'équipe de l'EFS de Joël Plumas à Grenoble, à laquelle nous avons pu avoir accès au cours de ce travail de thèse. Après un rappel bibliographique sur l'ontogénie, les fonctions des pDCs et leur rôle dans la mise en place d'une réponse anti-virale, nous présenterons les résultats obtenus au cours de nos essais d'infections.

## 4.2. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) humaines : rappels bibliographiques

Les DCs représentent une population hétérogène de cellules ayant comme origine des précurseurs médullaires, spécialisées dans la capture, le transport, l'apprêtement et la présentation des antigènes aux lymphocytes T (Banchereau & Steinman, 1998). Elles sont réparties dans tout l'organisme, certaines d'entre elles sont dotées de capacité de migration, et de ce fait peuvent se déplacer du site de capture des antigènes vers les sites d'interactions cellulaires. Les DCs constituent un lien entre l'immunité innée et l'immunité spécifique adaptative. Deux grands sous-types sont individualisés, qui diffèrent par leur localisation anatomique, leur phénotype et leur fonction : les DC plasmacytoïdes (pDCs) et les DCs conventionnelles (cDCs) ou DCs d'origine myéloïde, qui par définition regroupent tous les types de DCs autres que les pDCs (Gilliet *et al.*, 2008; Reizis *et al.*, 2011).

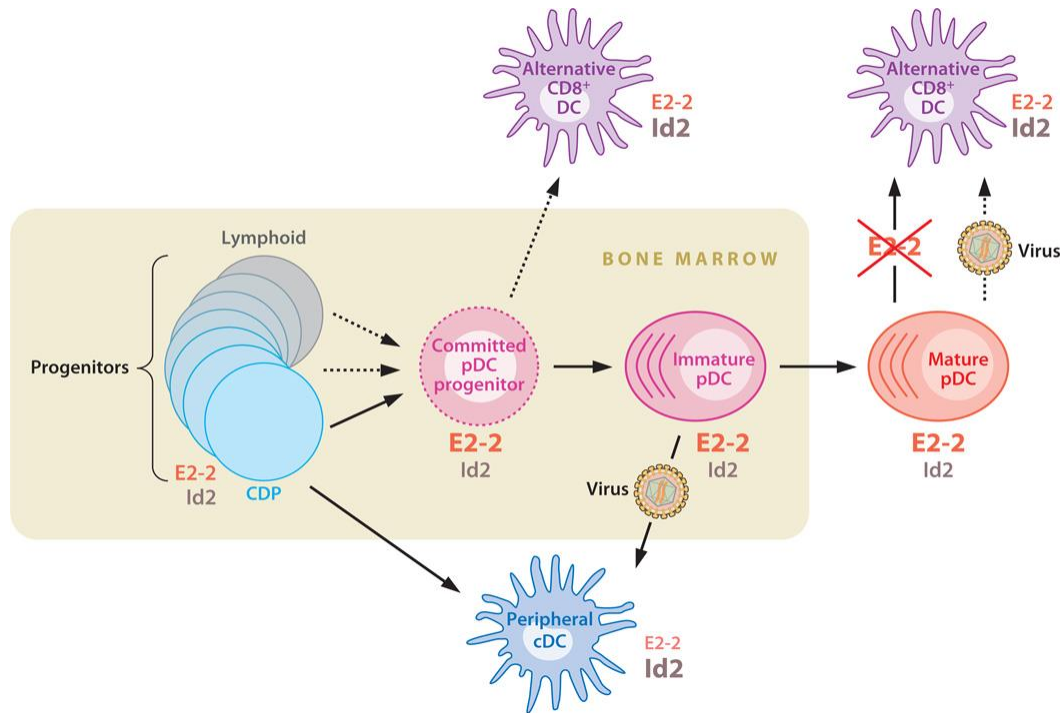
Les pDCs ont été formellement identifiées en 1999 (Cella *et al.*, 1999; Siegal *et al.*, 1999) bien que reconnues dès 1958 par Lennert & Remmele. Elles ont changé de nom à plusieurs reprises et le terme plasmacytoïdes vient du fait qu'elles ressemblent morphologiquement à des plasmocytes. Ces cellules ont la capacité particulière de pouvoir sécréter de très grandes quantités d'IFN de type I en réponse à une infection virale et jouent un rôle majeur dans la réponse immunitaire antivirale. Les pDCs sont rares dans le sang périphérique et représentent moins de 1% des PBMCS périphériques (Liu, 2005).

### 4.2.1. Ontogénie

Les pDCs sont produites en continue à partir de la moelle osseuse et dérivent d'un progéniteur hématopoïétique commun (CPD, *common DC progenitor*) aux deux types de DCs. Ce progéniteur exprime les récepteurs aux cytokines Flt-3 (*fms-like kinase 3* ou CD135), M-CSFR (*monocyte-colony stimulating factor receptor* ou CD115) et à faible niveau le c-Kit (*récepteur du stem cell factor* ou CD117). L'interaction du ligand de Flt-3 (Flt-3L) avec son récepteur joue un rôle essentiel dans le développement des pDCs en activant, en particulier, la voie de signalisation PI3K/mTOR (*phosphoinositide 3-kinase/mammalian target of rapamycin*). L'administration de Flt-3L à des volontaires sains humains entraîne une augmentation significative du nombre de pDCs dans le sang périphérique (Pulendran *et al.*, 2000). A l'inverse, l'inactivation de Flt-3, chez la souris, entraîne une diminution importante du taux de pDCs. Les cDCs sont aussi dépendantes du Flt-3 ligand mais à un moindre niveau (Waskow *et al.*, 2008). *In vitro*, le Flt-3L est responsable d'une expansion du

progéniteur commun aux DCs mais une fois les pDCs engagées dans leur différenciation, celles-ci ne prolifèrent plus ou presque pas (Naik *et al.*, 2007), ce qui explique en partie que l'on ne puisse pas expandre les pDC *in vitro* via le Flt-3L. Une autre protéine joue un rôle essentiel dans le développement des pDCs. Il s'agit de la protéine E2-2 (*basic helix-loop-helix transcription factor 2-2*). En effet, il a été montré que l'absence de cette protéine dans les progéniteurs hématopoïétiques est responsable d'une absence complète de pDCs chez l'animal (Cisse *et al.*, 2008). La surexpression de la protéine E2-2 entraîne une différenciation accrue en pDCs des progéniteurs hématopoïétiques. La protéine E2-2 possède un inhibiteur spécifique : la protéine Id2. Les progéniteurs hématopoïétiques ainsi que les lymphocytes B expriment une grande quantité de protéine E2-2 alors que les cellules T, NK et les cellules myéloïdes expriment une grande quantité de l'inhibiteur Id2. Les pDCs sont riches en protéine E2-2 et pauvre en protéine Id2. L'absence de protéine E2-2 dans les pDCs entraîne leur différenciation en cDCs, ce qui témoigne de leur plasticité éventuelle et de l'origine commune de ces deux types de DCs(Reizis *et al.*, 2011) (Figure 24).

Après leur développement dans la moelle, les pré-pDCs qui expriment très fortement le CD123 (récepteur à l'IL-3) passent dans le sang périphérique et sous l'action de l'IL-3 se différencient en pDCs immatures puis migrent dans les organes lymphoïdes (rate, ganglions, tissu lymphoïde associé aux muqueuses). Les pDCs migrent préférentiellement dans les zones riches en lymphocytes T, pour une durée de vie estimée longue (environ deux semaines). Cette migration est associée à l'expression de deux chimiokines principales : CD62L et à CCR7(Liu, 2005).



**Figure 24. Développement des pDCs à partir du précurseur hématopoïétique commun aux pDCs et au cDCs (d'après Reizis *et al.*, 2011).**

#### 4.2.2. Caractéristiques phénotypiques des pDCs

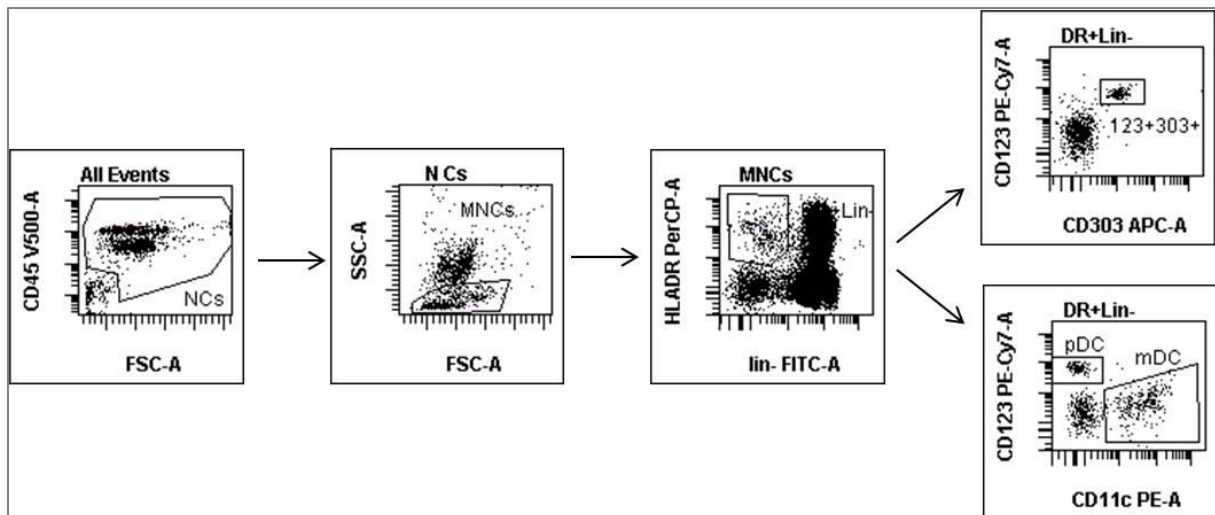
Les pDCs sont définies sur le plan phénotypique par l'expression du CD45 (molécule exprimée à la surface de tous les leucocytes), de la molécule HLA-DR (molécule du HLA de classe II), par l'absence d'expression des marqueurs des lignées T (CD3), B (CD19), NK (CD16, CD56) et myéloïdes (CD14, CD13, CD33) et des marqueurs spécifiques des cDCs, les molécules CD11c, CD11b et CD103. De plus, le phénotype des pDCs se caractérise par la présence à un haut niveau d'expression du CD123 (récepteur à l'IL-3), et par l'expression de molécules spécifiques au pDCs, les molécules du BDCA-2 (*blood dendritic cell antigen-2* ou CD303) et BDCA-4/neurophiline-1 (Barchet *et al.*, 2005; Liu, 2005) (Tableau 15 et Figure 25).



**Tableau 15. Marqueurs spécifiques permettant la distinction entre pDCs et cDCs chez l'homme**

	pDCs humaines	cDCs humaines
Marqueurs distincts	<b>CD11c-</b> CD11b+ CD45RA+ ILT1- CD1a-	<b>CD11c +</b> CD11b+ CD45RO+ ILT1+ CD1a+
Marqueur de définition	<b>CD123 ++ (IL3-R)</b>	<b>CD123 faible</b>
Marqueurs spécifiques	<b>BDCA-2</b> BDCA-4 (neuropilin-1)	DEC-205 <b>DC-SIGN</b>

Abréviations : CD, cluster de différenciation; ILT, immunoglobuline-like transcript; BCDA, blood dendritic cell antigen

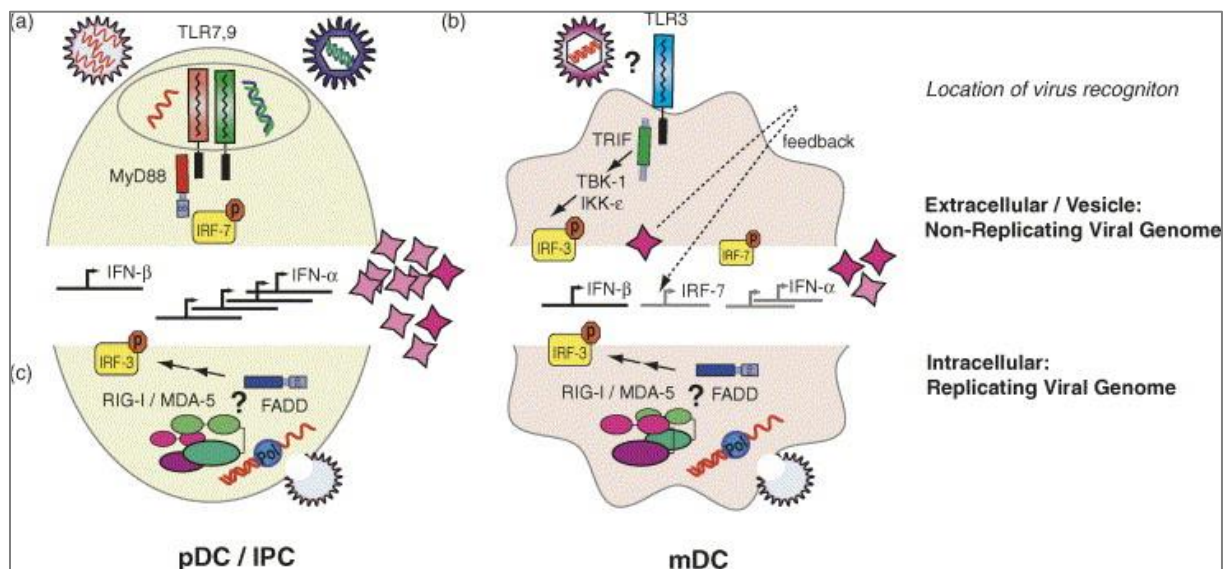


**Figure 25. Phénotype des pDCs humaines.** (Lin : CD3, CD16, CD19, CD20, CD14, CD56)

#### 4.2.3. Fonctions des pDCs dans l'organisme (Figures 28 et 29)

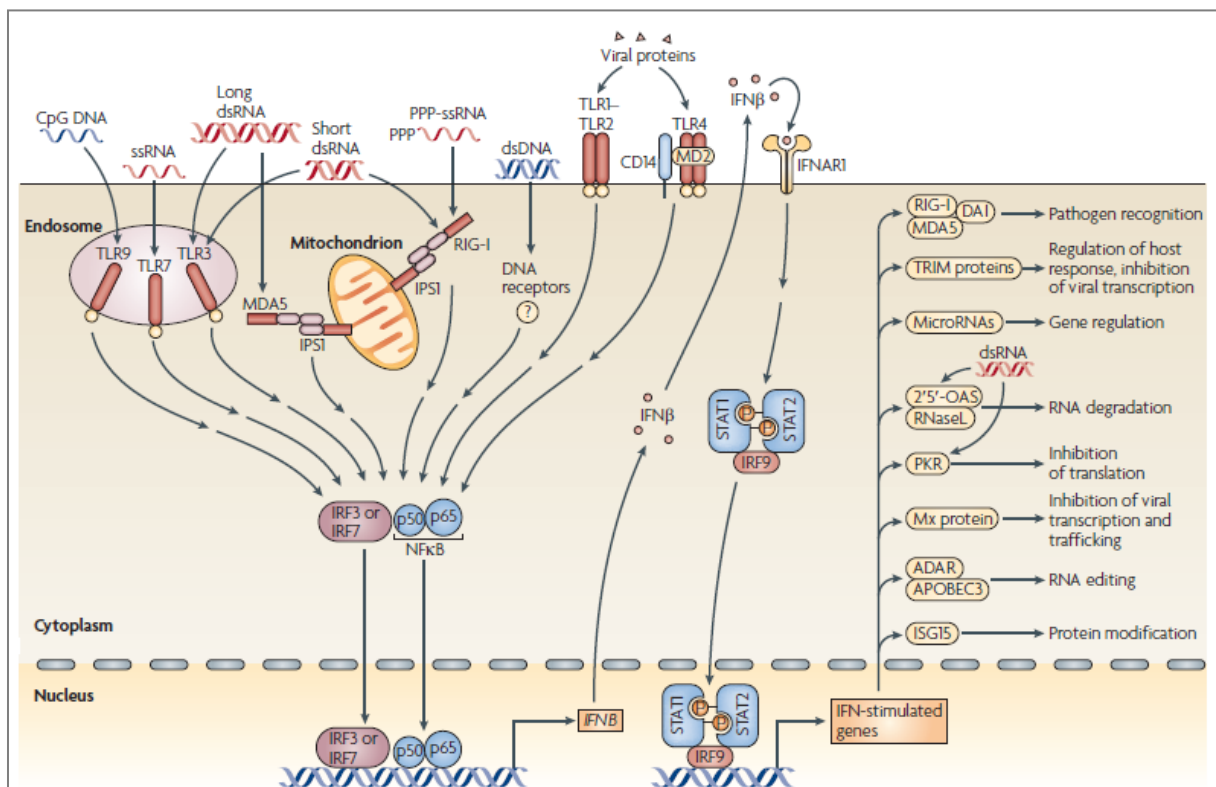
Les pDCs jouent un rôle primordial dans la réponse immunitaire antivirale notamment via leur capacité particulière à produire en grande quantité des IFNs de type I ( $\alpha$  et  $\beta$ ). Elles ont un rôle pivot entre immunité innée antivirale et immunité antivirale adaptative. La synthèse d'IFNs de type I par les pDCs dépend de la reconnaissance par ces dernières de motifs moléculaire associés au pathogènes, les PAMPs (*pathogen associated molecular pattern*) qui sont des protéines, des sucres ou des acides nucléiques conservés chez les bactéries, les virus et les champignons. Cette reconnaissance passe par une liaison de ces PAMPs à des récepteurs et en particulier aux TLR (*toll-like récepteurs*). Les TLR sont au nombre de 10

(TLR-1 à TLR-10) chez l'homme et se situent soit au niveau de la membrane cellulaire soit au niveau intracellulaire (compartiment endosomal). A la différence des cDCs, les pDCs n'expriment pas les TLR-2, TLR-4, TLR-5 et TLR-3 et de ce fait ne reconnaissent pas les composants bactériens comme le peptidoglycane, le lipopolysaccharide (LPS), la flagelline ou l'ARN double brin extracellulaire. Les pDCs sont spécialisées dans la reconnaissance de PAMPs viraux et n'expriment que deux TLR, les TLR-7 et TLR-9, impliqués dans la reconnaissance des ADN et ARN viraux. Le TLR-7 reconnaît l'ARN viral simple brin et le TLR-9 reconnaît les séquences riches en CpG non méthylé présentes dans les génomes des virus à ADN. La liaison des TLR-7 et TLR-9, localisés au niveau intracellulaire (compartiment endosomal), à leur ligand viral entraîne le recrutement de MyD88 (*myeloid differentiation primary-response gene 88*). Cette protéine dite adaptatrice permet de propager un signal intracellulaire via le « domaine de mort » (ou *death domaine*) et induit la production d'IRF-7 (*interferon-regulatory factor 7*), qui entraîne elle-même la production importante d'IFNs de type 1 par les pDCs immatures (200 à 1000 fois plus que les autres types cellulaires) dans les 24 heures qui suivent l'interaction virus/pDCs (Gilliet *et al.*, 2008). Cette capacité à produire des quantités importantes d'IFNs semble être liée à l'expression constitutive par les pDCs, d'IRF-7 qui faciliterait la surexpression d'IRF-7 en cas de stimulation, et par conséquent la production d'IFNs de type I (Barchet *et al.*, 2005; Liu, 2005) (Figure 26).



**Figure 26. Reconnaitre et sécréter d'IFN de type I après reconnaissance des motifs viraux par les pDCs et les mDCs (d'après Barchet *et al.*, 2005)**

Les pDC représentent la source majeure d'IFN de type I dans l'organisme, molécule largement décrite comme indispensable à la mise en place d'un état antiviral via l'induction de l'expression de nombreux gènes (ISG = *IFN-stimulated gene*) suite à la liaison à son récepteur (IFN-R). Cela conduit à la synthèse de molécules à activité antivirale comme la 2-5-oligoadénylate synthétase (OAS) et la ribonucléase L (RNaseL), la protéine kinase dépendante de l'ARN double brin (PKR) ou bien encore la protéine Mx (Bowie & Unterholzner, 2008; Pichlmair & Reis e Sousa, 2007) (Figure 27).



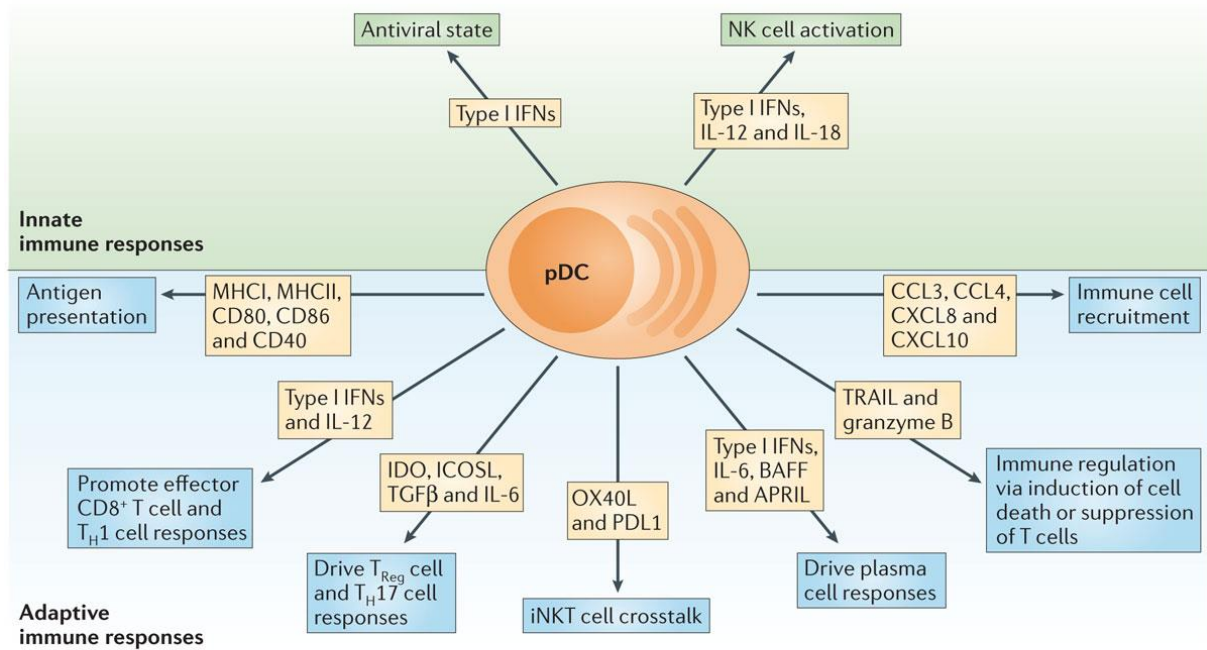
**Figure 27. Activation de la réponse IFN suite à la reconnaissance des PAMPs viraux (d'après Bowie & Unterholzner, 2008)**

Les IFNs de type I sont de puissants régulateurs des réponses immunitaires adaptative et innée. La sécrétion des IFNs de type I produite par les pDCs va ainsi activer les cellules NK, renforcer leur activité cytotoxique et induire la différenciation des lymphocytes T provoquant notamment la mise en place d'une réponse de type Th1 et l'activation des lymphocytes T cytotoxiques CD8+. Les pDCs vont également sécréter des cytokines telles que l'IL-12 et l'IL-6, qui vont coopérer avec les IFNs de type I pour réguler la réponse immunitaire. Via la sécrétion des IFNs de type I et d'IL-12, les pDCs vont induire la sécrétion d'IFN-γ par les cellules NK,

les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et les lymphocytes T auxiliaires CD4<sup>+</sup> se qui va favoriser la clairance des pathogènes intracellulaires. Via la sécrétion concomitante d'IL-6 et des IFNs de type I, les pDCs vont de plus, promouvoir la différenciation des lymphocytes B mémoires en plasmocytes qui vont alors produire des anticorps anti-viraux. Enfin, les pDCs sont des producteurs importants de chimiokines pro-inflammatoires, en particulier de CCL3, qui vont induire le recrutement des leucocytes au site de l'inflammation (Barchet *et al.*, 2005; Swiecki & Colonna, 2015) (Figure 28).

La sécrétion d'IFN de type I par les pDCs dure 24 heures après la détection initiale de PAMPs puis va se réduire. Les pDCs vont alors devenir réfractaires à une seconde stimulation virale et aller activer les effecteurs de l'immunité adaptative. Les pDCs activées via une interaction avec un ligand des TLR ou le CD40 ligand (CD40L) vont s'engager dans une voie de maturation conduisant à leur différenciation en CPA professionnelles. Leur activation va induire une augmentation de l'expression des molécules du CMH de classe I et II et des molécules de co-stimulation CD80, CD86 et CD40 à leur surface et l'acquisition d'une morphologie de cDC. Cependant, les pDCs sont des CPA moins efficaces que les cDCs du fait d'une moins bonne capacité de phagocytose, d'apprêtement et de chargement des antigènes sur les molécules du CMH et d'une expression plus faible de molécules de CMH de classes II que les cDCs (Reizis *et al.*, 2011; Swiecki & Colonna, 2015).

La réponse lymphocytaire T CD4<sup>+</sup> *in vitro* peut être de type Th1 (production d'IFN- $\gamma$  et d'IL-10), en particulier après stimulation virale ou Th2 (production d'IL-4, IL-5 et IL-10), après stimulation par l'IL-3 et le CD40L (Kadowaki *et al.*, 2000) (Figure 29). Les pDCs pourraient également être à l'origine de la génération de cellules T régulatrices (Treg), via leur sécrétion d'IL-10, et pourraient donc avoir un rôle dans le phénomène de tolérance ou l'activité immunosuppressive des Tregs. Ce phénomène pourrait expliquer, qu'en cas de dérèglement, les pDCs puissent être impliquées dans la survenue de maladies auto-immunes (Liu, 2005; Reizis *et al.*, 2011; Swiecki & Colonna, 2015) (Figure 28).



Nature Reviews | Immunology

**Figure 28. Fonctions des pDCs (d'après Swiecki & Collona, 2015)**

#### 4.2.4. pDCs et infections virales *in vivo*

Comme nous l'avons vu les pDCs jouent un rôle majeur dans la réponse immunitaire antivirale notamment via leur capacité naturelle à produire de l'IFN de type I lorsqu'elles reconnaissent les motifs viraux. Cependant ce rôle semble varier en fonction des virus, du stade de l'infection, du site de la réplication virale et du fond génétique de l'hôte (Swiecki & Colonna, 2015).

Ainsi, il a été montré, dans des modèles murins, que la sécrétion d'IFNs de type I par les pDCs jouait un rôle important au début d'une infection systémique par le cytomégalo virus murin (MCMV), le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV), le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) et l'HSV-1 et permettait de contenir la réplication virale. Les IFNs de type I produits par les pDCs deviendraient moins importants au stade tardif de l'infection, la sécrétion d'IFNs de type I étant à ce stade assurée par d'autres types cellulaires. L'impact des pDCs semble aussi dépendre du site de réplication du virus dans l'organisme. Les pDCs constituent une importante source d'IFN de type I au cours des infections systémiques. Lorsque le virus se retrouve dans la circulation sanguine, alors qu'au cours des infections localisées une production d'IFNs de type I par les pDCs semble être nécessaire uniquement

lorsque les autres lignes de défense font défaut. Par exemple, toujours dans des modèles murins, il a été montré qu'au cours d'une infection pulmonaire par le virus de la maladie de Newcastle (NVD), les macrophages alvéolaires sont la première source d'IFN de type I. Tandis que chez des animaux déplétés pour ce type cellulaires, les pDCs prennent le relai et deviennent la source majoritaire d'IFNs de type I. D'autre part, la sécrétion d'IFNs de type I par les pDCs ne semble pas jouer un rôle majeur dans le contrôle d'une infection génitale à HSV-2 chez la souris, en ne réduisant significativement pas la morbidité et la mortalité chez les animaux non déplétés (Swiecki *et al.*, 2013). Par ailleurs, une étude récente a montré que des individus ayant présenté des infections particulièrement sévères à virus *influenzae* étaient porteurs d'une mutation inactivant IRF-7 et présentaient un déficit sévère en pDCs (Ciancanelli *et al.*, 2015). Paradoxalement, une réponse des pDCs au cours d'une infection aiguë peut avoir des effets délétères. En effet, une étude a mis en évidence qu'une production excessive d'IFNs de type I, probablement par les pDCs, au cours d'une infection à virus *influenzae* chez des souris, pouvait induire une inflammation incontrôlée et l'apoptose de cellules épithéliales bronchiques (Davidson *et al.*, 2014).

Au cours des infections chroniques, et notamment dans le contexte des infections à VIH qui a été largement étudiée, les pDCs semblent avoir un rôle ambivalent en passant d'un rôle protecteur permettant le contrôle de la réplication, à un rôle favorisant le recrutement de cibles cellulaires pour le VIH et ainsi la dissémination virale (Reizis *et al.*, 2011; Swiecki & Colonna, 2010).

#### **4.2.5. Interactions pDCs et herpesvirus in vitro**

Comme nous l'avons déjà évoqué, les interactions entre pDCs et herpesvirus n'ont été que très peu étudiées. Les résultats des différents travaux présentés ci-dessous ont tous été réalisés à partir de pDCs humaines isolées de sang périphérique de donneurs sains.

L'équipe de Fiola *et al.* (2010) s'est intéressée à l'interaction entre EBV et pDCs. Ils ont montré en utilisant une souche d'EBV-GFP (*green fluorescent protein*), que les pDCs ne semblent pas permissives à l'infection par cet herpesvirus. Ils ont mis en évidence que les pDCs au contact de l'EBV (EBV-GFP et suspension de particules virales) produisaient de l'IFN- $\alpha$ , de l'IL-6 et de l'IL-8. En utilisant des antagonistes des TLR-7 et 9, ils ont montré que la sécrétion d'IFN- $\alpha$  par les pDCs est médiée de façon prédominante par la reconnaissance du génome de l'EBV par le TLR-9 et à un moindre niveau par le TLR-7. Tandis que la production d'IL-6 et d'IL-8 semble principalement être médiée par le TLR-9 mais pas par le

TLR-7 (aucun effet de l'inhibiteur du TLR-7 sur la production de ces cytokines). Par ailleurs, ils ont montré que l'infection par EBV induit une maturation des pDCs (augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation CD86 et CD40) qui était quant à elle indépendante d'une liaison préalable au TLR-9 et/ ou au TLR-7.

L'équipe de West *et al.* (2011) a étudié l'interaction entre pDCs et un autre  $\gamma$ -herpesvirinae, l'HHV-8. Ils ont conclu que l'HHV-8 était capable d'infecter les pDCs de manière productive (détection en microscopie confocale d'une souche HHV-8 GFP et détection d'ARNm précoces et tardifs). De plus, ils ont mis en évidence une augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation CD83 et CD86 et une sécrétion d'IFN- $\alpha$  médiée par le TLR-9 dépendante d'une réplication virale (pas d'effet en utilisant une souche d'HHV-8 inactivée par les UV). Cependant, les résultats variaient en fonction des donneurs (4 donneurs testés), aussi bien pour l'expression du CD83 et du CD86 que pour la sécrétion d'IFN- $\alpha$  (West *et al.*, 2011).

Une étude publiée par Huch *et al.* (2010) sur l'interaction pDCs et VZV a rapporté la détection d'antigènes du VZV synthétisés aux 3 stades du cycle répliatif en faveur d'une infection permissive des pDCs par le VZV. Ils ont, par ailleurs, mis en évidence l'absence de sécrétion d'IFN- $\alpha$  en réponse à l'infection et une diminution de cette sécrétion par des pDCs non infectées mise en contact avec le surnageant des pDCs infectées. Cela suggère un rôle inhibiteur du VZV sur la sécrétion d'IFN- $\alpha$  (Huch *et al.*, 2010).

Varani *et al.* (2007) ont montré l'absence de permissivité des pDCs à une infections par le CMVH et que cette infection induisait une maturation partielle des pDCs : augmentation de l'expression des molécules de CMH de classe II et du CD83 mais absence d'expression des molécules CD80 et CD86. Ils ont également mis en évidence une augmentation de sécrétion d'IFN- $\alpha$ , de l'IL-6, de l'IL-8 et de CCL3 liée à l'engagement du TLR7 et/ou du TLR9 par les pDCs indépendante d'une réplication du CMVH (résultats similaires avec une souche inactivée par les UV).

Enfin, à notre connaissance seuls trois articles rapportent les conséquences d'une culture *in vitro* de pDCs avec le virus HHV-6. Le premier, publié par Takemoto *et al.* (2009), a montré que les pDCs exposées à l'HHV-6B transmettent efficacement par contact l'infection aux lymphocytes T CD4+, conduisant à une infection productive de ces derniers (Takemoto *et al.*, 2009). Ils ont de plus montré qu'une infection des lymphocytes TCD4+ par le surnageant des pDCs infectées induisait une infection productive de ces derniers. Cependant, aucun

marqueur de réplication virale (accumulation d'ADN, détection d'ARNm ou d'antigènes d'HHV-6B) n'a été recherché dans cette étude pour apporter la preuve formelle d'une permissivité des pDCs. Comme nous l'avons évoqué dans le 4.3.1 de nos rappels bibliographiques pour les cDCs, cette étude ne permet pas d'exclure la possibilité pour les pDCs d'agir en tant que « cheval de Troie », en adsorbant les particules d'HHV-6B transmises alors secondairement de manière passive aux cellules T CD4+ ou après relargage dans le surnageant.

Les deux autres études émanant d'une même équipe suédoise qui a travaillé avec des pDCs isolées à partir de sang placentaire et avec la souche HHV-6B Z29 inactivée ou non. Ils n'ont pas recherché de marqueurs de réplication virale car ils s'intéressaient dans ces travaux uniquement à l'impact d'un traitement préalable des pDCs par HHV-6B sur la polarisation Th1/Th2 des lymphocytes T CD4+. Ils ont néanmoins, montré que l'exposition à HHV-6B entraîne une sécrétion d'IFN- $\alpha$  et d'IFN- $\lambda$ 1 par les pDCs de sang placentaire via TLR-9. HHV-6 entraînerait aussi une réponse T de type Th1 tout en réduisant la réponse Th2 (Nordström *et al.*, 2010; Nordström & Eriksson, 2012)

Aucun des trois articles cités ci-dessus ne permet de conclure formellement sur la permissivité des pDCs à une infection par l'HHV-6. De plus, dans le travail de *Takemoto et al.* (2009), la pureté des tris de pDCs ne semble pas avoir été vérifiée ce qui ne permet pas d'exclure une contamination des pDCs par un ou plusieurs type(s) cellulaires. De plus, il est indiqué que les pDCs sont cultivées 5 jours sans apport, *a priori*, d'IL-3 alors qu'il est bien démontré que ces cellules meurent rapidement *in vitro* en l'absence de cette cytokine (Grouard *et al.*, 1997). Il nous a donc semblé intéressant de réaliser des cultures de pDCs humaines en présence d'HHV-6B afin d'une part de confirmer ou non la permissivité des pDCs au virus, et d'autre part d'étudier l'impact de l'infections par HHV-6B sur le phénotype et/ou les fonctions de ces cellules. Ces essais d'infections ont été conduits sur des pDCs isolées de sang périphérique de donneurs sains et sur les pDCs issues de la lignée GEN2.2.



### 4.3. Matériels et méthodes

#### *Cellules*

Les pDCs ont été triées à partir de PBMCSs de donneurs volontaires sains par sélection négative en utilisant le kit STEMCELL® « EasySep Human pDC Enrichment Kit » selon les recommandations du fabricant. Les PBMCSs sont isolés par Ficoll à partir de résidus leucoplaquettaires recueillis au cours de dons de plaquettes à l'EFS de Nantes. Après tri, la pureté des cellules recueillies est vérifiée par cytométrie en flux (voir paragraphe dédié ci-dessous). Les cellules sont ensuite maintenues en culture en plaque 96 puits à la concentration de  $1.10^6$  cellules/ml dans 100 à 200  $\mu$ l de milieu composé de RPMI 1640 (Dutscher) + 1% pénicilline/streptomycine (PS) (Pan Biotech) + 1% de L-Glutamine (L-Glu) (Dutscher) + 10% de SVF décomplémenté (Dutscher) + 20 ng/ml d'IL-3 (Sigma Aldrich) et incubées à 37°C sous CO<sub>2</sub> 5%.

Les pDCs issues de la lignée GEN2.2 développée par une équipe grenobloise à partir de cellules prélevées chez des patients atteints de leucémie à pDCs (Chaperot *et al.*, 2001, 2006) nous ont été fournies par l'EFS. Ces cellules sont cultivées en présence de MS-5 (DSMZ, réf ACC 441, cellules stromales murines utilisées comme feeders) irradiées (35 Grays) en flasque 25 cm<sup>2</sup> dans un milieu composé de RPMI + 10% SVF + 1% L-Glu + 1% PS et incubées à 37°C sous CO<sub>2</sub> 5%. Le protocole de culture est détaillé en annexe 2C.

#### *Infections de pDCs par la souche d'HHV-6B (HST)*

La souche HST utilisée a été produite au laboratoire sur lignée MT-4 (voir protocoles en annexes 2E et 2F). Pour ces expériences, nous avons réalisé préalablement aux infections, une ultracentrifugation (28000 tr/min, 2H, 4°C) sur les suspensions virales produites, afin d'augmenter la concentration en particules virales infectieuses. Une inactivation par exposition à des UV a également été réalisée. La perte du pouvoir infectieux a ensuite été vérifiée sur cellules MT4 (absence de marqueurs d'infection actives 3 semaines post-infection). Les stocks ont ensuite pour ces expériences été titrés par PCR.

Une souche de CMVH (VHL-E) a été utilisée à titre de contrôle au cours d'une infection sur la lignée GEN2.2.

Les pDCs (entre  $1.10^5$  et  $2.10^5$  cellules) ont été infectées par la souche HST à la dose de  $10^2$  EqGen/cellule ou  $10^3$  EqGen/cellule (*EqGen, équivalent génome*) puis incubées à 37°C

sous CO<sup>2</sup> dans le milieu adapté précédemment décrit. Après infection, les cellules sont récupérées à H24 et H72 de la culture pour les pDCs isolées à partir de PBMCs et à différents temps, de J2 à J21 pour les cellules de la lignée GEN2.2. Les cellules fraîchement recueillies sont réparties en 2 fractions : une dédiée à l'analyse parCMF effectuée le jour même et l'autre, réservée à la recherche des marqueurs d'infection virale.

#### *Recherche des marqueurs d'infection*

La détection de l'ADN et des ARNm U90 et U100 de l'HHV-6 est réalisée après extraction ADN ou ARN (*voir protocoles annexe 2A*) sur les culots cellulaires recueillis au différents temps post-infection par techniques de PCR et RT-PCR quantitatives en temps réel précédemment décrites et détaillées en annexe2B.

La détection des antigènes viraux est effectuée par IFI à l'aide de l'AcMo anti-p41 d'HHV-6 (HHV-6 p41 early antigen, clone 9A5D12, Santa Cruz Biotechnology, Inc.CA, USA) (*voir protocole détaillé en annexe 2D*).

#### *Analyses par cytométrie en flux.*

L'étude en CMF est réalisée au laboratoire d'Hématologie/Biologie du CHU de Nantes. A chaque point de suivi environ 1.10<sup>5</sup> pDCs cultivées dans différentes conditions (non infectées (mock) ou infectées) sont recueillies et reprises dans 50 µl de PBS pour les analyses en CMF. Les cellules sont alors incubées pendant 10 minutes à température ambiante dans le noir avec différents anticorps monoclonaux (AcMo) couplés à 6 fluorochromes différents selon les 4 combinaisons décrites dans le Tableau 16. L'ensemble des AcMo provenaient de BD (Beckton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA) à l'exception du contrôle IgG1-FITC provenant de Beckman-Coulter (Villepinte, France) et le CD303-APC (BDCA2) provenant de Myltenyi Biotec Inc (Auburn, CA, USA). Après incubation, les cellules sont lavées une fois avec une solution de PBS + 1% de SVF (Sigma, St-Louis, MO, USA) puis fixées dans une solution de PBS+0.5% de paraformaldéhyde (Sigma) et analysées directement avec l'appareil FACS CANTO II (Beckton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA). On enregistre au moins 2.10<sup>4</sup> évènements sur la fenêtre lymphocytaire puis les résultats sont stockés dans le logiciel BD FACSDiva V6.1.3 (BD Biosciences). Les analyses sont réalisées avec ce même logiciel.

La pureté du tri est vérifiée par analyse des cellules en CMF (tubes n°1 à 4, Tableau 16). Un échantillon de cellules avant tri est aussi récupéré pour la même analyse afin de vérifier l'efficacité des tris de pDCs. Puis les cellules sont analysées pour l'expression de marqueurs d'activation (CD80/86/83), de classe I et II du HLA, et le CD46 aux différents temps de culture *in vitro* (tubes n° 2 à 4, Tableau 16).

**Tableau 16. Combinaisons d'anticorps utilisées pour les analyses en CMF pour l'étude phénotypique des pDCs à H0 et aux différents temps post-infections.**

Fluorochromes	V500	APC	PeCy7	PerCP-Cy5.5	PE	FITC
Tube n°1	CD45 (H130)	BDCA-2 (AC144)	CD123 (7G3)	HLA-DR (G46.6)		Lin*
Tube n°2	CD45 (H130)	BDCA-2 (AC144)	CD123 (7G3)	HLA-DR (G46.6)	CD86 (2331/FUN-1)	CD80 (16-10A1)
Tube n°3	CD45 (H130)	BDCA-2 (AC144)	HLA ABC (G46-2.6)		CD83 (HB15e)	CD46 (E4.3)
Tube n°4	CD45 (H130)	BDCA-2 (AC144)	CD123 (7G3)		IgG1	IgG1

Abréviations : APC, allophycocyanine; PerCP, Peridin-chlorophyll-protein complex; Cy, Cyanine; PE, Phycoérythrine; FITC, isotiocyanate de fluorescéine

\*Lin : CD3 (SK7), CD16 (3G8), CD19 (SJ25C1), CD20 (L27), CD14 (MΦP9), CD56 (NCAM16.2)

Les références indiquées entre parenthèses précises les clones utilisés.

### Dosage de l'IFN- $\alpha$

L'étude de la sécrétion d'IFN- $\alpha$  par les pDCs en fonction des différentes conditions de culture est réalisée après avoir récupéré le surnageant cellulaire aux différents temps post-infection en utilisant le kit Human IFN-alpha ELISA commercialisé par R&D (ref : 4100-1) selon les recommandations du fabricant. La lecture est réalisée à l'aide d'un spectromètre (Molecular Devices) à une absorbance de 450 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de cytokines qui est mesurée grâce à une gamme étalon de concentration connue.

### Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide des tests non paramétriques (Kruskal-Wallis ou Mann-and-Whitney) à l'aide du logiciel GraphPad Prism (GraftPad Software). Une valeur de  $p < 0.05$  est considérée comme statistiquement significative.

#### 4.4. Résultats

Huit essais d'infections *in vitro* par HHV-6B de pDCs isolées des résidus leucoplaquettaires ont été réalisés.

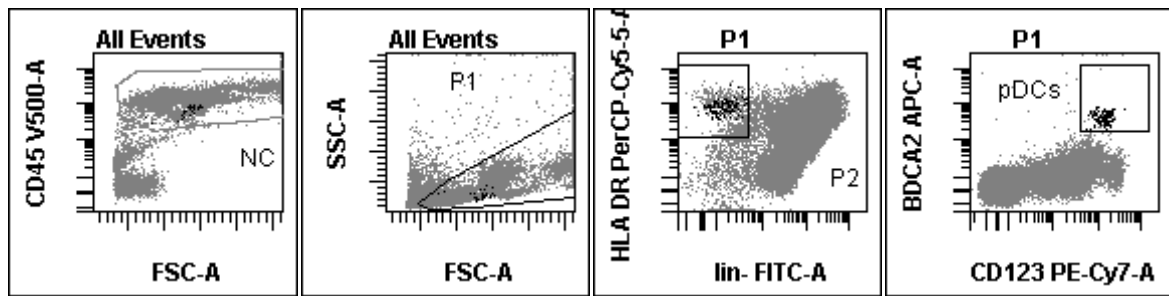
*Vérification de la pureté des pDCs après tris.*

La pureté médiane des pDCs triées étaient de 95% pour 7 d'entre eux (Tableaux 17). Un tri n'a pas été satisfaisant avec une pureté des cellules recueillies de seulement 46,20% (expérience n°8) et n'a pas été considéré pour les analyses de CMF à H24 et H72. Les proportions de pDCs par rapport aux PBMCs varient entre 0,10% et 0,87% en fonction du donneur, avec une valeur médiane de 0,21%, ce qui est concordant avec les données de la littérature. La comparaison des immunophénotypes réalisés sur les PBMCs avant et après tri a montré un rendement médian de 92,3% (n=4) (Figure 30). Les quantités de pDCs recueillies après tri varient là encore en fonction du donneur entre  $7,9 \cdot 10^5$  et  $4,8 \cdot 10^6$  cellules.

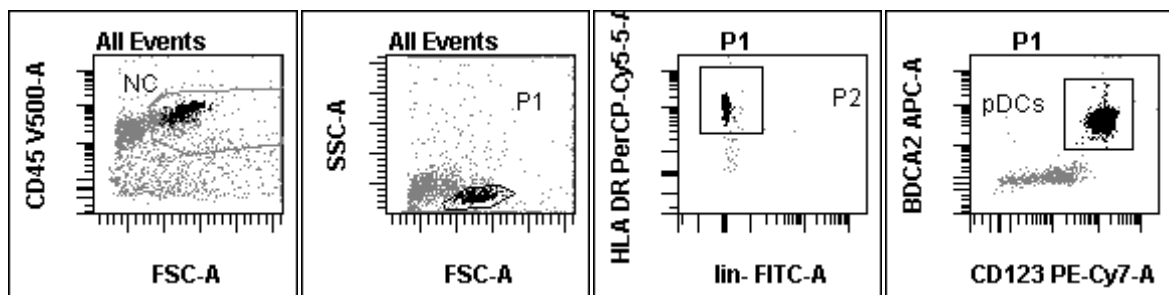
**Tableau 17. Rendements et pureté des pDCs recueillies après tris.**

Expérience	Nombre de PBMCs après Ficoll	Nombre de cellules recueillies après tri	% pDCs triées/PBMCs avant pureté	CMF		% pDCs calculé/PBMCs	Rendement du tri
				Pureté	% pDC PBMCs		
Expérience n°1	$4,8 \cdot 10^8$	$2,16 \cdot 10^6$	0,45%	95,00%	NA	0,43%	NA
Expérience n°2	$5,31 \cdot 10^8$	$4,76 \cdot 10^6$	0,90%	96,80%	NA	0,87%	NA
Expérience n°3	$7,38 \cdot 10^8$	$7,9 \cdot 10^5$	0,11%	97,00%	NA	0,10%	NA
Expérience n°4	$6,75 \cdot 10^8$	$1,35 \cdot 10^6$	0,20%	92,60%	0,2	0,19%	92,3%
Expérience n°5	$9,0 \cdot 10^8$	$2,34 \cdot 10^6$	0,26%	93,80%	0,3	0,24%	92,3%
Expérience n°6	$7,5 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^6$	0,21%	96,40%	0,2	0,21%	97,9%
Expérience n°7	$7,8 \cdot 10^8$	$1,04 \cdot 10^6$	0,13%	91,80%	0,2	0,12%	92,3%
Expérience n°8	$2,0 \cdot 10^9$	$2,13 \cdot 10^6$	0,11%	46,20%	0,2	0,05%	45,5%

**Avant tri:** les pDCs représentent ici 0,2% des PBMCS



**Après tri:** à partir, des  $6,75 \cdot 10^8$  PBMCS recueillis après Ficoll, nous avons trié  $1,35 \cdot 10^6$  cellules dont la pureté est estimée à 92,6%. Le pourcentage calculé de pDCs est de 0.19% des PBMCSs (rendement du tri = 92,3%).



**Figure 29.** Exemple d'analyses réalisées en CMF pour caractériser les pDCs avant et après tri (Expérience n°4).

#### *Infections des pDCs par la souche d'HHV-6B HST*

Huit essais d'infections ont été réalisés sur les pDCs isolées de sang périphérique. Du fait d'un nombre parfois limité de cellules recueillies après tris, l'ensemble des conditions n'a pas pu être testé lors de chaque expérience : témoin (n=8), HHV-6 à la concentration de  $10^2$  EqGen/cellule (n=4), HHV-6 à la concentration de  $10^3$  EqGen/cellule (n=7) et HHV-6 inactivé par les UV (n=4).

En microscopie nous avons observé des modifications morphologiques des pDCs avec une augmentation de la taille et de la réfringence des cellules, se regroupant pour former des agrégats. Une estimation de la mortalité par une coloration au bleu de trypan a permis de montrer que 100% des cellules étaient encore vivantes à H24 et que 80 à 90% des cellules l'étaient encore à H72. Après ce délai, les cellules meurent rapidement avec une mortalité de >80% à H96. Aucune différence n'était observée lorsqu'on comparait les cellules infectées aux cellules non infectées.

Quatre essais d'infections par HHV-6B (et une avec une souche de CMVH) ont été réalisés sur la lignée GEN2.2 maintenue 3 semaines en culture après l'infection. Aucune modification morphologique ou de différence de mortalité n'a été observée pour les cellules infectées comparativement à la condition témoin.

#### *Expression des molécules de surfaces en fonction des conditions de culture*

Nous avons mesuré dans cette étude par CMF, le niveau d'expression des molécules HLA de classe I (A, B, Cw) et de classe II (DRB1), des molécules de co-stimulation CD80, CD86 et CD83 et du récepteur connu pour HHV-6 le CD46. Il faut noter que ces expériences ont été conduites avant la publication de Tang *et al.* (2013) qui a démontré que le récepteur de l'HHV-6B (souche HST) était la molécule CD134 et non le CD46.

- *Résultats pour les pDCs isolées de PBMCS*

Les molécules CD80 et le CD83 ne sont pas exprimées par les pDCs non stimulées, le CD86 est exprimé spontanément (médiane= 20%) (H0). Nous avons donc considéré les variations de pourcentage d'expression pour ces trois marqueurs en fonction des conditions de culture à H24 et H72.

Au temps 24h post-infection, l'expression des molécules CD80, CD86, et CD83 à la surface des pDCs est fortement augmentée par rapport à H0 quelles que soient les conditions de culture (mock,  $10^2$  EqGen/cellule,  $10^3$  EqGen/cellule ou souche inactivée). Les proportions de cellules positives pour ces marqueurs varient cependant en fonction des expériences : le pourcentage de cellules positives pour le CD80 varie entre 19,6% et 79,1%, celui du CD86 entre 48,3% à 73,1% et celui du CD83 entre 0 et 29,7%. Aucune différence significative n'a été mise en évidence en fonction de l'inoculum viral ou entre souche virale intacte et UV inactivée (Figure 30). A H72, les proportions de cellules positives pour les molécules CD80 et CD86 ne varient pas par rapport au H24 (entre 40% et 76,6% et entre 29,4% et 77,9% ; respectivement) quelles que soient les conditions testées. L'expression du CD83 est, quant à elle, diminuée dans toutes les conditions (figure 30).

Concernant l'étude des marqueurs CD46 et des molécules HLA de classe I et II, les trois marqueurs étant exprimés par 100% des pDCs, nous avons considéré les variations de MFI en fonction des conditions de culture à H24 et H72 post-infection (Figure 31). L'expression du CD46 augmente au cours du temps de manière significative dans toutes les conditions

testées. L'expression des molécules HLA de classe I augmente significativement entre H0 et H24 dans toutes les conditions et tend à diminuer entre H24 et H72 sans que cette diminution soit statistiquement significative. L'expression des molécules HLA de classe II augmente significativement entre H0 et H24 et ne varie pas entre H24 et H72 dans toutes les conditions. Aucune différence pour l'expression de ces trois marqueurs n'a été mise en évidence en fonctions de la présence ou non d'HHV-6B.

- *Résultats pour la lignée GEN2.2*

Les pDCs provenant de la lignée ont les mêmes caractéristiques phénotypiques que des pDCs issues de sang périphérique, à l'exception des marqueurs CD56 et CD86. En effet, ces cellules expriment partiellement le CD56 (environ 50%) qui n'est pas exprimées par des pDCs normales et expriment de manière constitutive la molécule de co-stimulation CD86 (100%). Un exemple de phénotype obtenu par analyse en CMF est présenté Figure 32. Ainsi, pour ce marqueur le niveau d'expression a été évalué sur la MFI et non par le pourcentage. Les analyses en CMF ont été réalisées à différents temps post-infection au cours de 3 cinétiques d'infections par la souche HST. Les résultats de ces analyses n'ont pas permis de mettre en évidence de modification de l'expression entre la condition témoin et les cellules infectées pour les molécules HLA de classe I et II et CD86 qui sont exprimées par 100% des cellules dans toutes les conditions testées sans variation de MFI. Les molécules CD80 et CD83 n'étaient pas exprimées même en présence de virus à aucun des temps post-infection. Ces expériences n'ont donc pas mis en évidence de stimulation des pDCs GEN2.2 par HHV-6 (une cinétique d'infection réalisée à titre de contrôle avec une souche VHL-E de CMVHa donné les mêmes résultats).

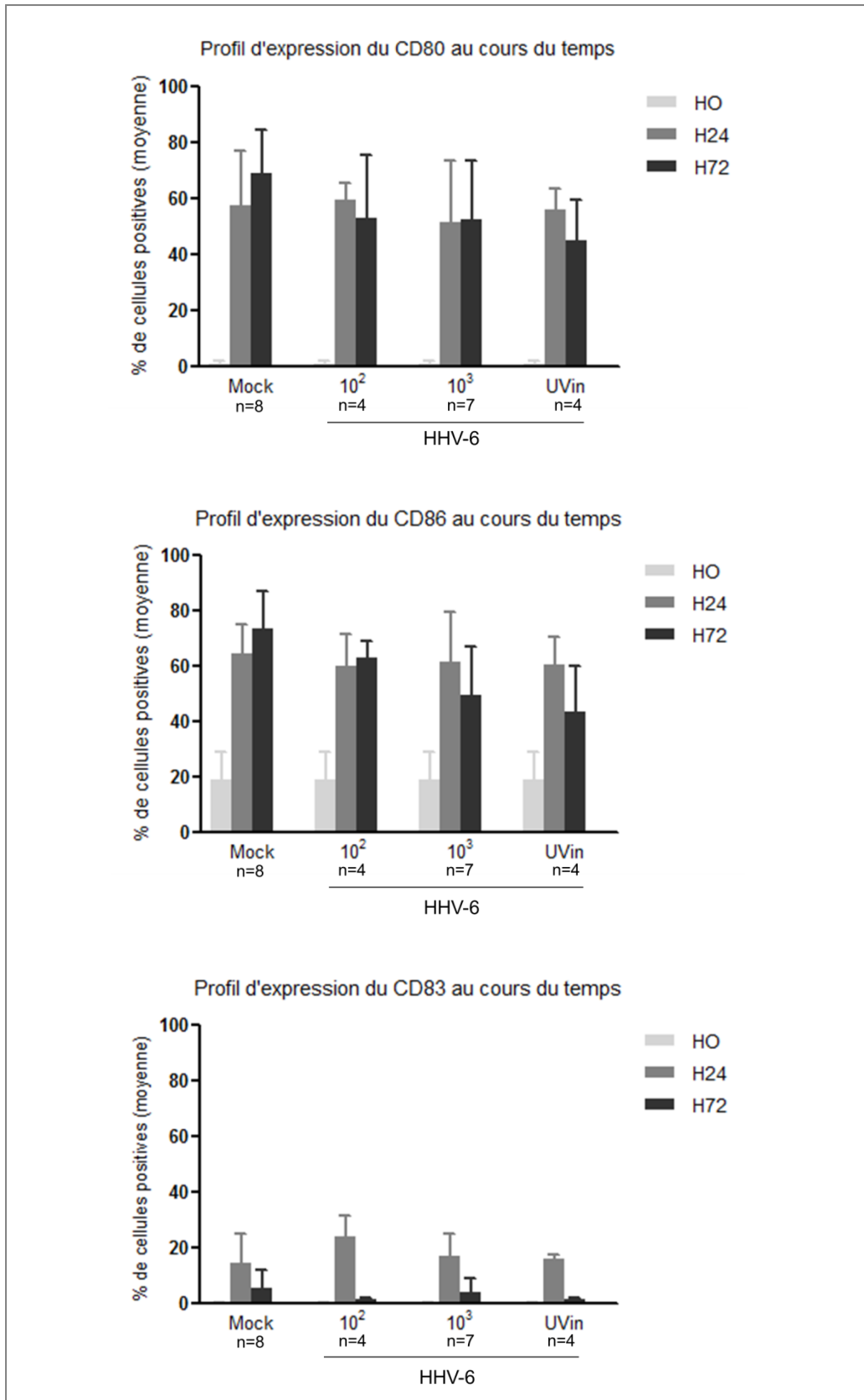
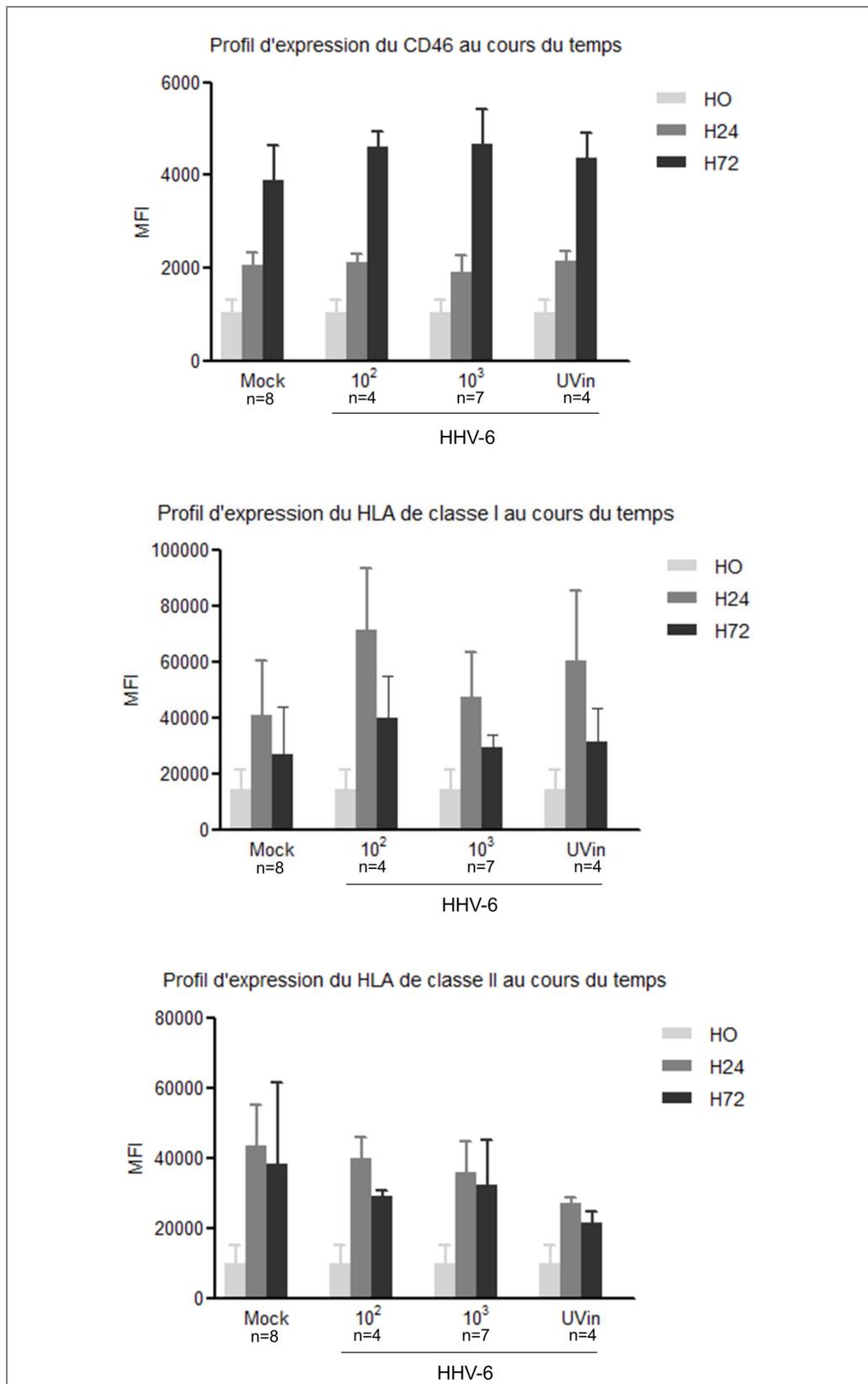


Figure 30. Niveaux d'expression (% moyen) du CD80, du CD86 et du CD83 à la surface des pDCs à H0, H24 et H72 post-infection en fonction des différentes conditions de culture.





**Figure 31. Profils d'expression (MFI moyenne) du CD46 et des molécules de HLA de classe I et de classe II à la surface des pDCs à H0, H24 et H72 post-infection en fonction des différentes conditions de culture. Abréviations : MFI, moyenne de fluorescence.**

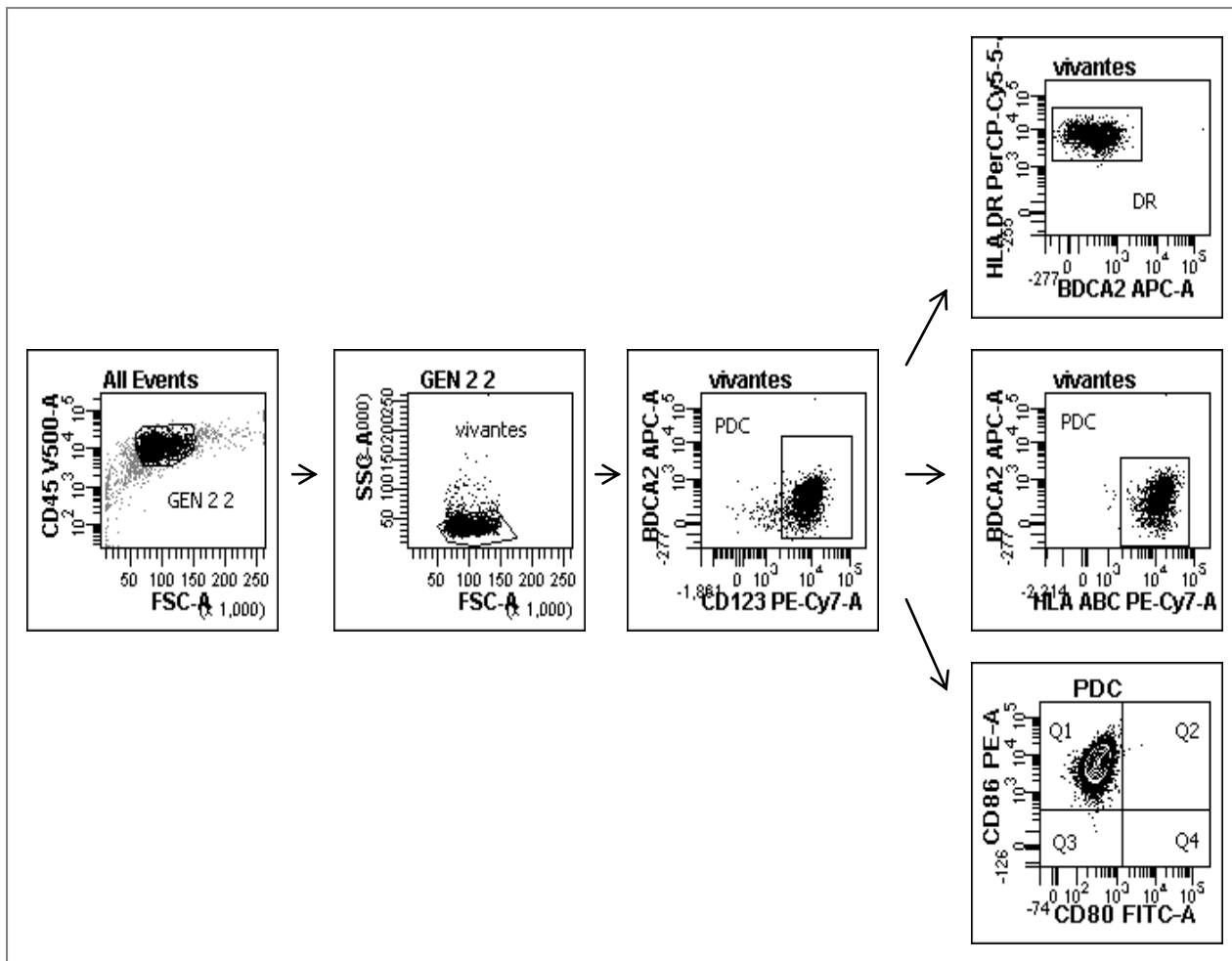


Figure 32. Phénotype des pDCs issues de la lignée GEN2.2

Détection de l'ADN et des ARNm U90 et U100 de HHV-6B

▪ Résultats pour les pDCs isolées de PBMCs

En raison du nombre limité de cellules recueillies après tris des pDCs à partir des résidus leuco-plaquettaires, les PCR et RT-PCR HHV-6 n'ont pas pu être réalisées simultanément pour chacune des expériences. Le génome d'HHV-6 a été détecté en quantité importante à H24 et H72 post-infections sans augmentation de charge virale entre les 2 points de cinétique : moyenne, 650 copies/cellule et 745 copies/cellule ; respectivement (n=3) (infections avec la concentration  $10^3$ EqGen/pDCs).

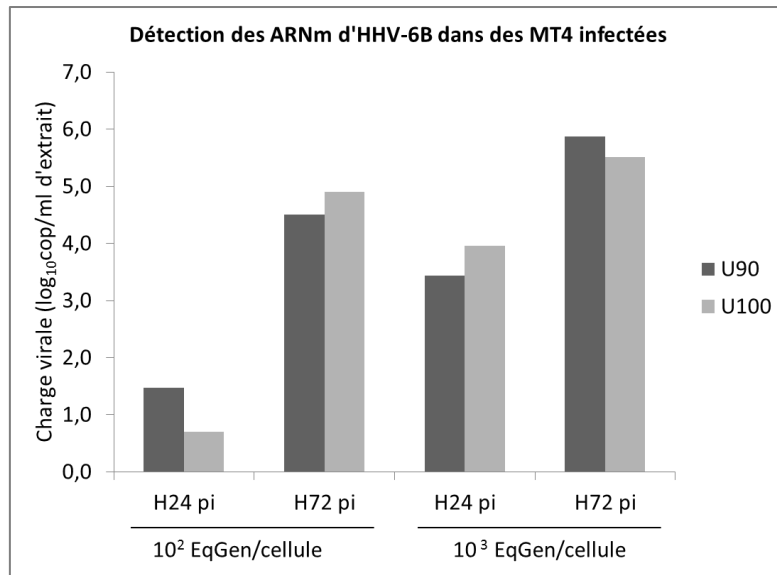
La détection des ARNm a été réalisée au cours de 6 cinétiques d'infections. Les ARN messagers U90 et U100 n'ont soit pas été détectés (n=1, infections avec la concentration  $10^2$ EqGen/pDCs) soit détecté à H24 et/ou à H72 pour U90 et/ou U100 (Tableau 18). L'analyse globale de ces résultats montre lorsqu'ils sont détectés une décroissance des concentrations en ARN messagers au cours du temps. La réalisation d'une migration sur gel

de polyacrylamide a mis en évidence que les ARN détectés étaient présents sous les formes épissées et non épissées dès H24.

**Tableau 18. Résultats des RT-PCR U90 et U100 réalisées à partir des pDCs infectées par une souche d'HHV-6B (souche HST) en fonction du temps et des conditions de cultures**

Conditions d'infections	N° Expérience	U90 (copies/ml d'extrait)		U100 (copies/ml d'extrait)	
		H24 pi	H72 pi	H24 pi	H72 pi
Infections avec la concentration $10^3$ EqGen/pDCs	Exp n°1	4875	165	19420	1990
	Exp n°2	22740	5260	81790	40020
	Exp n°4	50	50	610	1145
	Exp n°6	250	320	115	460
Infections avec la concentration $10^2$ EqGen/pDCs	Exp n°4	30	0	370	0
	Exp n°5	95	0	2245	0
	Exp n°6	0	15	55	20
	Exp n°8	0	0	0	0

Les analyses par biologie moléculaire réalisées sur les culots cellulaires recueillis à H24 et H72 n'ont pas mis en évidence une accumulation d'ADN ou une production d'ARN messagers U90 ou U100 dans les pDCs au cours du temps. Nous savons par expérience, qu'un temps de culture de 72h dans des cellules permissives à l'infection par HHV-6B, les cellules de la lignée MT4, permettait de détecter par nos techniques, une réplication virale active avec mise en évidence d'accumulation d'ADN et d'ARN messagers. Nous avons voulu cependant nous assurer que dans nos conditions de culture (même concentration cellulaire, même stock viral, mêmes concentrations) ce temps était suffisant pour détecter une infection productive dans un système permissif, ce qui a été confirmé par la mise en évidence d'une cinétique croissante de production d'ARN messagers dans des MT4 quelle que soit la concentration virale inoculée ( $10^2$  EqGen ou  $10^3$  EqGen par cellule) comme montré Figure 33.

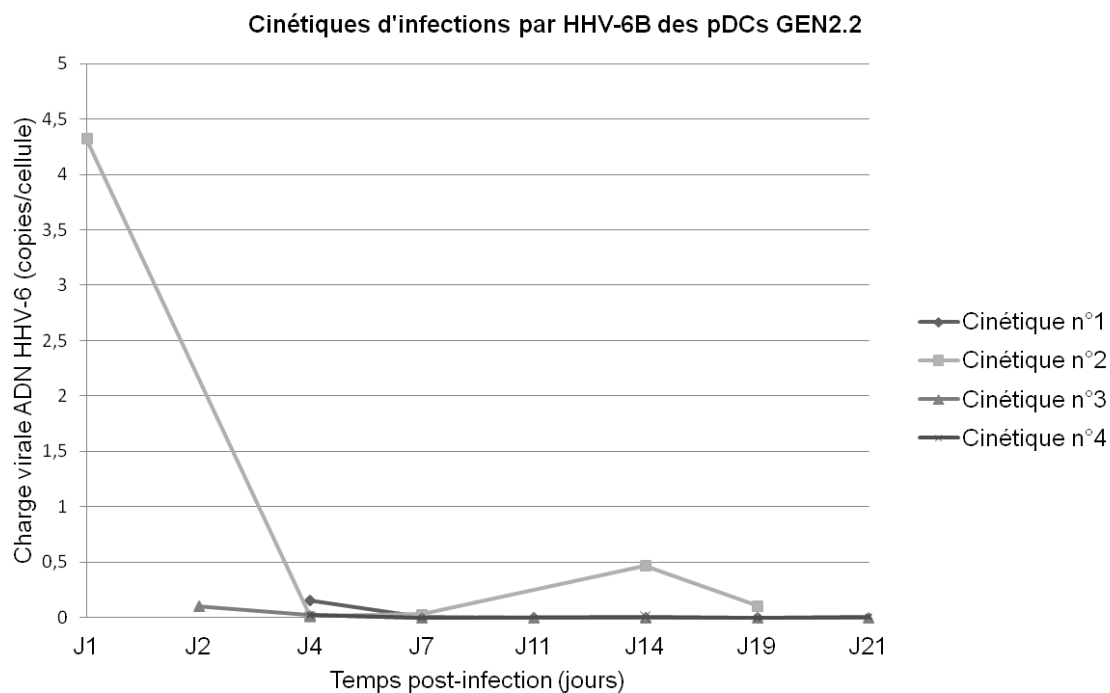


**Figure 33. Résultats des RT-PCR U90 et U100 réalisées à partir de cellules MT4 infectées par une souche d'HHV-6B (souche HST) dans les mêmes conditions que celles utilisées pour l'infection des pDCs**

Les premiers résultats obtenus étaient en faveur de l'absence de permissivité des pDCs à une infection par HHV-6B.

- *Résultats pour la lignée GEN2.2*

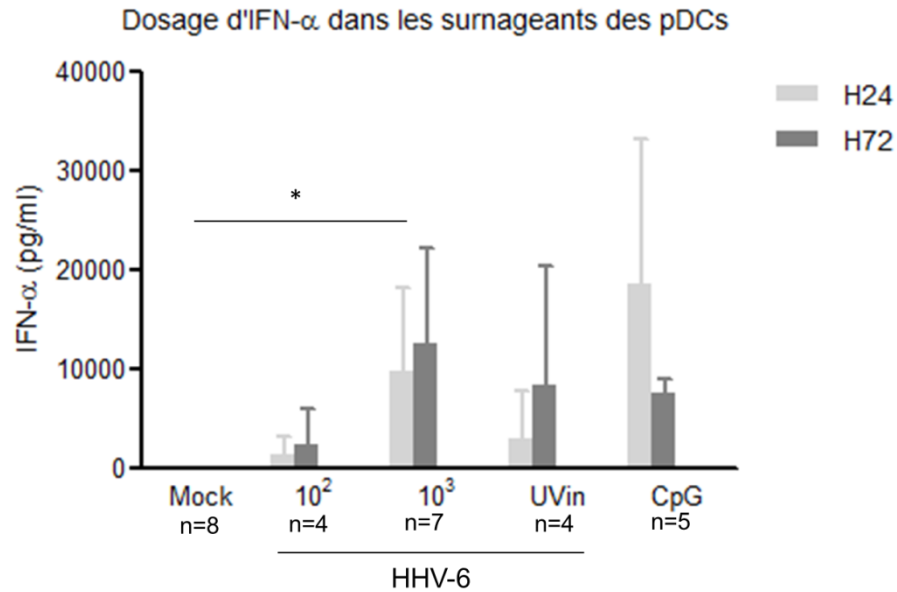
Quatre cinétiques d'infection ont été réalisées en utilisant la lignée GEN2.2 et prolongées sur 21 jours. Les pDCs ont été infectées à la concentration de  $10^3$  EqGen/pDCs. Des prélèvements de pDCs ( $1.10^6$  cellules) ont été recueillis à différents temps post-infection pour analyse ultérieure par PCR HHV-6 et par IFI. Les résultats obtenus ont mis en évidence une cinétique décroissante de détection du génome de l'HHV-6 comme illustrée sur la Figure 34 (la cinétique d'infection réalisée avec la souche de CMVH a également mis en évidence une diminution de l'ADN viral au cours du temps). La recherche des antigènes viraux d'HHV-6 par IFI s'est révélée négative (données non présentées) (la cinétique d'infection réalisée avec la souche de CMVH a également mis en évidence une diminution de l'ADN au cours du temps)



**Figure 34. Cinétiques d'infections des pDCs GEN2.2 par une souche d'HHV-6B (n=4).**

*Mesure de la production d'IFN- $\alpha$  par les pDCs isolées de PBMCs après mise en contact avec une souche d'HHV-6B*

Le dosage d'IFN- $\alpha$  a été réalisé sur les surnageants de culture des pDCs dans les conditions suivantes : témoin (absence de virus), en présence de virus inactivé ou non à différentes concentrations ( $10^2$  et  $10^3$  EqGen/pDCs). Un contrôle positif (ajout de CpG) a été ajouté dans cinq expériences. Les résultats de ces dosages sont présentés Figure 35.



**Figure 35. Mesure de la sécrétion d'IFN- $\alpha$  par les pDCs au cours du temps post-infection et en fonction des conditions de culture.**

Abréviations : Mock, témoin ; 10<sup>2</sup>, 10<sup>2</sup> EqGen/pDCs ; 10<sup>3</sup>, 10<sup>3</sup> EqGen/pDCs ; UVin, UV, inactivée. L'astérisque indique une valeur de  $p < 0.05$ .

L'HHV-6 induit la sécrétion d'IFN- $\alpha$  par les pDCs à des niveaux variables en fonction des expériences et donc probablement des donneurs. Le niveau d'IFN- $\alpha$  produit est dépendant de la quantité de virus présente dans le milieu puisque des niveaux significativement plus élevés de sécrétion sont détectés dans la condition 10<sup>3</sup> EqGen/cellules (Figure 35).

Les dosages d'IFN- $\alpha$  réalisés à partir des surnageants de culture recueillis au cours des cinétiques d'infections sur la lignée GEN2.2 se sont révélés négatifs dans toutes les expériences conduites avec HHV-6B (n=3) (un résultat similaire a été observé lors de la cinétique d'infection réalisée avec la souche de CMVH).

#### 4.5. Discussion et perspectives

L'objectif de ce 4<sup>ème</sup> travail expérimental était d'évaluer l'impact de l'infection par une souche d'HHV-6B sur le phénotype et/ou les fonctions des pDCs ainsi que la permissivité de ces cellules à une infection par ce virus. Nous avons conduit des essais d'infections *in vitro* sur des pDCs isolées de sang périphérique de donneurs sains pour être le plus proche possible des conditions *in vivo*. Ces cellules étant difficilement cultivables *in vitro* nous avons également mené des essais d'infections en utilisant des pDCs issues de la lignée GEN2.2.

Nous discuterons en premier lieu les résultats obtenus pour les pDCs isolées de sang périphérique puis dans une deuxième partie ceux obtenus avec la lignée GEN2.2

Sur le plan phénotypique les pDCs isolées de PBMCs en culture avec ou sans virus acquièrent un caractère mature partiel objectivé par les modifications morphologiques observées (augmentation de taille, de la réfringence, formation d'agrégats), l'augmentation d'expression des molécules de co-stimulation (CD80, CD86 et CD83) et des molécules HLA de classe I et II à H24. Le phénotype ne varie pas entre H24 et H72, à l'exception du CD83 dont l'expression diminue dans tous les cas.

Notre étude est la première à notre connaissance à rapporter l'étude des modifications phénotypiques induites par l'HHV-6 sur des pDCs. Cette étude est rendue difficile d'interprétation dans la mesure où les pDCs nécessitent la présence d'IL-3 pour survivre *in vitro*, ce qui a pour conséquence d'induire l'expression des molécules de co-stimulation et des molécules HLA (Grouard *et al.*, 1997). Cependant notre objectif était d'évaluer la permissivité des pDCs à une infection par HHV-6, qui est un virus avec un cycle de réplication long et/ou de déterminer les capacités de ce virus à immunomoduler les pDCs, il était donc pertinent pour cela de vouloir maintenir les cellules en culture le plus longtemps possible. Pour pouvoir conclure sur un effet stimulant de l'HHV-6B sur les pDCs, il serait intéressant de réitérer ces expériences sans ajouter d'IL-3 dans le milieu et de faire les analyses dans les 16-24 heures qui suivent l'infection comme l'ont fait d'autres équipes pour étudier l'impact des infections à *Herpesviridae* sur les pDCs (Fiola *et al.*, 2010; Varani *et al.*, 2007; West *et al.*, 2011). Néanmoins, les résultats que nous avons obtenus laissent à penser que l'HHV-6B n'est pas un puissant stimulateur des pDCs comme le montre l'absence d'augmentation significative d'expression des différents marqueurs étudiés sur les cellules mises en présence du virus par rapport aux cellules témoins toutes cultivées avec de l'IL-3. En appliquant le même raisonnement, nos données sont plutôt en faveur d'une absence d'immunomodulation des

pDCs par HHV-6B, puisque nous n'observons pas de diminution de l'expression des molécules de co-stimulation ou des molécules HLA de classe I et II entre cellules infectées et cellules non infectées.

Comme nous l'avons évoqué dans le paragraphe 4.3 des rappels bibliographiques, les données de la littérature rapportant sur les études des interactions entre HHV-6 et DCs, sont souvent contradictoires, en particulier celles qui concernent l'impact de l'HHV-6B sur l'expression des molécules que nous avons évaluées dans notre travail. En effet, plusieurs études ont montré que l'infection par HHV-6B, qu'elle soit productive ou non, induit une augmentation de l'expression des molécules CD86 et CD80 à la surface des cDCs immatures (Bertelsen *et al.*, 2010; Gustafsson *et al.*, 2013; Kakimoto *et al.*, 2002; Niiya *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2005) alors que sur cDCs matures l'HHV-6B induit, là encore, une augmentation de l'expression du CD86, mais une diminution de celle du CD80 (Bertelsen *et al.*, 2010; Kakimoto *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2005). L'infection par HHV-6B n'a soit pas d'impact sur l'expression de la molécule CD83 (Gustafsson *et al.*, 2013; Hirata *et al.*, 2001) soit induit une augmentation de son expression (Kakimoto *et al.*, 2002; Niiya *et al.*, 2006) sur les deux types de cDCs. Les résultats des études sur l'expression des molécules HLA de classe I et II sont également contradictoires. L'expression de ces molécules est ainsi décrite, par certains auteurs, comme étant, soit augmentée par HHV-6B (Bertelsen *et al.*, 2010; Gustafsson *et al.*, 2013; Kakimoto *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2005), soit diminuée (Smith *et al.*, 2005), voire non modifiée (Hirata *et al.*, 2001; Niiya *et al.*, 2006), qu'il y ait ou non réplique. L'interaction entre l'HHV-6B et les cDCs semble donc relativement complexe.

Par ailleurs, les pDCs semblent avoir un comportement différent en fonction de l'herpesvirus étudié. En effet, alors qu'une infection non permissive par l'EBV ou une infection permissive par l'HHV-8 induit une maturation des pDCs avec augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation CD86 et/ou CD83 (Fiola *et al.*, 2010; West *et al.*, 2011), une infection non permissive par le CMV induit une augmentation de l'expression des molécules de CMH de classe II et du CD83 mais pas de celle des molécules CD80 et CD86 (Varani *et al.*, 2007).

L'étude de l'expression de la molécule CD46 qui était le seul récepteur connu pour HHV-6 au début de notre étude, a par ailleurs mis en évidence une augmentation de son expression au cours du temps dans toutes les conditions testées. L'équipe de Santoro *et al.* (1999) qui a décrit le CD46 comme étant le récepteur pour HHV-6A (souche GS) et HHV-6B souche



(Z29) avait mis en évidence une diminution de l'expression de ce récepteur à la surface des lymphocytes T CD4+ infectés. Nous ne mettons pas en évidence de modification de l'expression du CD46 entre la condition témoin ou les conditions « présence de virus », ceci est cohérent puisque nous savons à présent que le récepteur de la souche HST, utilisée pour nos travaux, est la molécule CD134 et non le CD46, et que nous montrons également que les pDCs ne sont pas permissives à une infection par HHV-6B.

Les résultats des dosages d'IFN- $\alpha$  réalisés sur les surnageants montrent que l'HHV-6B induit la sécrétion d'IFN- $\alpha$  par les pDCs isolées de sang périphérique. Le niveau de cette sécrétion varie significativement en fonction de la dose de virus ajoutée. L'absence de différence entre virus inactivé ou non indique que cette sécrétion n'est pas dépendante d'une réplication virale ce qui est concordant avec nos résultats montrant l'absence de permissivité des pDCs à l'infection par HHV-6B (cf. ci-dessous). Ces résultats s'accordent avec ceux obtenus précédemment par d'autres équipes pour l'HHV-6B (Nordström *et al.*, 2010; Nordström & Eriksson, 2012) et d'autres herpesvirus (CMVH, EBV, HHV-8) (Fiola *et al.*, 2010; Varani *et al.*, 2007; West *et al.*, 2011) qui eux aussi ont mis en évidence une induction de la sécrétion d'IFN- $\alpha$  par les pDCs suite à une infection par ces derniers. Il serait intéressant de compléter notre étude par une caractérisation du TLR ou des TLR (TLR7 et/ou 9) impliqué(s) dans la reconnaissance du génome d'HHV-6 par les pDCs. Cela n'a, à ce jour, pas encore été étudié pour l'HHV-6. Les équipes qui se sont intéressées à ce sujet chez l'homme, ont montré que la sécrétion d'IFN- $\alpha$  par les pDCs était médiée pour les herpesvirus par l'engagement des TLR-7 et 9 (Fiola *et al.*, 2010; Varani *et al.*, 2007).

Notre deuxième objectif était d'évaluer la permissivité des pDCs à une infection par HHV-6B. L'ensemble de nos résultats, obtenus par les études de biologie moléculaire, a montré une absence d'accumulation d'ADN ou d'ARNm au cours du temps. Les ARNm U90 et U100 que nous avons détectés sous les formes épissées et non épissées étaient probablement présents dans la suspension virale utilisée. Une autre hypothèse est que ces ARN pourraient être présents dans les particules virales infectieuses. En effet, il a été montré pour d'autres herpesvirus (CMVH, HSV) que des ARN codants ou non, dont le rôle n'est pas clairement déterminé, étaient empaquetés dans les particules virales (Amen & Griffiths, 2011; Bresnahan & Shenk, 2000; Sciortino *et al.*, 2001). Cependant ce phénomène n'a pas été décrit pour l'HHV-6 et nécessiterait d'être investigué pour valider ou non cette hypothèse. L'ensemble de nos données résultant de l'infection par HHV-6B de pDCs humaines isolées de sang périphérique semblent plutôt en faveur d'une absence de permissivité de ces cellules par

la souche HST, ce qui est en contradiction avec ce qu'a montré l'équipe de Takemoto et al. (2009) qui suggérait l'existence d'une infection productive par les pDCs. Par ailleurs, nos résultats sont cohérents avec le fait que la molécule CD134 ou OX40, récepteur de la souche HST d'HHV-6B(Tang *et al.*, 2013), n'est pas exprimée par les pDCs, qui elles expriment le ligand de cette molécule le OX40L(Liu, 2005).

Les données résultant de l'étude des infections de pDCs à *Herpesviridae* ont mis en évidence une sensibilité divergente des pDCs en fonction de l'espèce virale utilisée. En effet, alors que les pDCs semblent pouvoir être infectées de manière productive par l'HHV-8 (West *et al.*, 2011) ou par le VZV (Huch *et al.*, 2010), aucun marqueur de réplication active n'a été mis en évidence dans des pDCs infectées par le CMVH (Varani *et al.*, 2007) ou l'EBV(Fiola *et al.*, 2010).

Cependant, nous ne pouvions pas exclure que dans un système moins permissif que des cellules MT4 un temps de 72heures soit insuffisant pour mettre en évidence des marqueurs de réplication virale active. Du fait de la mortalité très élevée des pDCs isolées de sang périphériques au-delà de 72 heures de culture, nous n'étions pas en mesure de réaliser des cinétiques d'infections sur une plus longue durée. C'est la raison pour laquelle nous avons déposé auprès de l'EFS une demande de mise à disposition de la lignée de pDCs GEN2.2 développée par l'équipe de Grenoble, sur lesquelles nous avons réitéré nos essais d'infections *in vitro* par HHV-6B. Les résultats que nous avons obtenus en réalisant ces essais ont permis de confirmer l'absence de permissivité des pDCs à une infection par la souche HST. En effet, malgré des cinétiques réalisées sur une longue période (3 semaines), aucune accumulation d'ADN ou de détection d'antigènes viraux n'ont été mis en évidence.

Ainsi l'ensemble des résultats obtenus suite aux essais d'infections *in vitro* de pDCs issus de donneurs sains ou de la lignée GEN2.2 montre l'absence de permissivité des pDCs à l'infection par HHV-6B.

Par ailleurs, alors que l'équipe de Chaperot *et al.* (2006) qui a développé et caractérisé cette lignée a montré son activation au contact d'un virus *influenzae* (augmentation de l'expression des molécules CD80, CD83, CD40), nous ne mettons en évidence aucune modification phénotypique de ces cellules mises en contact avec l'HHV-6B pour lesquelles nous n'avons détecté aucune expression du CD80 ou du CD83 (les mêmes résultats ont été reproduits en utilisant la souche VHL-E de CMVH). Ceci pourrait s'expliquer par plusieurs hypothèses. Premièrement, les GEN2.2 ne seraient pas activables par un virus à ADN, mais ceci est peu probable car ces cellules possèdent le récepteurTLR-9 qui reconnaît les séquences

riches en CpG non méthylé présentes dans les génomes des virus à ADN(Chaperot *et al.*, 2006). Une deuxième hypothèse est que la quantité de particules virales que nous avons utilisée est insuffisante pour induire une activation des pDCs. Néanmoins, l'absence de diminution d'expression des molécules HLA de classe I et II ou du CD86 au cours de nos travaux est un argument supplémentaire pour penser que HHV-6B n'est pas capable de moduler leur expression par les pDCs, à la concentration utilisée.

De la même manière, nous n'avons pas été en mesure de mettre en évidence une sécrétion d'IFN- $\alpha$  par les pDCs de la lignée à la différence, là encore de ce qui a été décrit par Chaperot *et al.* avec un virus *influenzae* et par Rua *et al.* (2012) avec un virus Foamy (rétrovirus appartenant à la famille des *Spumaviridae*). Les mêmes hypothèses que celles émises ci-dessus peuvent être évoquées pour expliquer cette divergence avec nos résultats. Elle pourrait par ailleurs s'expliquer par l'utilisation d'une méthode de dosage moins sensible dans notre étude que celle utilisée par Chaperot *et al.*(2005)ou surtout que celle utilisée par Rua *et al.* qui quantifie l'IFN- $\alpha$  à l'aide d'un test sur cellules HL116 (cellules qui possèdent un gène de la luciférase dont le promoteur est dépendant de la présence d'IFN- $\alpha$  dans le milieu)(Rua *et al.*, 2012). Il faudrait donc poursuivre notre travail sur cette lignée en utilisant une quantité plus importante de virus et envisager l'utilisation de tests plus sensibles de mesure d'IFN- $\alpha$  pour pouvoir conclure et confirmer ou non les résultats préliminaires obtenus avec cette lignée GEN2.2.

En conclusion, les essais d'infections *in vitro* menés sur les pDCs isolées de sang périphérique ou la lignée GEN2.2 montrent une absence de permissivité des pDCs à l'infection par HHV-6B et que l'HHV-6B est capable d'induire la sécrétion d'IFN- $\alpha$  par les pDCs isolées de sang périphériques. Nous devons à présent, compléter nos expériences en modifiant nos conditions de cultures pour conclure sur la présence ou l'absence d'influence de l'HHV-6B sur le phénotype des pDCs.

---

**CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Ce travail de thèse a rapporté des travaux de recherche clinique et des essais à visée plus fondamentale.

Sur le versant clinique, nos travaux montrent que la nature de la source de CSH utilisée pour l'allogreffe influence la survenue de certaines réactivations virales et la reconstitution immune dans la période post-transplantation.

Nous confirmons, de façon prospective, que l'utilisation d'un greffon d'origine placentaire constitue le principal facteur de risque d'infections à HHV-6 en période post-greffe (*Article 1 dans l'annexe 1, page 194*). Ces infections surviennent très tôt dans les suites de la transplantation et durent longtemps. Ainsi, la moitié des patients présentent encore une virémie positive jusqu'à 4 ans post-greffe (*Article 2 dans l'annexe 1, page 223*).

Les infections précoces à HHV-6 sont associées à des retards à la sortie d'aplasie et de fait, à un besoin transfusionnel plus important pour ces patients. L'absence de manifestations cliniques sévères au sein de notre cohorte suggère cependant que ce type d'infection virale n'a pas ou peu d'impact sur le devenir des patients recevant un conditionnement d'intensité réduite, qui est aujourd'hui le type de conditionnement le plus fréquemment utilisé chez l'adulte.

Au cours de notre travail, nous nous sommes également intéressés à la cinétique de survenue de quatre autres infections virales opportunistes majeures pour les patients allogreffés de CSH : CMVH, EBV, ADV et BKPyV. Nos résultats mettent en évidence des différences en fonction du virus, du type de greffon et/ou du conditionnement utilisé. Ainsi, l'incidence des infections à BKPyV et ADV sont significativement plus élevées après greffe de SP. L'inverse est observé pour les infections à EBV, qui sont plus fréquemment retrouvées chez les patients ayant reçu une greffe de CSP après un conditionnement contenant du SAL. La prévalence des infections à CMVH est, quant à elle, similaire entre les deux groupes de patients étudiés.

Enfin, avec l'étude de la reconstitution immune post-allogreffe, nous montrons que non seulement les lymphocytes B et les monocytes reconstituent plus rapidement et à des taux plus élevés après greffe de SP et que l'hyperlymphocytose B persiste à distance de la transplantation après ce type d'allogreffe. Nous mettons également en évidence que les lymphocytes T CD4+ tendent à reconstituer plus rapidement après ce type de greffe et que l'inverse est observé pour les lymphocytes T CD8+. Néanmoins, ces différences sur le plan immunologique ne permettent pas d'expliquer les différences observées sur le plan virologique.

Notre problématique initiale était de mieux comprendre le lien qui existe entre l'HHV-6 et la greffe de SP. Pour tenter d'expliquer ce phénomène particulier, nous avons émis trois hypothèses. La première est que l'immaturation des cellules provenant des CSH issues de SP entraîne un déficit en réponse antivirale. La deuxième était que la quantité de CD46, seul récepteur connu pour HHV-6 au début de notre travail, puisse influencer l'intensité de la réplication virale. La troisième était qu'une cible cellulaire, autre que les lymphocytes T, présente en plus grande quantité lors de la reconstitution immunitaire chez les patients greffés de SP, puisse être le siège d'une réplication virale active.

La première hypothèse envisagée est peu probable. En effet, l'incidence élevée d'infections à HHV-6 après greffe de SP, n'est pas corrélée à un risque plus élevé d'infections à CMV ou à EBV, deux virus appartenant à la même famille virale, ce qui élimine un déficit global de réponse antivirale. Cohen *et al.* (2006) ont d'ailleurs montré que les lymphocytes T naïfs issus du greffon de SP étaient capables de générer des lymphocytes T spécifiques dirigés contre les *Herpesviridae* (CMV, VZV et HSV), détectables dès les premiers mois qui suivent la greffe. Enfin, une étude visant à caractériser la réponse T spécifique développée en réponse à une réactivation à HHV-6, a montré que les patients infectés présentaient des taux plus élevés de lymphocytes T spécifiques anti-HHV-6 producteurs d'IFN- $\gamma$ , au 2<sup>ème</sup> mois post-greffe et une capacité plus importante de prolifération de ces mêmes lymphocytes au 6<sup>ème</sup> mois post-greffe, comparativement à des patients non-infectés (de Pagter *et al.*, 2012).

Concernant l'implication éventuelle du CD46, notre équipe a précédemment montré qu'il n'influait pas la survenue des infections à HHV-6 après greffe de SP (Chevallier *et al.*, 2013b). Ceci est cohérent, car nous savons à présent que l'HHV-6B, virus majoritairement impliqué dans les cas de réactivations après allogreffe, utilise très probablement comme récepteur, la molécule CD134 ou OX40 (Tang *et al.*, 2013). Cette molécule est exprimée à la surface des lymphocytes T activés, principalement sur les lymphocytes T CD4+, c'est-à-dire à la surface du type cellulaire le plus permissif à l'infection par HHV-6B. Ainsi, si le CD134 était plus fortement exprimé sur les lymphocytes T CD4+ générés après injection de greffon placentaire et/ou si la quantité de lymphocytes T CD4+/CD134+ était plus importante après greffe de SP, cela pourrait conduire à une réplication plus intense de l'HHV-6B après ce type de greffe (via une permissivité accrue des cellules provenant de SP et/ou via une augmentation du nombre de cellules cibles disponibles pour l'HHV-6B). Cette hypothèse est renforcée par nos observations concernant la reconstitution immunitaire. En effet, malgré l'absence de significativité après analyse par un modèle linéaire mixte, nous avons tout de même pu

observer, que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ont tendance à reconstituer plus rapidement et à des taux plus élevés après greffe de SP. Pour investiguer cette hypothèse, nous avons récemment mené une étude comparant l'expression du CD134 chez des patients lors de la reconstitution immunitaire (SP versus CSP). Nos premiers résultats ont montré que la moyenne d'intensité de fluorescence du CD134 sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ( $p=0.01$ ) et la proportion de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>/CD134<sup>+</sup> ( $p=0.06$ ) tendent à être plus élevées après greffe de SP (données non présentées). Il est à présent nécessaire de poursuivre ce travail en réalisant une étude prospective sur un plus grand nombre de patients pour pouvoir renforcer la puissance statistique et confirmer ces données préliminaires. A notre connaissance, il n'y a aucune donnée dans la littérature relative à l'étude du lien entre l'expression du CD134 au cours de la reconstitution immunitaire après allogreffe et infections à HHV-6 ; ces premiers résultats sont donc très encourageants.

Enfin, nos résultats obtenus avec la réalisation des tris de PBMCs de patients allogreffés de SP infectés par HHV-6B, confirment que la cible principale du virus dans ce contexte est constituée par le lymphocyte T. Ce qui renforce notre hypothèse précédemment citée impliquant le CD134.

Dans la dernière partie de notre travail expérimental, nous avons étudié les conséquences de l'interaction entre HHV-6 et pDCs, qui sont des cellules jouant un rôle essentiel dans la mise en place d'une réponse antivirale. Nous montrons que l'HHV-6B induit la sécrétion d'IFN de type I par les pDCs isolées de PBMCs, sans influencer l'expression des molécules de co-stimulation et des molécules du HLA de classe I et II à leur surface. Nos essais d'infections *in vitro* de pDCs isolées de sang périphérique et de pDCs issues de la lignée GEN2.2, sont donc en faveur de l'absence de permissivité de ce type cellulaire à une infection par HHV-6.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons abordé différents aspects de l'infection à HHV-6. L'ensemble de nos résultats a permis de progresser dans la connaissance du pouvoir pathogène de ce virus chez les patients allogreffés de CSH, en particulier dans le contexte de la greffe de SP.

---

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



- Ablashi, D., Agut, H., Alvarez-Lafuente, R., Clark, D. A., Dewhurst, S., DiLuca, D., Flamand, L., Frenkel, N., Gallo, R. & other authors. (2014). Classification of HHV-6A and HHV-6B as distinct viruses. *Arch Virol* 159, 863–870.
- Ablashi, D. V., Devin, C. L., Yoshikawa, T., Lautenschlager, I., Luppi, M., Kühl, U. & Komaroff, A. L. (2010). Review Part 3: Human herpesvirus-6 in multiple non-neurological diseases. *J Med Virol* 82, 1903–1910.
- Ablashi, D. V., Salahuddin, S. Z., Josephs, S. F., Imam, F., Lusso, P., Gallo, R. C., Hung, C., Lemp, J. & Markham, P. D. (1987). HBLV (or HHV-6) in human cell lines. *Nature* 329, 207.
- Ablashi, D. V., Lusso, P., Hung, C. L., Salahuddin, S. Z., Josephs, S. F., Llana, T., Kramarsky, B., Biberfeld, P., Markham, P. D. & Gallo, R. C. (1988). Utilization of human hematopoietic cell lines for the propagation and characterization of HBLV (human herpesvirus 6). *Int J Cancer J Int Cancer* 42, 787–791.
- Ablashi, D. V., Balachandran, N., Josephs, S. F., Hung, C. L., Krueger, G. R., Kramarsky, B., Salahuddin, S. Z. & Gallo, R. C. (1991). Genomic polymorphism, growth properties, and immunologic variations in human herpesvirus-6 isolates. *Virology* 184, 545–552.
- Achour, A., Malet, I., Le Gal, F., Dehée, A., Gautheret-Dejean, A., Bonnafous, P. & Agut, H. (2008). Variability of gB and gH genes of human herpesvirus-6 among clinical specimens. *J Med Virol* 80, 1211–1221.
- Achour, A., Malet, I., Deback, C., Bonnafous, P., Boutolleau, D., Gautheret-Dejean, A. & Agut, H. (2009). Length variability of telomeric repeat sequences of human herpesvirus 6 DNA. *J Virol Methods* 159, 127–130.
- Agut, H., Guetard, D., Collandre, H., Dauguet, C., Montagnier, L., Miclea, J. M., Baurmann, H. & Gessain, A. (1988). Concomitant infection by human herpesvirus 6, HTLV-I, and HIV-2. *Lancet Lond Engl* 1, 712.
- Agut, H., Aubin, J. T. & Huraux, J. M. (1991). Homogeneous susceptibility of distinct human herpesvirus 6 strains to antivirals in vitro. *J Infect Dis* 163, 1382–1383.
- Agut, H. (2011). Deciphering the clinical impact of acute human herpesvirus 6 (HHV-6) infections. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*.
- Agut, H., Bonnafous, P. & Gautheret-Dejean, A. (2015). Laboratory and Clinical Aspects of Human Herpesvirus 6 Infections. *Clin Microbiol Rev* 28, 313–335.
- Akashi, K., Eizuru, Y., Sumiyoshi, Y., Minematsu, T., Hara, S., Harada, M., Kikuchi, M., Niho, Y. & Minamishima, Y. (1993). Brief report: severe infectious mononucleosis-like syndrome and primary human herpesvirus 6 infection in an adult. *N Engl J Med* 329, 168–171.
- Akkapaiboon, P., Mori, Y., Sadaoka, T., Yonemoto, S. & Yamanishi, K. (2004). Intracellular Processing of Human Herpesvirus 6 Glycoproteins Q1 and Q2 into Tetrameric Complexes Expressed on the Viral Envelope. *J Virol* 78, 7969–7983.
- Albright, A. V., Lavi, E., Black, J. B., Goldberg, S., O'Connor, M. J. & González-Scarano, F. (1998). The effect of human herpesvirus-6 (HHV-6) on cultured human neural cells: oligodendrocytes and microglia. *J Neurovirol* 4, 486–494.
- Amen, M. A. & Griffiths, A. (2011). Packaging of Non-Coding RNAs into Herpesvirus Virions: Comparisons to Coding RNAs. *Front Genet* 2, 81.
- Amo, K., Tanaka-Taya, K., Inagi, R., Miyagawa, H., Miyoshi, H., Okusu, I., Sashihara, J., Hara, J., Nakayama, M. & other authors. (2003). Human herpesvirus 6B infection of the large intestine of patients with diarrhea. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 36, 120–123.
- Andre-Garnier, E., Robillard, N., Costa-Mattioli, M., Besse, B., Billaudel, S. & Imbert-Marcille, B.-M. (2003). A one-step RT-PCR and a flow cytometry method as two specific tools for direct evaluation of human herpesvirus-6 replication. *J Virol Methods* 108, 213–222.

- Andre-Garnier, E., Milpied, N., Boutolleau, D., Saiagh, S., Billaudel, S. & Imbert-Marcille, B.-M. (2004). Reactivation of human herpesvirus 6 during ex vivo expansion of circulating CD34+ haematopoietic stem cells. *J Gen Virol* 85, 3333–3336.
- Appleton, A. L., Sviland, L., Peiris, J. S., Taylor, C. E., Wilkes, J., Green, M. A., Pearson, A. D., Kelly, P. J., Malcolm, A. J. & Proctor, S. J. (1995). Human herpes virus-6 infection in marrow graft recipients: role in pathogenesis of graft-versus-host disease. Newcastle upon Tyne Bone Marrow Transport Group. *Bone Marrow Transplant* 16, 777–782.
- Arbuckle, J. H. & Medveczky, P. G. (2011). The molecular biology of human herpesvirus-6 latency and telomere integration. *Microbes Infect Inst Pasteur* 13, 731–741.
- Arbuckle, J. H., Medveczky, M. M., Luka, J., Hadley, S. H., Luegmayer, A., Ablashi, D., Lund, T. C., Tolar, J., De Meirleir, K. & other authors. (2010). The latent human herpesvirus-6A genome specifically integrates in telomeres of human chromosomes in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 5563–5568.
- Arena, A., Liberto, M. C., Iannello, D., Capozza, A. B. & Focà, A. (1999). Altered cytokine production after human herpes virus type 6 infection. *New Microbiol* 22, 293–300.
- Arena, A., Merendino, R. A., Bonina, L., Iannello, D., Stassi, G. & Mastroeni, P. (2000). Role of IL-15 on monocytic resistance to human herpesvirus 6 infection. *New Microbiol* 23, 105–112.
- Asada, H., Klaus-Kovtun, V., Golding, H., Katz, S. I. & Blauvelt, A. (1999). Human herpesvirus 6 infects dendritic cells and suppresses human immunodeficiency virus type 1 replication in coinfecting cultures. *J Virol* 73, 4019–4028.
- Asano, Y., Yoshikawa, T., Suga, S., Yazaki, T., Kondo, K. & Yamanishi, K. (1990). Fatal fulminant hepatitis in an infant with human herpesvirus-6 infection. *Lancet Lond Engl* 335, 862–863.
- Asano, Y., Yoshikawa, T., Kajita, Y., Ogura, R., Suga, S., Yazaki, T., Nakashima, T., Yamada, A. & Kurata, T. (1992). Fatal encephalitis/encephalopathy in primary human herpesvirus-6 infection. *Arch Dis Child* 67, 1484–1485.
- Asano, Y., Yoshikawa, T., Suga, S., Kobayashi, I., Nakashima, T., Yazaki, T., Kajita, Y. & Ozaki, T. (1994). Clinical features of infants with primary human herpesvirus 6 infection (exanthem subitum, roseola infantum). *Pediatrics* 93, 104–108.
- Aubin, J. T., Collandre, H., Candotti, D., Ingrand, D., Rouzioux, C., Burgard, M., Richard, S., Huraux, J. M. & Agut, H. (1991). Several groups among human herpesvirus 6 strains can be distinguished by Southern blotting and polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 29, 367–372.
- Aubin, J. T., Poirel, L., Agut, H., Huraux, J. M., Bignozzi, C., Brossard, Y., Mulliez, N., Roume, J., Lecuru, F. & Taurelle, R. (1992). Intrauterine transmission of human herpesvirus 6. *Lancet Lond Engl* 340, 482–483.
- Aubin, J. T., Agut, H., Collandre, H., Yamanishi, K., Chandran, B., Montagnier, L. & Huraux, J. M. (1993). Antigenic and genetic differentiation of the two putative types of human herpes virus 6. *J Virol Methods* 41, 223–234.
- Aubin, J. T., Poirel, L., Robert, C., Huraux, J. M. & Agut, H. (1994). Identification of human herpesvirus 6 variants A and B by amplicon hybridization with variant-specific oligonucleotides and amplification with variant-specific primers. *J Clin Microbiol* 32, 2434–2440.
- Bacigalupo, A., Ballen, K., Rizzo, D., Giral, S., Lazarus, H., Ho, V., Apperley, J., Slavin, S., Pasquini, M. & other authors. (2009). Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 15, 1628–1633.
- Balachandran, N., Amelse, R. E., Zhou, W. W. & Chang, C. K. (1989). Identification of proteins specific for human herpesvirus 6-infected human T cells. *J Virol* 63, 2835–2840.
- Ballen, K. K., Gluckman, E. & Broxmeyer, H. E. (2013). Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. *Blood* 122, 491–498.

- Banchereau, J. & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245–252.
- Barchet, W., Cella, M. & Colonna, M. (2005). Plasmacytoid dendritic cells--virus experts of innate immunity. *Semin Immunol* 17, 253–261.
- Bates, M., Monze, M., Bima, H., Kapambwe, M., Clark, D., Kasolo, F. C. & Gompels, U. A. (2009). Predominant human herpesvirus 6 variant A infant infections in an HIV-1 endemic region of Sub-Saharan Africa. *J Med Virol* 81, 779–789.
- Becerra, A., Gibson, L., Stern, L. J. & Calvo-Calle, J. M. (2014). Immune response to HHV-6 and implications for immunotherapy. *Curr Opin Virol* 9, 154–161.
- Beck, J. C., Wagner, J. E., DeFor, T. E., Brunstein, C. G., Schleiss, M. R., Young, J.-A., Weisdorf, D. H., Cooley, S., Miller, J. S. & Verneris, M. R. (2010). Impact of cytomegalovirus (CMV) reactivation after umbilical cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 16, 215–222.
- Benjamin, D. K., Miller, W. C., Bayliff, S., Martel, L., Alexander, K. A. & Martin, P. L. (2002). Infections diagnosed in the first year after pediatric stem cell transplantation. *Pediatr Infect Dis J* 21, 227–234.
- Bertelsen, L. B., Petersen, C. C., Kofod-Olsen, E., Oster, B., Höllsberg, P., Agger, R. & Hokland, M. (2010). Human herpesvirus 6B induces phenotypic maturation without IL-10 and IL-12p70 production in dendritic cells. *Scand J Immunol* 71, 431–439.
- Betts, B. C., Young, J.-A. H., Ustun, C., Cao, Q. & Weisdorf, D. J. (2011). Human Herpesvirus 6 Infection after Hematopoietic Cell Transplantation: Is Routine Surveillance Necessary? *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*.
- Biberfeld, P., Kramarsky, B., Salahuddin, S. Z. & Gallo, R. C. (1987). Ultrastructural characterization of a new human B lymphotropic DNA virus (human herpesvirus 6) isolated from patients with lymphoproliferative disease. *J Natl Cancer Inst* 79, 933–941.
- Birnbaum, T., Padovan, C. S., Sporer, B., Rupprecht, T. A., Ausserer, H., Jaeger, G. & Pfister, H. W. (2005). Severe meningoencephalitis caused by human herpesvirus 6 type B in an immunocompetent woman treated with ganciclovir. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 40, 887–889.
- Blaise, D. & Castagna, L. (2012). Do different conditioning regimens really make a difference? *Hematol Educ Program Am Soc Hematol Am Soc Hematol Educ Program* 2012, 237–245.
- De Bolle, L., Naesens, L. & De Clercq, E. (2005). Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clin Microbiol Rev* 18, 217–245.
- Bonnafous, P., Gautheret-Dejean, A. & Agut, H. (2012). HHV-6 et antiviraux: le sixième herpèvirus humain fait aussi de la résistance. *Virologie* 16 (1).
- Le Bourgeois, A., Mohr, C., Guillaume, T., Delaunay, J., Malard, F., Loirat, M., Peterlin, P., Blin, N., Dubruille, V. & other authors. (2013a). Comparison of outcomes after two standards-of-care reduced-intensity conditioning regimens and two different graft sources for allogeneic stem cell transplantation in adults with hematologic diseases: a single-center analysis. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 19, 934–939.
- Le Bourgeois, A., Lestang, E., Guillaume, T., Delaunay, J., Ayari, S., Blin, N., Clavert, A., Tessoulin, B., Dubruille, V. & other authors. (2013b). Prognostic impact of immune status and hematopoietic recovery before and after fludarabine, IV busulfan, and antithymocyte globulins (FB2 regimen) reduced-intensity conditioning regimen (RIC) allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT). *Eur J Haematol* 90, 177–186.
- Le Bourgeois, A., Labopin, M., Guillaume, T., Delaunay, J., Foucher, Y., Tessoulin, B., Malard, F., Ayari, S., Peterlin, P. & other authors. (2014). Human herpesvirus 6 reactivation before engraftment is strongly predictive of graft failure after double umbilical cord blood allogeneic stem cell transplantation in adults. *Exp Hematol* 42, 945–954.

- Le Bourgeois, A., Peterlin, P., Guillaume, T., Delaunay, J., Duquesne, A., Le Gouill, S., Moreau, P., Campion, L. & Chevallier, P. (2015). Important prognostic impact of early haematopoietic recovery after TCF (2 Grays total body irradiation + cyclophosphamide 50 mg/Kg 1 day + fludarabine 200 mg/m<sup>2</sup> 5 days) reduced intensity conditioning (RIC) double umbilical cord blood (dUCB) allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) in adults. *EBMT Communication* affichée.
- Boutolleau, D., Fernandez, C., André, E., Imbert-Marcille, B.-M., Milpied, N., Agut, H. & Gautheret-Dejean, A. (2003). Human herpesvirus (HHV)-6 and HHV-7: two closely related viruses with different infection profiles in stem cell transplantation recipients. *J Infect Dis* 187, 179–186.
- Boutolleau, D., Agut, H. & Gautheret-Dejean, A. (2006a). Human herpesvirus 6 genome integration: a possible cause of misdiagnosis of active viral infection? *J Infect Dis* 194, 1019–1020; author reply 1021–1023.
- Boutolleau, D., Duros, C., Bonnafous, P., Caïola, D., Karras, A., Castro, N. D., Ouachée, M., Narcy, P., Gueudin, M. & other authors. (2006b). Identification of human herpesvirus 6 variants A and B by primer-specific real-time PCR may help to revisit their respective role in pathology. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol* 35, 257–263.
- Bowie, A. G. & Unterholzner, L. (2008). Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 8, 911–922.
- Bresnahan, W. A. & Shenk, T. (2000). A subset of viral transcripts packaged within human cytomegalovirus particles. *Science* 288, 2373–2376.
- Bressollette-Bodin, C., Coste-Burel, M., Hourmant, M., Sebille, V., Andre-Garnier, E. & Imbert-Marcille, B. M. (2005). A prospective longitudinal study of BK virus infection in 104 renal transplant recipients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* 5, 1926–1933.
- Bressollette-Bodin, C., Coste-Burel, M., Besse, B., André-Garnier, E., Ferre, V. & Imbert-Marcille, B.-M. (2009). Cellular normalization of viral DNA loads on whole blood improves the clinical management of cytomegalovirus or Epstein Barr virus infections in the setting of pre-emptive therapy. *J Med Virol* 81, 90–98.
- Bressollette-Bodin, C., Nguyen, T. V. H., Illiaquer, M., Besse, B., Peltier, C., Chevallier, P. & Imbert-Marcille, B.-M. (2014). Quantification of two viral transcripts by real time PCR to investigate human herpesvirus type 6 active infection. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol* 59, 94–99.
- Brown, J. C. & Newcomb, W. W. (2011). Herpesvirus capsid assembly: insights from structural analysis. *Curr Opin Virol* 1, 142–149.
- Brunstein, C. G., Weisdorf, D. J., DeFor, T., Barker, J. N., Tolar, J., van Burik, J.-A. H. & Wagner, J. E. (2006). Marked increased risk of Epstein-Barr virus-related complications with the addition of antithymocyte globulin to a nonmyeloablative conditioning prior to unrelated umbilical cord blood transplantation. *Blood* 108, 2874–2880.
- Brunstein, C. G., Barker, J. N., Weisdorf, D. J., DeFor, T. E., Miller, J. S., Blazar, B. R., McGlave, P. B. & Wagner, J. E. (2007). Umbilical cord blood transplantation after nonmyeloablative conditioning: impact on transplantation outcomes in 110 adults with hematologic disease. *Blood* 110, 3064–3070.
- Brunstein, C. G., Eapen, M., Ahn, K. W., Appelbaum, F. R., Ballen, K. K., Champlin, R. E., Cutler, C., Kan, F., Laughlin, M. J. & other authors. (2012). Reduced-intensity conditioning transplantation in acute leukemia: the effect of source of unrelated donor stem cells on outcomes. *Blood* 119, 5591–5598.
- Buchbinder, S., Elmaagacli, A. H., Schaefer, U. W. & Roggendorf, M. (2000). Human herpesvirus 6 is an important pathogen in infectious lung disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 26, 639–644.
- Buchwald, D., Cheney, P. R., Peterson, D. L., Henry, B., Wormsley, S. B., Geiger, A., Ablashi, D. V., Salahuddin, S. Z., Saxinger, C. & Biddle, R. (1992). A chronic illness characterized by fatigue, neurologic and immunologic disorders, and active human herpesvirus type 6 infection. *Ann Intern Med* 116, 103–113.

- Burd, E. M. & Carrigan, D. R. (1993). Human herpesvirus 6 (HHV-6)-associated dysfunction of blood monocytes. *Virus Res* 29, 79–90.
- Burd, E. M., Knox, K. K. & Carrigan, D. R. (1993). Human herpesvirus-6-associated suppression of growth factor-induced macrophage maturation in human bone marrow cultures. *Blood* 81, 1645–1650.
- Cacoub, P., Musette, P., Descamps, V., Meyer, O., Speirs, C., Finzi, L. & Roujeau, J. C. (2011). The DRESS syndrome: a literature review. *Am J Med* 124, 588–597.
- Caïola, D., Karras, A., Flandre, P., Boutolleau, D., Scieux, C., Agut, H., Legendre, C. & Gautheret-Dejean, A. (2012). Confirmation of the low clinical effect of human herpesvirus-6 and -7 infections after renal transplantation. *J Med Virol* 84, 450–456.
- Campadelli-Fiume, G., Guerrini, S., Liu, X. & Foà-Tomasi, L. (1993). Monoclonal antibodies to glycoprotein B differentiate human herpesvirus 6 into two clusters, variants A and B. *J Gen Virol* 74 ( Pt 10), 2257–2262.
- Camus, V., Bouwryn, J.-P., Chamseddine, A., Lenain, P., Ahtoy, P., Stamatoullas, A., Lanic, H., Lemasle, E., Contentin, N. & other authors. (2015). Human herpesvirus-6 acute limbic encephalitis after unrelated umbilical cord blood transplantation successfully treated with ganciclovir. *Bone Marrow Transplant*.
- Carrigan, D. R. & Knox, K. K. (1994). Human herpesvirus 6 (HHV-6) isolation from bone marrow: HHV-6-associated bone marrow suppression in bone marrow transplant patients. *Blood* 84, 3307–3310.
- Carrigan, D. R. & Knox, K. K. (1995). Bone marrow suppression by human herpesvirus-6: comparison of the A and B variants of the virus. *Blood* 86, 835–836.
- Carrigan, D. R., Drobyski, W. R., Russler, S. K., Tapper, M. A., Knox, K. K. & Ash, R. C. (1991). Interstitial pneumonitis associated with human herpesvirus-6 infection after marrow transplantation. *Lancet Lond Engl* 338, 147–149.
- Caruso, A., Rotola, A., Comar, M., Favilli, F., Galvan, M., Tosetti, M., Campello, C., Caselli, E., Alessandri, G. & other authors. (2002). HHV-6 infects human aortic and heart microvascular endothelial cells, increasing their ability to secrete proinflammatory chemokines. *J Med Virol* 67, 528–533.
- Caruso, A., Favilli, F., Rotola, A., Comar, M., Horejsh, D., Alessandri, G., Grassi, M., Di Luca, D. & Fiorentini, S. (2003). Human herpesvirus-6 modulates RANTES production in primary human endothelial cell cultures. *J Med Virol* 70, 451–458.
- Caselli, E., Boni, M., Bracci, A., Rotola, A., Cermelli, C., Castellazzi, M., Di Luca, D. & Cassai, E. (2002). Detection of antibodies directed against human herpesvirus 6 U94/REP in sera of patients affected by multiple sclerosis. *J Clin Microbiol* 40, 4131–4137.
- Caselli, E., Zatelli, M. C., Rizzo, R., Benedetti, S., Martorelli, D., Trasforini, G., Cassai, E., Uberti, E. C. degli, Di Luca, D. & Dolcetti, R. (2012). Virologic and immunologic evidence supporting an association between HHV-6 and Hashimoto’s thyroiditis. *PLoS Pathog* 8, e1002951.
- Caselli, E., Campioni, D., Cavazzini, F., Gentili, V., Bortolotti, D., Cuneo, A., Di Luca, D. & Rizzo, R. (2015). Acute human herpesvirus-6A infection of human mesothelial cells modulates HLA molecules. *Arch Virol*.
- Caserta, M. T., Hall, C. B., Schnabel, K., Lofthus, G. & McDermott, M. P. (2007). Human herpesvirus (HHV)-6 and HHV-7 infections in pregnant women. *J Infect Dis* 196, 1296–1303.
- Cattaneo, R. (2004). Four viruses, two bacteria, and one receptor: membrane cofactor protein (CD46) as pathogens’ magnet. *J Virol* 78, 4385–4388.
- Catusse, J., Spinks, J., Mattick, C., Dyer, A., Laing, K., Fitzsimons, C., Smit, M. J. & Gompels, U. A. (2008). Immunomodulation by herpesvirus U51A chemokine receptor via CCL5 and FOG-2 down-regulation plus XCR1 and CCR7 mimicry in human leukocytes. *Eur J Immunol* 38, 763–777.

- Catusse, J., Clark, D. J. & Gompels, U. A. (2009). CCR5 signalling, but not DARC or D6 regulatory, chemokine receptors are targeted by herpesvirus U83A chemokine which delays receptor internalisation via diversion to a caveolin-linked pathway. *J Inflamm Lond Engl* 6, 22.
- Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A. & Colonna, M. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 5, 919–923.
- Cermelli, C. & Jacobson, S. (2000). Viruses and multiple sclerosis. *Viral Immunol* 13, 255–267.
- Cermelli, C., Concarì, M., Carubbi, F., Fabio, G., Sabbatini, A. M., Pecorari, M., Pietrosevoli, P., Meacci, M., Guicciardi, E. & other authors. (1996). Growth of human herpesvirus 6 in HEPG2 cells. *Virus Res* 45, 75–85.
- Cermelli, C., Berti, R., Soldan, S. S., Mayne, M., D’ambrosia, J. M., Ludwin, S. K. & Jacobson, S. (2003). High frequency of human herpesvirus 6 DNA in multiple sclerosis plaques isolated by laser microdissection. *J Infect Dis* 187, 1377–1387.
- Challoner, P. B., Smith, K. T., Parker, J. D., MacLeod, D. L., Coulter, S. N., Rose, T. M., Schultz, E. R., Bennett, J. L., Garber, R. L. & Chang, M. (1995). Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7440–7444.
- Chang, C. K. & Balachandran, N. (1991). Identification, characterization, and sequence analysis of a cDNA encoding a phosphoprotein of human herpesvirus 6. *J Virol* 65, 2884–2894.
- Chan, P. K., Peiris, J. S., Yuen, K. Y., Liang, R. H., Lau, Y. L., Chen, F. E., Lo, S. K., Cheung, C. Y., Chan, T. K. & Ng, M. H. (1997). Human herpesvirus-6 and human herpesvirus-7 infections in bone marrow transplant recipients. *J Med Virol* 53, 295–305.
- Chan, P. K., Ng, H. K., Hui, M. & Cheng, A. F. (2001). Prevalence and distribution of human herpesvirus 6 variants A and B in adult human brain. *J Med Virol* 64, 42–46.
- Chaperot, L., Bendriss, N., Manches, O., Gressin, R., Maynadie, M., Trimoreau, F., Orfeuvre, H., Corront, B., Feuillard, J. & other authors. (2001). Identification of a leukemic counterpart of the plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 97, 3210–3217.
- Chaperot, L., Blum, A., Manches, O., Lui, G., Angel, J., Molens, J.-P. & Plumas, J. (2006). Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol Baltim Md* 1950 176, 248–255.
- Chen, M., Popescu, N., Woodworth, C., Berneman, Z., Corbellino, M., Lusso, P., Ablashi, D. V. & DiPaolo, J. A. (1994). Human herpesvirus 6 infects cervical epithelial cells and transactivates human papillomavirus gene expression. *J Virol* 68, 1173–1178.
- Chevallier, P., Hebia-Fellah, I., Planche, L., Guillaume, T., Bressolette-Bodin, C., Coste-Burel, M., Riolland, F., Mohty, M. & Imbert-Marcille, B.-M. (2010). Human herpes virus 6 infection is a hallmark of cord blood transplant in adults and may participate to delayed engraftment: a comparison with matched unrelated donors as stem cell source. *Bone Marrow Transplant* 45, 1204–1211.
- Chevallier, P., Robillard, N., Illiaquer, M., Esbelin, J., Mohty, M., Bodin-Bressollette, C., Guillaume, T., Stocco, V., Auffray, F. & other authors. (2013a). Characterization of various blood and graft sources: a prospective series. *Transfusion (Paris)* 53, 2020–2026.
- Chevallier, P., Robillard, N., Illiaquer, M., Esbelin, J., Mohty, M., Bodin-Bressollette, C., Guillaume, T., Stocco, V., Auffray, F. & other authors. (2013b). HHV-6 cell receptor CD46 expression on various cell subsets of six blood and graft sources: a prospective series. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol* 56, 331–335.
- Chevallier, P., Labopin, M., Socié, G., Tabrizi, R., Furst, S., Lioure, B., Guillaume, T., Delaunay, J., Peffault de la Tour, R. & other authors. (2014). Results from a clofarabine-busulfan containing reduced-toxicity conditioning regimen prior to allogeneic stem cell transplantation: the phase II prospective CLORIC trial. *Haematologica*.

- Chevret, L., Boutolleau, D., Halimi-Idri, N., Branchereau, S., Baujard, C., Fabre, M., Gautheret-Dejean, A. & Debray, D. (2008). Human herpesvirus-6 infection: a prospective study evaluating HHV-6 DNA levels in liver from children with acute liver failure. *J Med Virol* 80, 1051–1057.
- Ciancanelli, M. J., Huang, S. X. L., Luthra, P., Garner, H., Itan, Y., Volpi, S., Lafaille, F. G., Trouillet, C., Schmolke, M. & other authors. (2015). Infectious disease. Life-threatening influenza and impaired interferon amplification in human IRF7 deficiency. *Science* 348, 448–453.
- Cirone, M., Zompetta, C., Angeloni, A., Ablashi, D. V., Salahuddin, S. Z., Pavan, A., Torrisi, M. R., Frati, L. & Faggioni, A. (1992). Infection by human herpesvirus 6 (HHV-6) of human lymphoid T cells occurs through an endocytic pathway. *AIDS Res Hum Retroviruses* 8, 2031–2037.
- Cirone, M., Cuomo, L., Zompetta, C., Ruggieri, S., Frati, L., Faggioni, A. & Ragona, G. (2002). Human herpesvirus 6 and multiple sclerosis: a study of T cell cross-reactivity to viral and myelin basic protein antigens. *J Med Virol* 68, 268–272.
- Cisse, B., Caton, M. L., Lehner, M., Maeda, T., Scheu, S., Locksley, R., Holmberg, D., Zweier, C., Hollander, N. S. den & other authors. (2008). Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development. *Cell* 135, 37–48.
- Clark, D. A. (2000). Human herpesvirus 6. *Rev Med Virol* 10, 155–173.
- Clark, D. A., Freeland, M. L., Mackie, L. K., Jarrett, R. F. & Onions, D. E. (1993). Prevalence of antibody to human herpesvirus 7 by age. *J Infect Dis* 168, 251–252.
- Clark, D. J., Catusse, J., Stacey, A., Borrow, P. & Gompels, U. A. (2013). Activation of CCR2+ human proinflammatory monocytes by human herpesvirus-6B chemokine N-terminal peptide. *J Gen Virol* 94, 1624–1635.
- Clark, D. A., Nacheva, E. P., Leong, H. N., Brazma, D., Li, Y. T., Tsao, E. H. F., Buyck, H. C. E., Atkinson, C. E., Lawson, H. M. & other authors. (2006). Transmission of integrated human herpesvirus 6 through stem cell transplantation: implications for laboratory diagnosis. *J Infect Dis* 193, 912–916.
- Le Cleach, L., Joberty, C., Fillet, A. M., Sutton, L., Cordonnier, C., Francès, C., Agut, H. & Chosidow, O. (1998). Human herpesvirus 6 infection in patients with exanthema after allogeneic bone marrow transplantation. *Arch Dermatol* 134, 759–760.
- Cohen, G., Carter, S. L., Weinberg, K. I., Masinsin, B., Guinan, E., Kurtzberg, J., Wagner, J. E., Kernan, N. A. & Parkman, R. (2006). Antigen-specific T-lymphocyte function after cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 12, 1335–1342.
- Cole, P. D., Stiles, J., Boulad, F., Small, T. N., O'Reilly, R. J., George, D., Szabolcs, P., Kiehn, T. E. & Kernan, N. A. (1998). Successful treatment of human herpesvirus 6 encephalitis in a bone marrow transplant recipient. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 27, 653–654.
- Collandre, H., Aubin, J. T., Agut, H., Béchet, J. M. & Montagnier, L. (1991). Detection of HHV-6 by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 31, 171–179.
- Collot, S., Petit, B., Bordessoule, D., Alain, S., Touati, M., Denis, F. & Ranger-Rogez, S. (2002). Real-time PCR for quantification of human herpesvirus 6 DNA from lymph nodes and saliva. *J Clin Microbiol* 40, 2445–2451.
- Cone, R. W., Hackman, R. C., Huang, M. L., Bowden, R. A., Meyers, J. D., Metcalf, M., Zeh, J., Ashley, R. & Corey, L. (1993a). Human herpesvirus 6 in lung tissue from patients with pneumonitis after bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 329, 156–161.
- Cone, R. W., Huang, M. L., Ashley, R. & Corey, L. (1993b). Human herpesvirus 6 DNA in peripheral blood cells and saliva from immunocompetent individuals. *J Clin Microbiol* 31, 1262–1267.
- Cone, R. W., Huang, M. L., Corey, L., Zeh, J., Ashley, R. & Bowden, R. (1999). Human herpesvirus 6 infections after bone marrow transplantation: clinical and virologic manifestations. *J Infect Dis* 179, 311–318.

- Corre, E., Carmagnat, M., Busson, M., de Latour, R. P., Robin, M., Ribaud, P., Toubert, A., Rabian, C. & Socié, G. (2010). Long-term immune deficiency after allogeneic stem cell transplantation: B-cell deficiency is associated with late infections. *Haematologica* 95, 1025–1029.
- Croft, M. (2010). Control of immunity by the TNFR-related molecule OX40 (CD134). *Annu Rev Immunol* 28, 57–78.
- Crough, T. & Khanna, R. (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev* 22, 76–98, Table of Contents.
- Curtis, R. E., Travis, L. B., Rowlings, P. A., Socié, G., Kingma, D. W., Banks, P. M., Jaffe, E. S., Sale, G. E., Horowitz, M. M. & other authors. (1999). Risk of lymphoproliferative disorders after bone marrow transplantation: a multi-institutional study. *Blood* 94, 2208–2216.
- Dagna, L., Santoro, F. & Lusso, P. (2006). Biological Features of HHV-6. In *Hum Herpesvirus-6 2nd Ed, Perspectives in Medical Virology*, 2nd edn., pp. 59–75. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- Dagna, L., Pritchett, J. C. & Lusso, P. (2013). Immunomodulation and immunosuppression by human herpesvirus 6A and 6B. *Future Virol* 8, 273–287.
- Daibata, M., Taguchi, T., Nemoto, Y., Taguchi, H. & Miyoshi, I. (1999). Inheritance of chromosomally integrated human herpesvirus 6 DNA. *Blood* 94, 1545–1549.
- Danby, R. & Rocha, V. (2014). Improving engraftment and immune reconstitution in umbilical cord blood transplantation. *Front Immunol* 5, 68.
- Davidson, S., Crotta, S., McCabe, T. M. & Wack, A. (2014). Pathogenic potential of interferon  $\alpha\beta$  in acute influenza infection. *Nat Commun* 5, 3864.
- Denes, E., Magy, L., Pradeau, K., Alain, S., Weinbreck, P. & Ranger-Rogez, S. (2004). Successful treatment of human herpesvirus 6 encephalomyelitis in immunocompetent patient. *Emerg Infect Dis* 10, 729–731.
- Descamps, V., Bouscarat, F., Laglenne, S., Aslangul, E., Veber, B., Descamps, D., Saraux, J. L., Grange, M. J., Grossin, M. & other authors. (1997). Human herpesvirus 6 infection associated with anticonvulsant hypersensitivity syndrome and reactive haemophagocytic syndrome. *Br J Dermatol* 137, 605–608.
- DesJardin, J. A., Gibbons, L., Cho, E., Supran, S. E., Falagas, M. E., Werner, B. G. & Snyderman, D. R. (1998). Human herpesvirus 6 reactivation is associated with cytomegalovirus infection and syndromes in kidney transplant recipients at risk for primary cytomegalovirus infection. *J Infect Dis* 178, 1783–1786.
- DesJardin, J. A., Cho, E., Supran, S., Gibbons, L., Werner, B. G. & Snyderman, D. R. (2001). Association of human herpesvirus 6 reactivation with severe cytomegalovirus-associated disease in orthotopic liver transplant recipients. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 33, 1358–1362.
- Dewhurst, S., McIntyre, K., Schnabel, K. & Hall, C. B. (1993). Human herpesvirus 6 (HHV-6) variant B accounts for the majority of symptomatic primary HHV-6 infections in a population of U.S. infants. *J Clin Microbiol* 31, 416–418.
- Dewhurst, S. (2004). Human herpesvirus type 6 and human herpesvirus type 7 infections of the central nervous system. *Herpes J IHMF* 11 Suppl 2, 105A–111A.
- Dewin, D. R., Catusse, J. & Gompels, U. A. (2006). Identification and characterization of U83A viral chemokine, a broad and potent beta-chemokine agonist for human CCRs with unique selectivity and inhibition by spliced isoform. *J Immunol Baltim Md* 1950 176, 544–556.
- Dhepakson, P., Mori, Y., Jiang, Y. B., Huang, H. L., Akkapaiboon, P., Okuno, T. & Yamanishi, K. (2002). Human herpesvirus-6 rep/U94 gene product has single-stranded DNA-binding activity. *J Gen Virol* 83, 847–854.
- Dockrell, D. H. (2003). Human herpesvirus 6: molecular biology and clinical features. *J Med Microbiol* 52, 5–18.



- Dockrell, D. H., Mendez, J. C., Jones, M., Harmsen, W. S., Ilstrup, D. M., Smith, T. F., Wiesner, R. H., Krom, R. A. & Paya, C. V. (1999). Human herpesvirus 6 seronegativity before transplantation predicts the occurrence of fungal infection in liver transplant recipients. *Transplantation* 67, 399–403.
- Dominguez, G., Dambaugh, T. R., Stamey, F. R., Dewhurst, S., Inoue, N. & Pellett, P. E. (1999). Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A. *J Virol* 73, 8040–8052.
- Donati, D., Akhyani, N., Fogdell-Hahn, A., Cermelli, C., Cassiani-Ingoni, R., Vortmeyer, A., Heiss, J. D., Cogen, P., Gaillard, W. D. & other authors. (2003). Detection of human herpesvirus-6 in mesial temporal lobe epilepsy surgical brain resections. *Neurology* 61, 1405–1411.
- Downing, R. G., Sewankambo, N., Serwadda, D., Honess, R., Crawford, D., Jarrett, R. & Griffin, B. E. (1987). Isolation of human lymphotropic herpesviruses from Uganda. *Lancet* 2, 390.
- Drobyski, W. R., Eberle, M., Majewski, D. & Baxter-Lowe, L. A. (1993a). Prevalence of human herpesvirus 6 variant A and B infections in bone marrow transplant recipients as determined by polymerase chain reaction and sequence-specific oligonucleotide probe hybridization. *J Clin Microbiol* 31, 1515–1520.
- Drobyski, W. R., Dunne, W. M., Burd, E. M., Knox, K. K., Ash, R. C., Horowitz, M. M., Flomenberg, N. & Carrigan, D. R. (1993b). Human herpesvirus-6 (HHV-6) infection in allogeneic bone marrow transplant recipients: evidence of a marrow-suppressive role for HHV-6 in vivo. *J Infect Dis* 167, 735–739.
- Dropulic, L. K. & Jones, R. J. (2008). Polyomavirus BK infection in blood and marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 41, 11–18.
- Dulery, R., Salleron, J., Dewilde, A., Rossignol, J., Boyle, E. M., Gay, J., de Berranger, E., Coiteux, V., Jouet, J.-P. & other authors. (2012). Early human herpesvirus type 6 reactivation after allogeneic stem cell transplantation: a large-scale clinical study. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 18, 1080–1089.
- Dumas, P. Y., Ruggeri, A., Robin, M., Crotta, A., Abraham, J., Forcade, E., Bay, J. O., Michallet, M., Bertrand, Y. & other authors. (2013). Incidence and risk factors of EBV reactivation after unrelated cord blood transplantation: a Eurocord and Société Française de Greffe de Moelle-Thérapie Cellulaire collaborative study. *Bone Marrow Transplant* 48, 253–256.
- Endo, A., Watanabe, K., Ohye, T., Suzuki, K., Matsubara, T., Shimizu, N., Kurahashi, H., Yoshikawa, T., Katano, H. & other authors. (2014). Molecular and virological evidence of viral activation from chromosomally integrated human herpesvirus 6A in a patient with X-linked severe combined immunodeficiency. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 59, 545–548.
- Erard, V., Kim, H. W., Corey, L., Limaye, A., Huang, M.-L., Myerson, D., Davis, C. & Boeckh, M. (2005). BK DNA viral load in plasma: evidence for an association with hemorrhagic cystitis in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *Blood* 106, 1130–1132.
- Escher, F., Kühn, U., Gross, U., Westermann, D., Poller, W., Tschöpe, C., Lassner, D. & Schultheiss, H.-P. (2015). Aggravation of left ventricular dysfunction in patients with biopsy-proven cardiac human herpesvirus A and B infection. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol* 63, 1–5.
- van Esser, J. W. J., Niesters, H. G. M., van der Holt, B., Meijer, E., Osterhaus, A. D. M. E., Gratama, J. W., Verdonck, L. F., Löwenberg, B. & Cornelissen, J. J. (2002). Prevention of Epstein-Barr virus-lymphoproliferative disease by molecular monitoring and preemptive rituximab in high-risk patients after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 99, 4364–4369.
- Fiola, S., Gosselin, D., Takada, K. & Gosselin, J. (2010). TLR9 contributes to the recognition of EBV by primary monocytes and plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 185, 3620–3631.
- Flamand, L., Gosselin, J., D’Addario, M., Hiscott, J., Ablashi, D. V., Gallo, R. C. & Menezes, J. (1991). Human herpesvirus 6 induces interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha, but not interleukin-6, in peripheral blood mononuclear cell cultures. *J Virol* 65, 5105–5110.

- Flamand, L., Gosselin, J., Stefanescu, I., Ablashi, D. & Menezes, J. (1995). Immunosuppressive effect of human herpesvirus 6 on T-cell functions: suppression of interleukin-2 synthesis and cell proliferation. *Blood* 85, 1263–1271.
- Flamand, L., Stefanescu, I. & Menezes, J. (1996). Human herpesvirus-6 enhances natural killer cell cytotoxicity via IL-15. *J Clin Invest* 97, 1373–1381.
- Flamand, L., Romerio, F., Reitz, M. S. & Gallo, R. C. (1998). CD4 promoter transactivation by human herpesvirus 6. *J Virol* 72, 8797–8805.
- Flamand, L., Komaroff, A. L., Arbuckle, J. H., Medveczky, P. G. & Ablashi, D. V. (2010). Review, part 1: Human herpesvirus-6-basic biology, diagnostic testing, and antiviral efficacy. *J Med Virol* 82, 1560–1568.
- Foà-Tomasi, L., Guerrini, S., Huang, T. & Campadelli-Fiume, G. (1992). Characterization of human herpesvirus-6(U1102) and (GS) gp112 and identification of the Z29-specified homolog. *Virology* 191, 511–516.
- Foà-Tomasi, L., Fiorilli, M. P., Avitabile, E. & Campadelli-Fiume, G. (1996). Identification of an 85 kDa phosphoprotein as an immunodominant protein specific for human herpesvirus 7-infected cells. *J Gen Virol* 77 ( Pt 3), 511–518.
- Fox, J. D., Briggs, M., Ward, P. A. & Tedder, R. S. (1990). Human herpesvirus 6 in salivary glands. *Lancet* 336, 590–593.
- French, C., Menegazzi, P., Nicholson, L., Macaulay, H., DiLuca, D. & Gompels, U. A. (1999). Novel, nonconsensus cellular splicing regulates expression of a gene encoding a chemokine-like protein that shows high variation and is specific for human herpesvirus 6. *Virology* 262, 139–151.
- Frenkel, N., Schirmer, E. C., Wyatt, L. S., Katsafanas, G., Roffman, E., Danovich, R. M. & June, C. H. (1990). Isolation of a new herpesvirus from human CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 748–752.
- Galièni, P., Moschetti, D., Donati, D., Tozzi, M., Valensin, P. E. & Lauria, F. (2001). Long-term follow-up of human herpes virus 6 infection in autologous bone marrow transplant recipients. *Haematologica* 86, 782–783.
- Gärtner, B. C., Schäfer, H., Marggraff, K., Eisele, G., Schäfer, M., Dilloo, D., Roemer, K., Laws, H.-J., Sester, M. & other authors. (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, 351–358.
- Gautheret-Dejean, A., Dejean, O., Vastel, L., Kerboull, M., Aubin, J. T., Franti, M. & Agut, H. (2000). Human herpesvirus-6 and human herpesvirus-7 in the bone marrow from healthy subjects. *Transplantation* 69, 1722–1723.
- Gautheret-Dejean, A., Manichanh, C., Thien-Ah-Koon, F., Fillet, A.-M., Mangeney, N., Vidaud, M., Dhedin, N., Vernant, J.-P. & Agut, H. (2002). Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of human herpesvirus-6 infection and application to bone marrow transplant patients. *J Virol Methods* 100, 27–35.
- Gaziev, J., Paba, P., Miano, R., Germani, S., Sodani, P., Bove, P., Perno, C. F., Marziali, M., Gallucci, C. & other authors. (2010). Late-onset hemorrhagic cystitis in children after hematopoietic stem cell transplantation for thalassemia and sickle cell anemia: a prospective evaluation of polyoma (BK) virus infection and treatment with cidofovir. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 16, 662–671.
- Geijtenbeek, T. B., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Adema, G. J., van Kooyk, Y. & Figdor, C. G. (2000a). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100, 575–585.
- Geijtenbeek, T. B., Kwon, D. S., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Middel, J., Cornelissen, I. L., Nottet, H. S., KewalRamani, V. N. & other authors. (2000b). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100, 587–597.

- Gerdemann, U., Keukens, L., Keirnan, J. M., Katari, U. L., Nguyen, C. T. Q., de Pagter, A. P., Ramos, C. A., Kennedy-Nasser, A., Gottschalk, S. M. & other authors. (2012a). Immunotherapeutic strategies to prevent and treat human herpes virus (HHV) 6 reactivation post allogeneic stem cell transplant. *Blood*.
- Gerdemann, U., Keirnan, J. M., Katari, U. L., Yanagisawa, R., Christin, A. S., Huye, L. E., Perna, S. K., Ennamuri, S., Gottschalk, S. & other authors. (2012b). Rapidly Generated Multivirus-specific Cytotoxic T Lymphocytes for the Prophylaxis and Treatment of Viral Infections. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* 20, 1622–1632.
- Gilliet, M., Cao, W. & Liu, Y.-J. (2008). Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 8, 594–606.
- Glosson, N. L. & Hudson, A. W. (2007). Human herpesvirus-6A and -6B encode viral immunoevasins that downregulate class I MHC molecules. *Virology* 365, 125–135.
- Glucksberg, H., Storb, R., Fefer, A., Buckner, C. D., Neiman, P. E., Clift, R. A., Lerner, K. G. & Thomas, E. D. (1974). Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* 18, 295–304.
- Godet, A. N., Soignon, G., Koubi, H., Bonnafous, P., Agut, H., Poirot, C. & Gautheret-Dejean, A. (2015). Presence of HHV-6 genome in spermatozoa in a context of couples with low fertility: what type of infection? *Andrologia* 47, 531–535.
- Gompels, U. A. & Macaulay, H. A. (1995). Characterization of human telomeric repeat sequences from human herpesvirus 6 and relationship to replication. *J Gen Virol* 76 ( Pt 2), 451–458.
- Gompels, U. A., Nicholas, J., Lawrence, G., Jones, M., Thomson, B. J., Martin, M. E., Efstathiou, S., Craxton, M. & Macaulay, H. A. (1995). The DNA sequence of human herpesvirus-6: structure, coding content, and genome evolution. *Virology* 209, 29–51.
- Gorelik, L., Gilbride, K., Dobles, M., Kalled, S. L., Zandman, D. & Scott, M. L. (2003). Normal B cell homeostasis requires B cell activation factor production by radiation-resistant cells. *J Exp Med* 198, 937–945.
- Go, T. & Nakamura, K. (2002). Frequent seizures with elevated interleukin-6 at the eruptive stage of exanthema subitum. *Eur J Paediatr Neurol EJPN Off J Eur Paediatr Neurol Soc* 6, 221–223.
- Gravel, A., Hall, C. B. & Flamand, L. (2013). Sequence analysis of transplacentally acquired human herpesvirus 6 DNA is consistent with transmission of a chromosomally integrated reactivated virus. *J Infect Dis* 207, 1585–1589.
- Griffiths, P. D., Ait-Khaled, M., Bearcroft, C. P., Clark, D. A., Quaglia, A., Davies, S. E., Burroughs, A. K., Rolles, K., Kidd, I. M. & other authors. (1999). Human herpesviruses 6 and 7 as potential pathogens after liver transplant: prospective comparison with the effect of cytomegalovirus. *J Med Virol* 59, 496–501.
- Grivel, J. C., Ito, Y., Fagà, G., Santoro, F., Shaheen, F., Malnati, M. S., Fitzgerald, W., Lusso, P. & Margolis, L. (2001). Suppression of CCR5- but not CXCR4-tropic HIV-1 in lymphoid tissue by human herpesvirus 6. *Nat Med* 7, 1232–1235.
- Grivel, J.-C., Santoro, F., Chen, S., Fagà, G., Malnati, M. S., Ito, Y., Margolis, L. & Lusso, P. (2003). Pathogenic effects of human herpesvirus 6 in human lymphoid tissue ex vivo. *J Virol* 77, 8280–8289.
- Grouard, G., Risoan, M. C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J. & Liu, Y. J. (1997). The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 185, 1101–1111.
- Gustafsson, R. K. L., Engdahl, E. E., Hammarfjord, O., Adikari, S. B., Lourda, M., Klingström, J., Svensson, M. & Fogdell-Hahn, A. (2013). Human Herpesvirus 6A Partially Suppresses Functional Properties of DC without Viral Replication. *PLoS One* 8, e58122.

- Hakacova, N., Klingel, K., Kandolf, R., Engdahl, E., Fogdell-Hahn, A. & Higgins, T. (2013). First therapeutic use of Artesunate in treatment of human herpesvirus 6B myocarditis in a child. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol* 57, 157–160.
- Hall, C. B., Caserta, M. T., Schnabel, K. C., Boettrich, C., McDermott, M. P., Lofthus, G. K., Carnahan, J. A. & Dewhurst, S. (2004). Congenital infections with human herpesvirus 6 (HHV6) and human herpesvirus 7 (HHV7). *J Pediatr* 145, 472–477.
- Hall, C. B., Caserta, M. T., Schnabel, K. C., McDermott, M. P., Lofthus, G. K., Carnahan, J. A., Gilbert, L. M. & Dewhurst, S. (2006). Characteristics and acquisition of human herpesvirus (HHV) 7 infections in relation to infection with HHV-6. *J Infect Dis* 193, 1063–1069.
- Hall, C. B., Caserta, M. T., Schnabel, K., Shelley, L. M., Marino, A. S., Carnahan, J. A., Yoo, C., Lofthus, G. K. & McDermott, M. P. (2008). Chromosomal integration of human herpesvirus 6 is the major mode of congenital human herpesvirus 6 infection. *Pediatrics* 122, 513–520.
- Hall, C. B., Long, C. E., Schnabel, K. C., Caserta, M. T., McIntyre, K. M., Costanzo, M. A., Knott, A., Dewhurst, S., Insel, R. A. & Epstein, L. G. (1994). Human herpesvirus-6 infection in children. A prospective study of complications and reactivation. *N Engl J Med* 331, 432–438.
- Harberts, E., Yao, K., Wohler, J. E., Maric, D., Ohayon, J., Henkin, R. & Jacobson, S. (2011). Human herpesvirus-6 entry into the central nervous system through the olfactory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 13734–13739.
- Härmä, M., Höckerstedt, K. & Lautenschlager, I. (2003). Human herpesvirus-6 and acute liver failure. *Transplantation* 76, 536–539.
- Hasegawa, H., Utsunomiya, Y., Yasukawa, M., Yanagisawa, K. & Fujita, S. (1994). Induction of G protein-coupled peptide receptor EB1 1 by human herpesvirus 6 and 7 infection in CD4+ T cells. *J Virol* 68, 5326–5329.
- Heim, A., Ebnet, C., Harste, G. & Pring-Akerblom, P. (2003). Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. *J Med Virol* 70, 228–239.
- He, J., McCarthy, M., Zhou, Y., Chandran, B. & Wood, C. (1996). Infection of primary human fetal astrocytes by human herpesvirus 6. *J Virol* 70, 1296–1300.
- Hentrich, M., Oruzio, D., Jäger, G., Schlemmer, M., Schleuning, M., Schiel, X., Hiddemann, W. & Kolb, H.-J. (2005). Impact of human herpesvirus-6 after haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 128, 66–72.
- Herbein, G., Strasswimmer, J., Altieri, M., Woehl-Jaegle, M. L., Wolf, P. & Obert, G. (1996). Longitudinal study of human herpesvirus 6 infection in organ transplant recipients. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 22, 171–173.
- Hiemenz, J. W. (2009). Management of infections complicating allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Semin Hematol* 46, 289–312.
- Hill, J. A., Koo, S., Guzman Suarez, B. B., Ho, V. T., Cutler, C., Koreth, J., Armand, P., Alyea, E. P., 3rd, Baden, L. R. & other authors. (2012). Cord-Blood Hematopoietic Stem Cell Transplant Confers an Increased Risk for Human Herpesvirus-6-Associated Acute Limbic Encephalitis: A Cohort Analysis. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*.
- Hirata, Y., Kondo, K. & Yamanishi, K. (2001). Human herpesvirus 6 downregulates major histocompatibility complex class I in dendritic cells. *J Med Virol* 65, 576–583.
- Hon, G. M., Erasmus, R. T. & Matsha, T. (2014). Low prevalence of human herpesvirus-6 and varicella zoster virus in blood of multiple sclerosis patients, irrespective of inflammatory status or disease progression. *J Clin Neurosci Off J Neurosurg Soc Australas* 21, 1437–1440.
- Hoshino, Y., Kimura, H., Tanaka, N., Tsuge, I., Kudo, K., Horibe, K., Kato, K., Matsuyama, T., Kikuta, A. & other authors. (2001). Prospective monitoring of the Epstein-Barr virus DNA by a real-time quantitative polymerase chain reaction after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 115, 105–111.

- Howell, K. B., Tiedemann, K., Haeusler, G., Mackay, M. T., Kornberg, A. J., Freeman, J. L. & Harvey, A. S. (2012). Symptomatic generalized epilepsy after HHV6 posttransplant acute limbic encephalitis in children. *Epilepsia* 53, e122–126.
- Huang, L. M., Lee, C. Y., Lin, K. H., Chuu, W. M., Lee, P. I., Chen, R. L., Chen, J. M. & Lin, D. T. (1990). Human herpesvirus-6 associated with fatal haemophagocytic syndrome. *Lancet Lond Engl* 336, 60–61.
- Huang, L. M., Kuo, P. F., Lee, C. Y., Chen, J. Y., Liu, M. Y. & Yang, C. S. (1992). Detection of human herpesvirus-6 DNA by polymerase chain reaction in serum or plasma. *J Med Virol* 38, 7–10.
- Hubacek, P., Maalouf, J., Zajickova, M., Kouba, M., Cinek, O., Hyncicova, K., Fales, I. & Cetkovsky, P. (2007). Failure of multiple antivirals to affect high HHV-6 DNAemia resulting from viral chromosomal integration in case of severe aplastic anaemia. *Haematologica* 92, e98–e100.
- Hubacek, P., Virgili, A., Ward, K. N., Pohlreich, D., Keslova, P., Goldova, B., Markova, M., Zajac, M., Cinek, O. & other authors. (2009). HHV-6 DNA throughout the tissues of two stem cell transplant patients with chromosomally integrated HHV-6 and fatal CMV pneumonitis. *Br J Haematol* 145, 394–398.
- Huch, J. H., Cunningham, A. L., Arvin, A. M., Nasr, N., Santegoets, S. J. A. M., Slobedman, E., Slobedman, B. & Abendroth, A. (2010). Impact of Varicella-Zoster Virus on Dendritic Cell Subsets in Human Skin during Natural Infection. *J Virol* 84, 4060–4072.
- Humar, A., Kumar, D., Caliendo, A. M., Moussa, G., Ashi-Sulaiman, A., Levy, G. & Mazzulli, T. (2002). Clinical impact of human herpesvirus 6 infection after liver transplantation. *Transplantation* 73, 599–604.
- Iampietro, M., Morissette, G., Gravel, A., Dubuc, I., Rousseau, M., Hasan, A., O'Reilly, R. J. & Flamand, L. (2014a). Human herpesvirus 6B immediate-early I protein contains functional HLA-A\*02, HLA-A\*03, and HLA-B\*07 class I restricted CD8(+) T-cell epitopes. *Eur J Immunol* 44, 3573–3584.
- Iampietro, M., Morissette, G., Gravel, A. & Flamand, L. (2014b). Inhibition of Interleukin-2 Gene Expression by Human Herpesvirus 6B U54 Tegument Protein. *J Virol*.
- Illiaquer, M., Malard, F., Guillaume, T., Imbert-Marcille, B.-M., Delaunay, J., Le Bourgeois, A., Rimbert, M., Bressollette-Bodin, C., Precupanu, C. & other authors. (2014). Long-lasting HHV-6 reactivation in long-term adult survivors after double umbilical cord blood allogeneic stem cell transplantation. *J Infect Dis* 210, 567–570.
- Imbert-Marcille, B. M., Tang, X. W., Lepelletier, D., Besse, B., Moreau, P., Billaudel, S. & Milpied, N. (2000). Human herpesvirus 6 infection after autologous or allogeneic stem cell transplantation: a single-center prospective longitudinal study of 92 patients. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 31, 881–886.
- Inagi, R., Guntapong, R., Nakao, M., Ishino, Y., Kawanishi, K., Isegawa, Y. & Yamanishi, K. (1996). Human herpesvirus 6 induces IL-8 gene expression in human hepatoma cell line, Hep G2. *J Med Virol* 49, 34–40.
- Irving, W. L. & Cunningham, A. L. (1990). Serological diagnosis of infection with human herpesvirus type 6. *BMJ* 300, 156–159.
- Isaacson, E., Glaser, C. A., Forghani, B., Amad, Z., Wallace, M., Armstrong, R. W., Exner, M. M. & Schmid, S. (2005). Evidence of human herpesvirus 6 infection in 4 immunocompetent patients with encephalitis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 40, 890–893.
- Isegawa, Y., Ping, Z., Nakano, K., Sugimoto, N. & Yamanishi, K. (1998). Human herpesvirus 6 open reading frame U12 encodes a functional beta-chemokine receptor. *J Virol* 72, 6104–6112.
- Isegawa, Y., Mukai, T., Nakano, K., Kagawa, M., Chen, J., Mori, Y., Sunagawa, T., Kawanishi, K., Sashihara, J. & other authors. (1999). Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B. *J Virol* 73, 8053–8063.
- Ishii, N., Takahashi, T., Soroosh, P. & Sugamura, K. (2010). OX40-OX40 ligand interaction in T-cell-mediated immunity and immunopathology. *Adv Immunol* 105, 63–98.

- Ishikawa, K., Hasegawa, K., Naritomi, T., Kanai, N., Ogawa, M., Kato, Y., Kobayashi, M., Torii, N. & Hayashi, N. (2002). Prevalence of herpesviridae and hepatitis virus sequences in the livers of patients with fulminant hepatitis of unknown etiology in Japan. *J Gastroenterol* 37, 523–530.
- Ishiyama, K., Katagiri, T., Hoshino, T., Yoshida, T., Yamaguchi, M. & Nakao, S. (2011). Preemptive therapy of human herpesvirus-6 encephalitis with foscarnet sodium for high-risk patients after hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 46, 863–869.
- Isomura, H., Yamada, M., Yoshida, M., Tanaka, H., Kitamura, T., Oda, M., Nii, S. & Seino, Y. (1997). Suppressive effects of human herpesvirus 6 on in vitro colony formation of hematopoietic progenitor cells. *J Med Virol* 52, 406–412.
- Isomura, H., Yoshida, M., Namba, H., Fujiwara, N., Ohuchi, R., Uno, F., Oda, M., Seino, Y. & Yamada, M. (2000). Suppressive effects of human herpesvirus-6 on thrombopoietin-inducible megakaryocytic colony formation in vitro. *J Gen Virol* 81, 663–673.
- Isomura, H., Yoshida, M., Namba, H. & Yamada, M. (2003). Interaction of human herpesvirus 6 with human CD34 positive cells. *J Med Virol* 70, 444–450.
- Jacobson, C. A., Turki, A. T., McDonough, S. M., Stevenson, K. E., Kim, H. T., Kao, G., Herrera, M. L., Reynolds, C. G., Alyea, E. P. & other authors. (2012). Immune reconstitution after double umbilical cord blood stem cell transplantation: comparison with unrelated peripheral blood stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 18, 565–574.
- Janelle, M.-E. & Flamand, L. (2006). Phenotypic alterations and survival of monocytes following infection by human herpesvirus-6. *Arch Virol* 151, 1603–1614.
- Jarrett, R. F., Clark, D. A., Josephs, S. F. & Onions, D. E. (1990). Detection of human herpesvirus-6 DNA in peripheral blood and saliva. *J Med Virol* 32, 73–76.
- Jaworska, J., Gravel, A., Fink, K., Grandvaux, N. & Flamand, L. (2007). Inhibition of transcription of the beta interferon gene by the human herpesvirus 6 immediate-early 1 protein. *J Virol* 81, 5737–5748.
- Jaworska, J., Gravel, A. & Flamand, L. (2010). Divergent susceptibilities of human herpesvirus 6 variants to type I interferons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 8369–8374.
- Jeulin, H., Salmon, A., Gautheret-Dejean, A., Agut, H., Bordigoni, P., Fortier, B. & Venard, V. (2009). Contribution of human herpesvirus 6 (HHV-6) viral load in whole blood and serum to investigate integrated HHV-6 transmission after haematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol* 45, 43–46.
- Jeulin, H., Agrinier, N., Guery, M., Salmon, A., Clément, L., Bordigoni, P. & Venard, V. (2013). Human herpesvirus 6 infection after allogeneic stem cell transplantation: incidence, outcome, and factors associated with HHV-6 reactivation. *Transplantation* 95, 1292–1298.
- Johnston, R. E., Geretti, A. M., Prentice, H. G., Clark, A. D., Wheeler, A. C., Potter, M. & Griffiths, P. D. (1999). HHV-6-related secondary graft failure following allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 105, 1041–1043.
- Josephs, S. F., Salahuddin, S. Z., Ablashi, D. V., Schachter, F., Wong-Staal, F. & Gallo, R. C. (1986). Genomic analysis of the human B-lymphotropic virus (HBLV). *Science* 234, 601–603.
- Kadokia, M. P., Rybka, W. B., Stewart, J. A., Patton, J. L., Stamey, F. R., Elsayy, M., Pellett, P. E. & Armstrong, J. A. (1996). Human herpesvirus 6: infection and disease following autologous and allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 87, 5341–5354.
- Kadowaki, N., Antonenko, S., Lau, J. Y. & Liu, Y. J. (2000). Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 192, 219–226.
- Kakimoto, M., Hasegawa, A., Fujita, S. & Yasukawa, M. (2002). Phenotypic and functional alterations of dendritic cells induced by human herpesvirus 6 infection. *J Virol* 76, 10338–10345.

- Kanda, J., Chiou, L.-W., Szabolcs, P., Sempowski, G. D., Rizzieri, D. A., Long, G. D., Sullivan, K. M., Gasparetto, C., Chute, J. P. & other authors. (2012). Immune recovery in adult patients after myeloablative dual umbilical cord blood, matched sibling, and matched unrelated donor hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 18, 1664–1676.e1.
- Kikuta, H., Nakane, A., Lu, H., Taguchi, Y., Minagawa, T. & Matsumoto, S. (1990). Interferon induction by human herpesvirus 6 in human mononuclear cells. *J Infect Dis* 162, 35–38.
- Knox, K. K. & Carrigan, D. R. (1992). In vitro suppression of bone marrow progenitor cell differentiation by human herpesvirus 6 infection. *J Infect Dis* 165, 925–929.
- Knox, K. K. & Carrigan, D. R. (1996). Chronic myelosuppression associated with persistent bone marrow infection due to human herpesvirus 6 in a bone marrow transplant recipient. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 22, 174–175.
- Komanduri, K. V., St John, L. S., de Lima, M., McMannis, J., Rosinski, S., McNiece, I., Bryan, S. G., Kaur, I., Martin, S. & other authors. (2007). Delayed immune reconstitution after cord blood transplantation is characterized by impaired thymopoiesis and late memory T-cell skewing. *Blood* 110, 4543–4551.
- Kondo, K., Kondo, T., Okuno, T., Takahashi, M. & Yamanishi, K. (1991). Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. *J Gen Virol* 72 ( Pt 6), 1401–1408.
- Kondo, K., Nagafuji, H., Hata, A., Tomomori, C. & Yamanishi, K. (1993). Association of human herpesvirus 6 infection of the central nervous system with recurrence of febrile convulsions. *J Infect Dis* 167, 1197–1200.
- Kondo, K., Shimada, K., Sashihara, J., Tanaka-Taya, K. & Yamanishi, K. (2002a). Identification of human herpesvirus 6 latency-associated transcripts. *J Virol* 76, 4145–4151.
- Kondo, K., Kondo, T., Shimada, K., Amo, K., Miyagawa, H. & Yamanishi, K. (2002b). Strong interaction between human herpesvirus 6 and peripheral blood monocytes/macrophages during acute infection. *J Med Virol* 67, 364–369.
- Kondo, K., Sashihara, J., Shimada, K., Takemoto, M., Amo, K., Miyagawa, H. & Yamanishi, K. (2003). Recognition of a novel stage of betaherpesvirus latency in human herpesvirus 6. *J Virol* 77, 2258–2264.
- Krueger, G. R. & Schneider, B. (2006). Pathologic Features of HHV-6 Disease. In *Hum Herpesvirus-6 2nd Ed, Perspectives in Medical Virology*, 2nd edn., pp. 133–148. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- Kusuhara, K., Takabayashi, A., Ueda, K., Hidaka, Y., Minamishima, I., Take, H., Fujioka, K., Imai, S. & Osato, T. (1997). Breast milk is not a significant source for early Epstein-Barr virus or human herpesvirus 6 infection in infants: a seroepidemiologic study in 2 endemic areas of human T-cell lymphotropic virus type I in Japan. *Microbiol Immunol* 41, 309–312.
- Lacroix, A., Jaccard, A., Rouzioux, C., Pigué, C., Petit, B., Bordessoule, D. & Ranger-Rogez, S. (2007). HHV-6 and EBV DNA quantitation in lymph nodes of 86 patients with Hodgkin's lymphoma. *J Med Virol* 79, 1349–1356.
- Lacroix, A., Collot-Teixeira, S., Mardivirin, L., Jaccard, A., Petit, B., Pigué, C., Sturtz, F., Preux, P.-M., Bordessoule, D. & Ranger-Rogez, S. (2010). Involvement of human herpesvirus-6 variant B in classic Hodgkin's lymphoma via DR7 oncoprotein. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 16, 4711–4721.
- Laskin, B. L., Denburg, M., Furth, S., Diorio, D., Goebel, J., Davies, S. M. & Jodele, S. (2013). BK viremia precedes hemorrhagic cystitis in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*.
- Laughlin, M. J., Eapen, M., Rubinstein, P., Wagner, J. E., Zhang, M.-J., Champlin, R. E., Stevens, C., Barker, J. N., Gale, R. P. & other authors. (2004). Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med* 351, 2265–2275.

- Lautenschlager, I., Lappalainen, M., Linnavuori, K., Suni, J. & Höckerstedt, K. (2002). CMV infection is usually associated with concurrent HHV-6 and HHV-7 antigenemia in liver transplant patients. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol* 25 Suppl 2, S57–61.
- Lautenschlager, I. & Razonable, R. R. (2012). Human herpesvirus-6 infections in kidney, liver, lung, and heart transplantation: review. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant* 25, 493–502.
- Leen, A. M., Bollard, C. M., Mendizabal, A. M., Shpall, E. J., Szabolcs, P., Antin, J. H., Kapoor, N., Pai, S.-Y., Rowley, S. D. & other authors. (2013). Multicenter study of banked third-party virus-specific T cells to treat severe viral infections after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 121, 5113–5123.
- Leibovitch, E., Wohler, J. E., Cummings Macri, S. M., Motanic, K., Harberts, E., Gaitán, M. I., Maggi, P., Ellis, M., Westmoreland, S. & other authors. (2013). Novel Marmoset (*Callithrix jacchus*) Model of Human Herpesvirus 6A and 6B Infections: Immunologic, Virologic and Radiologic Characterization. *PLoS Pathog* 9, e1003138.
- Leibovitch, E. C. & Jacobson, S. (2014). Evidence linking HHV-6 with multiple sclerosis: an update. *Curr Opin Virol* 9, 127–133.
- Leveque, N., Boulagnon, C., Brasselet, C., Lesaffre, F., Boutolleau, D., Metz, D., Fornes, P. & Andreoletti, L. (2011). A fatal case of Human Herpesvirus 6 chronic myocarditis in an immunocompetent adult. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*.
- Li, C., Goodrich, J. M. & Yang, X. (1997). Interferon-gamma (IFN-gamma) regulates production of IL-10 and IL-12 in human herpesvirus-6 (HHV-6)-infected monocyte/macrophage lineage. *Clin Exp Immunol* 109, 421–425.
- Liedtke, W., Malessa, R., Faustmann, P. M. & Eis-Hübinger, A. M. (1995). Human herpesvirus 6 polymerase chain reaction findings in human immunodeficiency virus associated neurological disease and multiple sclerosis. *J Neurovirol* 1, 253–258.
- Li, L., Gu, B., Zhou, F., Chi, J., Wang, F., Peng, G., Xie, F., Qing, J., Feng, D. & other authors. (2011). Human herpesvirus 6 suppresses T cell proliferation through induction of cell cycle arrest in infected cells in the G2/M phase. *J Virol* 85, 6774–6783.
- Linden, R. M., Ward, P., Giraud, C., Winocour, E. & Berns, K. I. (1996). Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11288–11294.
- Liu, Y.-J. (2005). IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 23, 275–306.
- Ljungman, P., Wang, F. Z., Clark, D. A., Emery, V. C., Remberger, M., Ringdén, O. & Linde, A. (2000). High levels of human herpesvirus 6 DNA in peripheral blood leucocytes are correlated to platelet engraftment and disease in allogeneic stem cell transplant patients. *Br J Haematol* 111, 774–781.
- Ljungman, P., de la Camara, R., Cordonnier, C., Einsele, H., Engelhard, D., Reusser, P., Styczynski, J., Ward, K. & European Conference on Infections in Leukemia. (2008). Management of CMV, HHV-6, HHV-7 and Kaposi-sarcoma herpesvirus (HHV-8) infections in patients with hematological malignancies and after SCT. *Bone Marrow Transplant* 42, 227–240.
- Ljungman, P., Hakki, M. & Boeckh, M. (2011). Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Hematol Oncol Clin North Am* 25, 151–169.
- Locatelli, G., Santoro, F., Veglia, F., Gobbi, A., Lusso, P. & Malnati, M. S. (2000). Real-time quantitative PCR for human herpesvirus 6 DNA. *J Clin Microbiol* 38, 4042–4048.
- Lopez, C., Pellett, P., Stewart, J., Goldsmith, C., Sanderlin, K., Black, J., Warfield, D. & Feorino, P. (1988). Characteristics of human herpesvirus-6. *J Infect Dis* 157, 1271–1273.
- Luka, J., Okano, M. & Thiele, G. (1990). Isolation of human herpesvirus-6 from clinical specimens using human fibroblast cultures. *J Clin Lab Anal* 4, 483–486.



- Luppi, M., Marasca, R., Barozzi, P., Ferrari, S., Ceccherini-Nelli, L., Batoni, G., Merelli, E. & Torelli, G. (1993). Three cases of human herpesvirus-6 latent infection: integration of viral genome in peripheral blood mononuclear cell DNA. *J Med Virol* 40, 44–52.
- Luppi, M., Barozzi, P., Maiorana, A., Marasca, R. & Torelli, G. (1994a). Human herpesvirus 6 infection in normal human brain tissue. *J Infect Dis* 169, 943–944.
- Luppi, M., Barozzi, P., Marasca, R. & Torelli, G. (1994b). Integration of human herpesvirus-6 (HHV-6) genome in chromosome 17 in two lymphoma patients. *Leukemia* 8 Suppl 1, S41–45.
- Luppi, M., Barozzi, P., Maiorana, A., Marasca, R., Trovato, R., Fano, R., Ceccherini-Nelli, L. & Torelli, G. (1995). Human herpesvirus-6: a survey of presence and distribution of genomic sequences in normal brain and neuroglial tumors. *J Med Virol* 47, 105–111.
- Luppi, M., Barozzi, P., Morris, C., Maiorana, A., Garber, R., Bonacorsi, G., Donelli, A., Marasca, R., Tabilio, A. & Torelli, G. (1999). Human herpesvirus 6 latently infects early bone marrow progenitors in vivo. *J Virol* 73, 754–759.
- Lusso, P., Markham, P. D., Tschachler, E., di Marzo Veronese, F., Salahuddin, S. Z., Ablashi, D. V., Pahwa, S., Krohn, K. & Gallo, R. C. (1988). In vitro cellular tropism of human B-lymphotropic virus (human herpesvirus-6). *J Exp Med* 167, 1659–1670.
- Lusso, P., Ensoli, B., Markham, P. D., Ablashi, D. V., Salahuddin, S. Z., Tschachler, E., Wong-Staal, F. & Gallo, R. C. (1989). Productive dual infection of human CD4+ T lymphocytes by HIV-1 and HHV-6. *Nature* 337, 370–373.
- Lusso, P., Malnati, M., De Maria, A., Balotta, C., DeRocco, S. E., Markham, P. D. & Gallo, R. C. (1991a). Productive infection of CD4+ and CD8+ mature human T cell populations and clones by human herpesvirus 6. Transcriptional down-regulation of CD3. *J Immunol Baltim Md* 150 147, 685–691.
- Lusso, P., De Maria, A., Malnati, M., Lori, F., DeRocco, S. E., Baseler, M. & Gallo, R. C. (1991b). Induction of CD4 and susceptibility to HIV-1 infection in human CD8+ T lymphocytes by human herpesvirus 6. *Nature* 349, 533–535.
- Lusso, P., Malnati, M. S., Garzino-Demo, A., Crowley, R. W., Long, E. O. & Gallo, R. C. (1993). Infection of natural killer cells by human herpesvirus 6. *Nature* 362, 458–462.
- Lusso, P., Secchiero, P. & Crowley, R. W. (1994). In vitro susceptibility of *Macaca nemestrina* to human herpesvirus 6: a potential animal model of coinfection with primate immunodeficiency viruses. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10, 181–187.
- Lusso, P., Garzino-Demo, A., Crowley, R. W. & Malnati, M. S. (1995). Infection of gamma/delta T lymphocytes by human herpesvirus 6: transcriptional induction of CD4 and susceptibility to HIV infection. *J Exp Med* 181, 1303–1310.
- Lusso, P. (2006). HHV-6 and the immune system: mechanisms of immunomodulation and viral escape. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol* 37 Suppl 1, S4–10.
- Lüttichau, H. R., Clark-Lewis, I., Jensen, P. Ø., Moser, C., Gerstoft, J. & Schwartz, T. W. (2003). A highly selective CCR2 chemokine agonist encoded by human herpesvirus 6. *J Biol Chem* 278, 10928–10933.
- Maeda, Y., Teshima, T., Yamada, M., Shinagawa, K., Nakao, S., Ohno, Y., Kojima, K., Hara, M., Nagafuji, K. & other authors. (1999). Monitoring of human herpesviruses after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation and bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 105, 295–302.
- Maeki, T. & Mori, Y. (2012). Features of Human Herpesvirus-6A and -6B Entry. *Adv Virol* 2012, 384069.
- Manichanh, C., Olivier-Aubron, C., Lagarde, J. P., Aubin, J. T., Bossi, P., Gautheret-Dejean, A., Huraux, J. M. & Agut, H. (2001). Selection of the same mutation in the U69 protein kinase gene of human herpesvirus-6 after prolonged exposure to ganciclovir in vitro and in vivo. *J Gen Virol* 82, 2767–2776.

- Marr, K. A. (2012). Delayed opportunistic infections in hematopoietic stem cell transplantation patients: a surmountable challenge. *Hematol Educ Program Am Soc Hematol Am Soc Hematol Educ Program* 2012, 265–270.
- Martin, L. K., Schub, A., Dillinger, S. & Moosmann, A. (2012). Specific CD8<sup>+</sup> T cells recognize human herpesvirus 6B. *Eur J Immunol* 42, 2901–2912.
- Matsuda, Y., Hara, J., Miyoshi, H., Osugi, Y., Fujisaki, H., Takai, K., Ohta, H., Tanaka-Taya, K., Yamanishi, K. & Okada, S. (1999). Thrombotic microangiopathy associated with reactivation of human herpesvirus-6 following high-dose chemotherapy with autologous bone marrow transplantation in young children. *Bone Marrow Transplant* 24, 919–923.
- Matsumura, T., Narimatsu, H., Kami, M., Yuji, K., Kusumi, E., Hori, A., Murashige, N., Tanaka, Y., Masuoka, K. & other authors. (2007). Cytomegalovirus infections following umbilical cord blood transplantation using reduced intensity conditioning regimens for adult patients. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 13, 577–583.
- Matthes-Martin, S., Feuchtinger, T., Shaw, P. J., Engelhard, D., Hirsch, H. H., Cordonnier, C. & Ljungman, P. (2012). European guidelines for diagnosis and treatment of adenovirus infection in leukemia and stem cell transplantation: summary of ECIL-4 (2011). *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc* 14, 555–563.
- Mayne, M., Cheadle, C., Soldan, S. S., Cermelli, C., Yamano, Y., Akhyani, N., Nagel, J. E., Taub, D. D., Becker, K. G. & Jacobson, S. (2001). Gene expression profile of herpesvirus-infected T cells obtained using immunomicroarrays: induction of proinflammatory mechanisms. *J Virol* 75, 11641–11650.
- Mendel, I., de Matteis, M., Bertin, C., Delaporte, B., Maguer, D., Collandre, H. & Buffet-Janvresse, C. (1995). Fulminant hepatitis in neonates with human herpesvirus 6 infection. *Pediatr Infect Dis J* 14, 993–997.
- Mendez, J. C., Dockrell, D. H., Espy, M. J., Smith, T. F., Wilson, J. A., Harmsen, W. S., Ilstrup, D. & Paya, C. V. (2001). Human beta-herpesvirus interactions in solid organ transplant recipients. *J Infect Dis* 183, 179–184.
- Milne, R. S., Mattick, C., Nicholson, L., Devaraj, P., Alcamì, A. & Gompels, U. A. (2000). RANTES binding and down-regulation by a novel human herpesvirus-6 beta chemokine receptor. *J Immunol Baltim Md* 1950 164, 2396–2404.
- Mirandola, P., Menegazzi, P., Merighi, S., Ravaioli, T., Cassai, E. & Di Luca, D. (1998). Temporal mapping of transcripts in herpesvirus 6 variants. *J Virol* 72, 3837–3844.
- Miyoshi, H., Tanaka-Taya, K., Hara, J., Fujisaki, H., Matsuda, Y., Ohta, H., Osugi, Y., Okada, S. & Yamanishi, K. (2001). Inverse relationship between human herpesvirus-6 and -7 detection after allogeneic and autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 27, 1065–1070.
- Mookerjee, B. P. & Vogelsang, G. (1997). Human herpes virus-6 encephalitis after bone marrow transplantation: successful treatment with ganciclovir. *Bone Marrow Transplant* 20, 905–906.
- Moore, P. S., Gao, S. J., Dominguez, G., Cesarman, E., Lungu, O., Knowles, D. M., Garber, R., Pellett, P. E., McGeoch, D. J. & Chang, Y. (1996). Primary characterization of a herpesvirus agent associated with Kaposi's sarcomae. *J Virol* 70, 549–558.
- Morissette, G. & Flamand, L. (2010). Herpesviruses and chromosomal integration. *J Virol* 84, 12100–12109.
- Mori, T., Tanaka-Taya, K., Satoh, H., Aisa, Y., Yamazaki, R., Kato, J., Ikeda, Y. & Okamoto, S. (2009). Transmission of chromosomally integrated human herpesvirus 6 (HHV-6) variant A from a parent to children leading to misdiagnosis of active HHV-6 infection. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc* 11, 503–506.
- Mori, Y., Dhepakson, P., Shimamoto, T., Ueda, K., Gomi, Y., Tani, H., Matsuura, Y. & Yamanishi, K. (2000). Expression of human herpesvirus 6B rep within infected cells and binding of its gene product to the TATA-binding protein in vitro and in vivo. *J Virol* 74, 6096–6104.
- Mori, Y. (2009). Recent topics related to human herpesvirus 6 cell tropism. *Cell Microbiol* 11, 1001–1006.

- Mori, Y., Seya, T., Huang, H. L., Akkapaiboon, P., Dhepakson, P. & Yamanishi, K. (2002). Human herpesvirus 6 variant A but not variant B induces fusion from without in a variety of human cells through a human herpesvirus 6 entry receptor, CD46. *J Virol* 76, 6750–6761.
- Mori, Y., Yang, X., Akkapaiboon, P., Okuno, T. & Yamanishi, K. (2003). Human herpesvirus 6 variant A glycoprotein H-glycoprotein L-glycoprotein Q complex associates with human CD46. *J Virol* 77, 4992–4999.
- Mori, Y., Akkapaiboon, P., Yonemoto, S., Koike, M., Takemoto, M., Sadaoka, T., Sasamoto, Y., Konishi, S., Uchiyama, Y. & Yamanishi, K. (2004). Discovery of a second form of tripartite complex containing gH-gL of human herpesvirus 6 and observations on CD46. *J Virol* 78, 4609–4616.
- Muta, T., Kamo, M., Gondo, H., Kato, K., Eto, T., Shibuya, T., Fukuda, T., Miyamoto, T., Nagafuji, K. & other authors. (2005). Human herpesvirus-6 encephalitis followed by severe acute GVHD after a stem cell transplant from a microchimeric non-inherited maternal antigen (NIMA)-mismatched sibling. *Bone Marrow Transplant* 35, 411–413.
- Muta, T., Fukuda, T. & Harada, M. (2009). Human herpesvirus-6 encephalitis in hematopoietic SCT recipients in Japan: a retrospective multicenter study. *Bone Marrow Transplant* 43, 583–585.
- Naik, S. H., Sathe, P., Park, H.-Y., Metcalf, D., Proietto, A. I., Dakic, A., Carotta, S., O’Keeffe, M., Bahlo, M. & other authors. (2007). Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat Immunol* 8, 1217–1226.
- Nash, P. J., Avery, R. K., Tang, W. H. W., Starling, R. C., Taeye, A. J. & Yamani, M. H. (2004). Encephalitis owing to human herpesvirus-6 after cardiac transplant. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* 4, 1200–1203.
- Nastke, M.-D., Becerra, A., Yin, L., Dominguez-Amoroch, O., Gibson, L., Stern, L. J. & Calvo-Calle, J. M. (2012). Human CD4+ T cell response to human herpesvirus 6. *J Virol* 86, 4776–4792.
- Neipel, F., Ellinger, K. & Fleckenstein, B. (1992). Gene for the major antigenic structural protein (p100) of human herpesvirus 6. *J Virol* 66, 3918–3924.
- Niiya, H., Azuma, T., Jin, L., Uchida, N., Inoue, A., Hasegawa, H., Fujita, S., Tohyama, M., Hashimoto, K. & Yasukawa, M. (2004). Transcriptional downregulation of DC-SIGN in human herpesvirus 6-infected dendritic cells. *J Gen Virol* 85, 2639–2642.
- Niiya, H., Lei, J., Guo, Y., Azuma, T., Yakushijin, Y., Sakai, I., Hato, T., Tohyama, M., Hashimoto, K. & Yasukawa, M. (2006). Human herpesvirus 6 impairs differentiation of monocytes to dendritic cells. *Exp Hematol* 34, 642–653.
- Nitsche, A., Müller, C. W., Radonic, A., Landt, O., Ellerbrok, H., Pauli, G. & Siegert, W. (2001). Human herpesvirus 6A DNA is detected frequently in plasma but rarely in peripheral blood leukocytes of patients after bone marrow transplantation. *J Infect Dis* 183, 130–133.
- Nordström, I., Rudin, A., Adlerberth, I., Wold, A., Saalman, R., Hesselmar, B., Aberg, N., Liljeqvist, J.-A. & Eriksson, K. (2010). Infection of infants with human herpesvirus type 6 may be associated with reduced allergic sensitization and T-helper type 2 development. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol* 40, 882–890.
- Nordström, I. & Eriksson, K. (2012). HHV-6B induces IFN- $\lambda$ 1 responses in cord plasmacytoid dendritic cells through TLR9. *PLoS One* 7, e38683.
- Norton, R. A., Caserta, M. T., Hall, C. B., Schnabel, K., Hocknell, P. & Dewhurst, S. (1999). Detection of human herpesvirus 6 by reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 37, 3672–3675.
- O’Donnell, P. H., Swanson, K., Josephson, M. A., Artz, A. S., Parsad, S. D., Ramaprasad, C., Pursell, K., Rich, E., Stock, W. & van Besien, K. (2009). BK virus infection is associated with hematuria and renal impairment in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 15, 1038–1048.e1.

- Ogata, M., Satou, T., Kawano, R., Goto, K., Ikewaki, J., Kohno, K., Ando, T., Miyazaki, Y., Ohtsuka, E. & other authors. (2008). Plasma HHV-6 viral load-guided preemptive therapy against HHV-6 encephalopathy after allogeneic stem cell transplantation: a prospective evaluation. *Bone Marrow Transplant* 41, 279–285.
- Ogata, M., Satou, T., Inoue, Y., Takano, K., Ikebe, T., Ando, T., Ikewaki, J., Kohno, K., Nishida, A. & other authors. (2013). Foscarnet against human herpesvirus (HHV)-6 reactivation after allo-SCT: breakthrough HHV-6 encephalitis following antiviral prophylaxis. *Bone Marrow Transplant* 48, 257–264.
- Ogata, M., Fukuda, T. & Teshima, T. (2015). Human herpesvirus-6 encephalitis after allogeneic hematopoietic cell transplantation: What we do and do not know. *Bone Marrow Transplant* 50, 1030–1036.
- Ogata, M. (2009). Human herpesvirus 6 in hematological malignancies. *J Clin Exp Hematop JCEH* 49, 57–67.
- Ogata, M., Kikuchi, H., Satou, T., Kawano, R., Ikewaki, J., Kohno, K., Kashima, K., Ohtsuka, E. & Kadota, J.-I. (2006). Human herpesvirus 6 DNA in plasma after allogeneic stem cell transplantation: incidence and clinical significance. *J Infect Dis* 193, 68–79.
- Okuno, T., Higashi, K., Shiraki, K., Yamanishi, K., Takahashi, M., Kokado, Y., Ishibashi, M., Takahara, S., Sonoda, T. & Tanaka, K. (1990). Human herpesvirus 6 infection in renal transplantation. *Transplantation* 49, 519–522.
- Okuno, T., Shao, H., Asada, H., Shiraki, K., Takahashi, M. & Yamanishi, K. (1992). Analysis of human herpesvirus 6 glycoproteins recognized by monoclonal antibody OHV1. *J Gen Virol* 73 ( Pt 2), 443–447.
- Olson, A. L., Dahi, P. B., Zheng, J., Devlin, S. M., Lubin, M., Gonzales, A. M., Giralt, S. A., Perales, M.-A., Papadopoulos, E. B. & other authors. (2014). Frequent human herpesvirus-6 viremia but low incidence of encephalitis in double-unit cord blood recipients transplanted without antithymocyte globulin. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 20, 787–793.
- Oster, B., Bundgaard, B., Hupp, T. R. & Höllsberg, P. (2008). Human herpesvirus 6B induces phosphorylation of p53 in its regulatory domain by a CK2- and p38-independent pathway. *J Gen Virol* 89, 87–96.
- Oudin, C., Chevallier, P., Furst, S., Guillaume, T., Cheikh, J. El, Delaunay, J., Castagna, L., Faucher, C., Granata, A. & other authors. (2014). Reduced-toxicity conditioning prior to allogeneic stem cell transplantation improves outcome in patients with myeloid malignancies. *Haematologica* 99, 1762–1768.
- de Pagter, A. P. J., Boelens, J. J., Scherrenburg, J., Vroom-de Blank, T., Tesselaar, K., Nanlohy, N., Sanders, E. A. M., Schuurman, R. & van Baarle, D. (2012). First analysis of human herpesvirus 6T-cell responses: Specific boosting after HHV6 reactivation in stem cell transplantation recipients. *Clin Immunol Orlando Fla* 144, 179–189.
- de Pagter, P. J. A., Schuurman, R., Keukens, L., Schutten, M., Cornelissen, J. J., van Baarle, D., Fries, E., Sanders, E. A. M., Minnema, M. C. & other authors. (2013). Human herpes virus 6 reactivation: important predictor for poor outcome after myeloablative, but not non-myeloablative allo-SCT. *Bone Marrow Transplant*.
- de Pagter, P. J. A., Schuurman, R., Visscher, H., de Vos, M., Bierings, M., van Loon, A. M., Uiterwaal, C. S. P. M., van Baarle, D., Sanders, E. A. M. & Boelens, J. (2008a). Human herpes virus 6 plasma DNA positivity after hematopoietic stem cell transplantation in children: an important risk factor for clinical outcome. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 14, 831–839.
- de Pagter, P. J., Schuurman, R., Meijer, E., van Baarle, D., Sanders, E. A. M. & Boelens, J. J. (2008b). Human herpesvirus type 6 reactivation after haematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol* 43, 361–366.
- de Pagter, P. J., Virgili, A., Nacheva, E., van Baarle, D., Schuurman, R. & Boelens, J. J. (2010). Chromosomally integrated human herpesvirus 6: transmission via cord blood-derived unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 16, 130–132.

- Painter, W., Robertson, A., Trost, L. C., Godkin, S., Lampert, B. & Painter, G. (2012). First pharmacokinetic and safety study in humans of the novel lipid antiviral conjugate CMX001, a broad-spectrum oral drug active against double-stranded DNA viruses. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 2726–2734.
- Papadopoulou, A., Gerdemann, U., Katari, U. L., Tzannou, I., Liu, H., Martinez, C., Leung, K., Carrum, G., Gee, A. P. & other authors. (2014). Activity of broad-spectrum T cells as treatment for AdV, EBV, CMV, BKV, and HHV6 infections after HSCT. *Sci Transl Med* 6, 242ra83.
- Parody, R., Martino, R., Rovira, M., Vazquez, L., Vázquez, M. J., de la Cámara, R., Blazquez, C., Fernández-Avilés, F., Carreras, E. & other authors. (2006). Severe infections after unrelated donor allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adults: comparison of cord blood transplantation with peripheral blood and bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 12, 734–748.
- Pascal, L., Mohty, M., Ruggeri, A., Tucunduva, L., Milpied, N., Chevallier, P., Tabrizi, R., Labalette, M., Gluckman, E. & other authors. (2015). Impact of rabbit ATG-containing myeloablative conditioning regimens on the outcome of patients undergoing unrelated single-unit cord blood transplantation for hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant* 50, 45–50.
- Pedersen, S. M., Oster, B., Bundgaard, B. & Höllsberg, P. (2006). Induction of cell-cell fusion from without by human herpesvirus 6B. *J Virol* 80, 9916–9920.
- Pellett, P. E., Sánchez-Martínez, D., Dominguez, G., Black, J. B., Anton, E., Greenamoyer, C. & Dambaugh, T. R. (1993). A strongly immunoreactive virion protein of human herpesvirus 6 variant B strain Z29: identification and characterization of the gene and mapping of a variant-specific monoclonal antibody reactive epitope. *Virology* 195, 521–531.
- Pellett, P. E., Ablashi, D. V., Ambros, P. F., Agut, H., Caserta, M. T., Descamps, V., Flamand, L., Gautheret-Dejean, A., Hall, C. B. & other authors. (2012). Chromosomally integrated human herpesvirus 6: questions and answers. *Rev Med Virol* 22, 144–155.
- Peric, Z., Cahu, X., Chevallier, P., Brissot, E., Malard, F., Guillaume, T., Delaunay, J., Ayari, S., Dubruille, V. & other authors. (2011). Features of Epstein-Barr Virus (EBV) reactivation after reduced intensity conditioning allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia* 25, 932–938.
- Petropoulou, A. D. & Rocha, V. (2011). Risk factors and options to improve engraftment in unrelated cord blood transplantation. *Stem Cells Int* 2011, 610514.
- Pfeiffer, B., Berneman, Z. N., Neipel, F., Chang, C. K., Tirwatnapong, S. & Chandran, B. (1993). Identification and mapping of the gene encoding the glycoprotein complex gp82-gp105 of human herpesvirus 6 and mapping of the neutralizing epitope recognized by monoclonal antibodies. *J Virol* 67, 4611–4620.
- Pfeiffer, B., Thomson, B. & Chandran, B. (1995). Identification and characterization of a cDNA derived from multiple splicing that encodes envelope glycoprotein gp105 of human herpesvirus 6. *J Virol* 69, 3490–3500.
- Pichlmair, A. & Reis e Sousa, C. (2007). Innate recognition of viruses. *Immunity* 27, 370–383.
- Ponce, D. M., Sauter, C., Devlin, S., Lubin, M., Gonzales, A. M., Kernan, N. A., Scaradavou, A., Giral, S., Goldberg, J. D. & other authors. (2013). A novel reduced-intensity conditioning regimen induces a high incidence of sustained donor-derived neutrophil and platelet engraftment after double-unit cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 19, 799–803.
- Portolani, M., Pecorari, M., Tamassia, M. G., Gennari, W., Beretti, F. & Guaraldi, G. (2001). Case of fatal encephalitis by HHV-6 variant A. *J Med Virol* 65, 133–137.
- Portolani, M., Pecorari, M., Gennari, W., Beretti, F., Sabbatini, A. M. T., Casolari, C., Rumpianesi, F., Cermelli, C., Sintini, M. & Mori, F. (2006). Case report: primary infection by human herpesvirus 6 variant a with the onset of myelitis. *Herpes J IHMF* 13, 72–74.
- Pradeau, K., Bordessoule, D., Szelag, J.-C., Rolle, F., Ferrat, P., Le Meur, Y., Turlure, P., Denis, F. & Ranger-Rozez, S. (2006). A reverse transcription-nested PCR assay for HHV-6 mRNA early transcript detection after transplantation. *J Virol Methods* 134, 41–47.

- Prober, C. (2005). Sixth disease and the ubiquity of human herpesviruses. *N Engl J Med* 352, 753–755.
- Pulendran, B., Banchereau, J., Burkeholder, S., Kraus, E., Guinet, E., Chalouni, C., Caron, D., Maliszewski, C., Davoust, J. & other authors. (2000). Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J Immunol Baltim Md 1950* 165, 566–572.
- Purev, E., Winkler, T., Danner, R. L., Fahle, G. A., Cook, L., Zerr, D. M., Jerome, K. R. & Childs, R. W. (2014). Engraftment of donor cells with germ-line integration of HHV6 mimics HHV6 reactivation following cord blood/haplo transplantation. *Blood* 124, 1198–1199.
- Qian, G., Wood, C. & Chandran, B. (1993). Identification and characterization of glycoprotein gH of human herpesvirus-6. *Virology* 194, 380–386.
- Radonić, A., Oswald, O., Thulke, S., Brockhaus, N., Nitsche, A., Siegert, W. & Schetelig, J. (2005). Infections with human herpesvirus 6 variant B delay platelet engraftment after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 131, 480–482.
- Rapaport, D., Engelhard, D., Tagger, G., Or, R. & Frenkel, N. (2002). Antiviral prophylaxis may prevent human herpesvirus-6 reactivation in bone marrow transplant recipients. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc* 4, 10–16.
- Rapp, J. C., Krug, L. T., Inoue, N., Dambaugh, T. R. & Pellett, P. E. (2000). U94, the human herpesvirus 6 homolog of the parvovirus nonstructural gene, is highly conserved among isolates and is expressed at low mRNA levels as a spliced transcript. *Virology* 268, 504–516.
- Ratnamohan, V. M., Chapman, J., Howse, H., Bovington, K., Robertson, P., Byth, K., Allen, R. & Cunningham, A. L. (1998). Cytomegalovirus and human herpesvirus 6 both cause viral disease after renal transplantation. *Transplantation* 66, 877–882.
- Razonable, R. R., Fanning, C., Brown, R. A., Espy, M. J., Rivero, A., Wilson, J., Kremers, W., Smith, T. F. & Paya, C. V. (2002). Selective Reactivation of Human Herpesvirus 6 Variant A Occurs in Critically Ill Immunocompetent Hosts. *J Infect Dis* 185, 110–113.
- Reizis, B., Bunin, A., Ghosh, H. S., Lewis, K. L. & Sisirak, V. (2011). Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu Rev Immunol* 29, 163–183.
- Reynaud, J. M. & Horvat, B. (2013). Animal models for human herpesvirus 6 infection. *Front Microbiol* 4, 174.
- Reynaud, J. M., Jégou, J.-F., Welsch, J. C. & Horvat, B. (2014). Human herpesvirus 6A infection in CD46 transgenic mice: viral persistence in the brain and increased production of proinflammatory chemokines via Toll-like receptor 9. *J Virol* 88, 5421–5436.
- Rieux, C., Gautheret-Dejean, A., Challine-Lehmann, D., Kirch, C., Agut, H. & Vernant, J. P. (1998). Human herpesvirus-6 meningoencephalitis in a recipient of an unrelated allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 65, 1408–1411.
- Robert, C., Agut, H., Aubin, J. T., Collandre, H., Ingrand, D., Devillechabrolle, A., LeHoang, P. & Huraux, J. M. (1990). Detection of antibodies to human herpesvirus-6 using immunofluorescence assay. *Res Virol* 141, 545–555.
- Robin, M., Marque-Juillet, S., Scieux, C., Peffault de Latour, R., Ferry, C., Rocha, V., Molina, J.-M., Bergeron, A., Devergie, A. & other authors. (2007). Disseminated adenovirus infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: incidence, risk factors and outcome. *Haematologica* 92, 1254–1257.
- Rogers, J., Rohal, S., Carrigan, D. R., Kusne, S., Knox, K. K., Gayowski, T., Wagener, M. M., Fung, J. J. & Singh, N. (2000). Human herpesvirus-6 in liver transplant recipients: role in pathogenesis of fungal infections, neurologic complications, and outcome. *Transplantation* 69, 2566–2573.
- Rorije, N. M. G., Shea, M. M., Satyanarayana, G., Hammond, S. P., Ho, V. T., Baden, L. R., Antin, J. H., Soiffer, R. J. & Marty, F. M. (2014). BK Virus Disease after Allogeneic Stem Cell Transplantation: A Cohort Analysis. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 20, 564–570.

- Rotola, A., Ravaioli, T., Gonelli, A., Dewhurst, S., Cassai, E. & Di Luca, D. (1998). U94 of human herpesvirus 6 is expressed in latently infected peripheral blood mononuclear cells and blocks viral gene expression in transformed lymphocytes in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13911–13916.
- Roush, K. S., Domiati-Saad, R. K., Margraf, L. R., Krisher, K., Scheuermann, R. H., Rogers, B. B. & Dawson, D. B. (2001). Prevalence and cellular reservoir of latent human herpesvirus 6 in tonsillar lymphoid tissue. *Am J Clin Pathol* 116, 648–654.
- Rua, R., Lepelley, A., Gessain, A. & Schwartz, O. (2012). Innate sensing of foamy viruses by human hematopoietic cells. *J Virol* 86, 909–918.
- Ruggeri, A., Peffault de Latour, R., Carmagnat, M., Clave, E., Douay, C., Larghero, J., Cayuela, J.-M., Traineau, R., Robin, M. & other authors. (2011). Outcomes, infections, and immune reconstitution after double cord blood transplantation in patients with high-risk hematological diseases. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc* 13, 456–465.
- Safronetz, D., Humar, A. & Tipples, G. A. (2003). Differentiation and quantitation of human herpesviruses 6A, 6B and 7 by real-time PCR. *J Virol Methods* 112, 99–105.
- Saijo, M., Saijo, H., Yamamoto, M., Takimoto, M., Fujiyasu, H., Muroho, K. & Fujita, K. (1995). Thrombocytopenic purpura associated with primary human herpesvirus 6 infection. *Pediatr Infect Dis J* 14, 405.
- Sakai, R., Kanamori, H., Motohashi, K., Yamamoto, W., Matsuura, S., Fujita, A., Ohshima, R., Kuwabara, H., Tanaka, M. & other authors. (2011). Long-term outcome of human herpesvirus-6 encephalitis after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 17, 1389–1394.
- Salahuddin, S. Z., Ablashi, D. V., Markham, P. D., Josephs, S. F., Sturzenegger, S., Kaplan, M., Halligan, G., Biberfeld, P., Wong-Staal, F. & Kramarsky, B. (1986). Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science* 234, 596–601.
- Santoro, F., Kennedy, P. E., Locatelli, G., Malnati, M. S., Berger, E. A. & Lusso, P. (1999). CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell* 99, 817–827.
- Sashihara, J., Tanaka-Taya, K., Tanaka, S., Amo, K., Miyagawa, H., Hosoi, G., Taniguchi, T., Fukui, T., Kasuga, N. & other authors. (2002). High incidence of human herpesvirus 6 infection with a high viral load in cord blood stem cell transplant recipients. *Blood* 100, 2005–2011.
- Savolainen, H., Lautenschlager, I., Piiparinen, H., Saarinen-Pihkala, U., Hovi, L. & Vetterranta, K. (2005). Human herpesvirus-6 and -7 in pediatric stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer* 45, 820–825.
- Scheurer, M. E., Pritchett, J. C., Amirian, E. S., Zemke, N. R., Lusso, P. & Ljungman, P. (2012). HHV-6 encephalitis in umbilical cord blood transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Bone Marrow Transplant*.
- Schirmer, E. C., Wyatt, L. S., Yamanishi, K., Rodriguez, W. J. & Frenkel, N. (1991). Differentiation between two distinct classes of viruses now classified as human herpesvirus 6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5922–5926.
- Sciortino, M. T., Suzuki, M., Taddeo, B. & Roizman, B. (2001). RNAs extracted from herpes simplex virus 1 virions: apparent selectivity of viral but not cellular RNAs packaged in virions. *J Virol* 75, 8105–8116.
- Seeley, W. W., Marty, F. M., Holmes, T. M., Upchurch, K., Soiffer, R. J., Antin, J. H., Baden, L. R. & Bromfield, E. B. (2007). Post-transplant acute limbic encephalitis: clinical features and relationship to HHV6. *Neurology* 69, 156–165.
- Shiohara, T., Iijima, M., Ikezawa, Z. & Hashimoto, K. (2007). The diagnosis of a DRESS syndrome has been sufficiently established on the basis of typical clinical features and viral reactivations. *Br J Dermatol* 156, 1083–1084.

- Shulman, H. M., Sullivan, K. M., Weiden, P. L., McDonald, G. B., Striker, G. E., Sale, G. E., Hackman, R., Tsoi, M. S., Storb, R. & Thomas, E. D. (1980). Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am J Med* 69, 204–217.
- Siegel, F. P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P. A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S. & Liu, Y. J. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284, 1835–1837.
- Silva, L. de P., Patah, P. A., Saliba, R. M., Szewczyk, N. A., Gilman, L., Neumann, J., Han, X.-Y., Tarrand, J., Ribeiro, R. & other authors. (2010). Hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic stem cell transplants is the complex result of BK virus infection, preparative regimen intensity and donor type. *Haematologica* 95, 1183–1190.
- Simpson, S., Taylor, B., Burrows, J., Burrows, S., Dwyer, D. E., Taylor, J., Ponsonby, A.-L., Blizzard, L., Dwyer, T. & other authors. (2014). EBV & HHV6 reactivation is infrequent and not associated with MS clinical course. *Acta Neurol Scand* 130, 328–337.
- Singh, N., Carrigan, D. R., Gayowski, T. & Marino, I. R. (1997). Human herpesvirus-6 infection in liver transplant recipients: documentation of pathogenicity. *Transplantation* 64, 674–678.
- Sjahril, R., Isegawa, Y., Tanaka, T., Nakano, K., Yoshikawa, T., Asano, Y., Ohshima, A., Yamanishi, K. & Sugimoto, N. (2009). Relationship between U83 gene variation in human herpesvirus 6 and secretion of the U83 gene product. *Arch Virol* 154, 273–283.
- Slouts, T. P., Kapeleris, J. P., Mackay, I. M., Batham, M. & Devine, P. L. (1996). Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum immunoglobulin G response to human herpesvirus 6. *J Clin Microbiol* 34, 675–679.
- Smith, A., Santoro, F., Di Lullo, G., Dagna, L., Verani, A. & Lusso, P. (2003). Selective suppression of IL-12 production by human herpesvirus 6. *Blood* 102, 2877–2884.
- Smith, A. P., Paolucci, C., Di Lullo, G., Burastero, S. E., Santoro, F. & Lusso, P. (2005). Viral replication-independent blockade of dendritic cell maturation and interleukin-12 production by human herpesvirus 6. *J Virol* 79, 2807–2813.
- Smith, C. & Khanna, R. (2013). Immune regulation of human herpesviruses and its implications for human transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* 13 Suppl 3, 9–23; quiz 23.
- Sobue, R., Miyazaki, H., Okamoto, M., Hirano, M., Yoshikawa, T., Suga, S. & Asano, Y. (1991). Fulminant hepatitis in primary human herpesvirus-6 infection. *N Engl J Med* 324, 1290.
- Stanton, R., Wilkinson, G. W. G. & Fox, J. D. (2003). Analysis of human herpesvirus-6 IE1 sequence variation in clinical samples. *J Med Virol* 71, 578–584.
- Styczynski, J., Reusser, P., Einsele, H., de la Camara, R., Cordonnier, C., Ward, K. N., Ljungman, P., Engelhard, D. & Second European Conference on Infections in Leukemia. (2009). Management of HSV, VZV and EBV infections in patients with hematological malignancies and after SCT: guidelines from the Second European Conference on Infections in Leukemia. *Bone Marrow Transplant* 43, 757–770.
- Suga, S., Yoshikawa, T., Asano, Y., Nakashima, T., Yazaki, T., Fukuda, M., Kojima, S., Matsuyama, T., Ono, Y. & Oshima, S. (1992). IgM neutralizing antibody responses to human herpesvirus-6 in patients with exanthem subitum or organ transplantation. *Microbiol Immunol* 36, 495–506.
- Sugita, K., Kurumada, H., Eguchi, M. & Furukawa, T. (1995). Human herpesvirus 6 infection associated with hemophagocytic syndrome. *Acta Haematol* 93, 108–109.
- Sullivan, B. M. & Coscoy, L. (2008). Downregulation of the T-cell receptor complex and impairment of T-cell activation by human herpesvirus 6 u24 protein. *J Virol* 82, 602–608.
- Swiecki, M. & Colonna, M. (2010). Unraveling the functions of plasmacytoid dendritic cells during viral infections, autoimmunity, and tolerance. *Immunol Rev* 234, 142–162.



- Swiecki, M. & Colonna, M. (2015). The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 15, 471–485.
- Swiecki, M., Wang, Y., Gilfillan, S. & Colonna, M. (2013). Plasmacytoid dendritic cells contribute to systemic but not local antiviral responses to HSV infections. *PLoS Pathog* 9, e1003728.
- Sylwester, A. W., Mitchell, B. L., Edgar, J. B., Taormina, C., Pelte, C., Ruchti, F., Sleath, P. R., Grabstein, K. H., Hosken, N. A. & other authors. (2005). Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med* 202, 673–685.
- Szabolcs, P. (2010). The immunobiology of cord blood transplantation. *Korean J Hematol* 45, 224–235.
- Takahashi, K., Sonoda, S., Higashi, K., Kondo, T., Takahashi, H., Takahashi, M. & Yamanishi, K. (1989). Predominant CD4 T-lymphocyte tropism of human herpesvirus 6-related virus. *J Virol* 63, 3161–3163.
- Takatsuka, H., Wakae, T., Mori, A., Okada, M., Fujimori, Y., Takemoto, Y., Okamoto, T., Kanamaru, A. & Kakishita, E. (2003). Endothelial damage caused by cytomegalovirus and human herpesvirus-6. *Bone Marrow Transplant* 31, 475–479.
- Takemoto, M., Mori, Y., Ueda, K., Kondo, K. & Yamanishi, K. (2004). Productive human herpesvirus 6 infection causes aberrant accumulation of p53 and prevents apoptosis. *J Gen Virol* 85, 869–879.
- Takemoto, M., Imasawa, T., Yamanishi, K. & Mori, Y. (2009). Role of dendritic cells infected with human herpesvirus 6 in virus transmission to CD4(+) T cells. *Virology* 385, 294–302.
- Tanaka-Taya, K., Kondo, T., Mukai, T., Miyoshi, H., Yamamoto, Y., Okada, S. & Yamanishi, K. (1996). Seroepidemiological study of human herpesvirus-6 and -7 in children of different ages and detection of these two viruses in throat swabs by polymerase chain reaction. *J Med Virol* 48, 88–94.
- Tang, H., Kawabata, A., Takemoto, M., Yamanishi, K. & Mori, Y. (2008). Human herpesvirus-6 infection induces the reorganization of membrane microdomains in target cells, which are required for virus entry. *Virology* 378, 265–271.
- Tang, H., Serada, S., Kawabata, A., Ota, M., Hayashi, E., Naka, T., Yamanishi, K. & Mori, Y. (2013). CD134 is a cellular receptor specific for human herpesvirus-6B entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 9096–9099.
- Tejada-Simon, M. V., Zang, Y. C. Q., Hong, J., Rivera, V. M. & Zhang, J. Z. (2003). Cross-reactivity with myelin basic protein and human herpesvirus-6 in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 53, 189–197.
- Thomson, B. J., Efsthathiou, S. & Honess, R. W. (1991). Acquisition of the human adeno-associated virus type-2 rep gene by human herpesvirus type-6. *Nature* 351, 78–80.
- Thomson, B. J., Weindler, F. W., Gray, D., Schwaab, V. & Heilbronn, R. (1994). Human herpesvirus 6 (HHV-6) is a helper virus for adeno-associated virus type 2 (AAV-2) and the AAV-2 rep gene homologue in HHV-6 can mediate AAV-2 DNA replication and regulate gene expression. *Virology* 204, 304–311.
- Tigue, N. J., Matharu, P. J., Roberts, N. A., Mills, J. S., Kay, J. & Jupp, R. (1996). Cloning, expression and characterization of the proteinase from human herpesvirus 6. *J Virol* 70, 4136–4141.
- Tohyama, M., Hashimoto, K., Yasukawa, M., Kimura, H., Horikawa, T., Nakajima, K., Urano, Y., Matsumoto, K., Iijima, M. & Shear, N. H. (2007). Association of human herpesvirus 6 reactivation with the flaring and severity of drug-induced hypersensitivity syndrome. *Br J Dermatol* 157, 934–940.
- Tohyama, M. & Hashimoto, K. (2011). New aspects of drug-induced hypersensitivity syndrome. *J Dermatol* 38, 222–228.
- Tokimasa, S., Hara, J., Osugi, Y., Ohta, H., Matsuda, Y., Fujisaki, H., Sawada, A., Kim, J. Y., Sashihara, J. & other authors. (2002). Ganciclovir is effective for prophylaxis and treatment of human herpesvirus-6 in allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 29, 595–598.
- Tomonari, A., Takahashi, S., Ooi, J., Iseki, T., Takasugi, K., Uchiyama, M., Konuma, T., Futami, M., Ohno, N. & other authors. (2005). Human herpesvirus 6 variant B infection in adult patients after unrelated cord blood transplantation. *Int J Hematol* 81, 352–355.

- Torelli, G., Barozzi, P., Marasca, R., Cocconcelli, P., Merelli, E., Ceccherini-Nelli, L., Ferrari, S. & Luppi, M. (1995). Targeted integration of human herpesvirus 6 in the p arm of chromosome 17 of human peripheral blood mononuclear cells in vivo. *J Med Virol* 46, 178–188.
- Torre, D., Speranza, F., Martegani, R., Ferrante, P., Omodeo-Zorini, E., Mancuso, R. & Fiori, G. P. (1998). Meningoencephalitis caused by human herpesvirus-6 in an immunocompetent adult patient: case report and review of the literature. *Infection* 26, 402–404.
- Torrisi, M. R., Gentile, M., Cardinali, G., Cirone, M., Zompetta, C., Lotti, L. V., Frati, L. & Faggioni, A. (1999). Intracellular transport and maturation pathway of human herpesvirus 6. *Virology* 257, 460–471.
- Varani, S., Cederarv, M., Feld, S., Tammik, C., Frascaroli, G., Landini, M. P. & Söderberg-Nauclér, C. (2007). Human cytomegalovirus differentially controls B cell and T cell responses through effects on plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 179, 7767–7776.
- Virtanen, J. O., Pietiläinen-Nicklén, J., Uotila, L., Färkkilä, M., Vaheri, A. & Koskiniemi, M. (2011). Intrathecal human herpesvirus 6 antibodies in multiple sclerosis and other demyelinating diseases presenting as oligoclonal bands in cerebrospinal fluid. *J Neuroimmunol* 237, 93–97.
- Wainwright, M. S., Martin, P. L., Morse, R. P., Lacaze, M., Provenzale, J. M., Coleman, R. E., Morgan, M. A., Hulette, C., Kurtzberg, J. & other authors. (2001). Human herpesvirus 6 limbic encephalitis after stem cell transplantation. *Ann Neurol* 50, 612–619.
- Walker, C. M., van Burik, J.-A. H., De For, T. E. & Weisdorf, D. J. (2007). Cytomegalovirus infection after allogeneic transplantation: comparison of cord blood with peripheral blood and marrow graft sources. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 13, 1106–1115.
- Wang, F., Yao, K., Yin, Q.-Z., Zhou, F., Ding, C.-L., Peng, G.-Y., Xu, J., Chen, Y., Feng, D.-J. & other authors. (2006). Human herpesvirus-6-specific interleukin 10-producing CD4+ T cells suppress the CD4+ T-cell response in infected individuals. *Microbiol Immunol* 50, 787–803.
- Wang, F., Chi, J., Peng, G., Zhou, F., Wang, J., Li, L., Feng, D., Xie, F., Gu, B. & other authors. (2014). Development of virus-specific CD4+ and CD8+ regulatory T cells induced by human herpesvirus 6 infection. *J Virol* 88, 1011–1024.
- Wang, F. Z., Dahl, H., Linde, A., Brytting, M., Ehrnst, A. & Ljungman, P. (1996). Lymphotropic herpesviruses in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 88, 3615–3620.
- Wang, F. Z., Dahl, H., Ljungman, P. & Linde, A. (1999a). Lymphoproliferative responses to human herpesvirus-6 variant A and variant B in healthy adults. *J Med Virol* 57, 134–139.
- Wang, F. Z., Linde, A., Dahl, H. & Ljungman, P. (1999b). Human herpesvirus 6 infection inhibits specific lymphocyte proliferation responses and is related to lymphocytopenia after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 24, 1201–1206.
- Wang, F.-Z., Larsson, K., Linde, A. & Ljungman, P. (2002). Human herpesvirus 6 infection and cytomegalovirus-specific lymphoproliferative responses in allogeneic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 30, 521–526.
- Ward, K. N., Leong, H. N., Nacheva, E. P., Howard, J., Atkinson, C. E., Davies, N. W. S., Griffiths, P. D. & Clark, D. A. (2006). Human herpesvirus 6 chromosomal integration in immunocompetent patients results in high levels of viral DNA in blood, sera, and hair follicles. *J Clin Microbiol* 44, 1571–1574.
- Ward, K. N., Gray, J. J. & Efstathiou, S. (1989). Brief report: primary human herpesvirus 6 infection in a patient following liver transplantation from a seropositive donor. *J Med Virol* 28, 69–72.
- Waskow, C., Liu, K., Darrasse-Jèze, G., Guermonprez, P., Ginhoux, F., Merad, M., Shengelia, T., Yao, K. & Nussenzweig, M. (2008). The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nat Immunol* 9, 676–683.
- West, J. A., Gregory, S. M., Sivaraman, V., Su, L. & Damania, B. (2011). Activation of plasmacytoid dendritic cells by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* 85, 895–904.

- Wilborn, F., Brinkmann, V., Schmidt, C. A., Neipel, F., Gelderblom, H. & Siegert, W. (1994). Herpesvirus type 6 in patients undergoing bone marrow transplantation: serologic features and detection by polymerase chain reaction. *Blood* 83, 3052–3058.
- Yakushijin, Y., Yasukawa, M. & Kobayashi, Y. (1991). T-cell immune response to human herpesvirus-6 in healthy adults. *Microbiol Immunol* 35, 655–660.
- Yakushijin, Y., Yasukawa, M. & Kobayashi, Y. (1992). Establishment and functional characterization of human herpesvirus 6-specific CD4+ human T-cell clones. *J Virol* 66, 2773–2779.
- Yamamoto, M., Black, J. B., Stewart, J. A., Lopez, C. & Pellett, P. E. (1990). Identification of a nucleocapsid protein as a specific serological marker of human herpesvirus 6 infection. *J Clin Microbiol* 28, 1957–1962.
- Yamamoto, T., Watarai, Y., Goto, N., Horikoshi, Y., Yamada, S., Yasui, K., Tsujita, M., Hiramitsu, T., Narumi, S. & other authors. (2014). Encephalitis caused by human herpesvirus-6B in pancreas-after-kidney transplantation. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc.*
- Yamane, A., Mori, T., Suzuki, S., Mihara, A., Yamazaki, R., Aisa, Y., Nakazato, T., Shimizu, T., Ikeda, Y. & Okamoto, S. (2007). Risk factors for developing human herpesvirus 6 (HHV-6) reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and its association with central nervous system disorders. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 13, 100–106.
- Yamanishi, K., Okuno, T., Shiraki, K., Takahashi, M., Kondo, T., Asano, Y. & Kurata, T. (1988). Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet* 1, 1065–1067.
- Yao, K., Crawford, J. R., Komaroff, A. L., Ablashi, D. V. & Jacobson, S. (2010). Review part 2: Human herpesvirus-6 in central nervous system diseases. *J Med Virol* 82, 1669–1678.
- Yasukawa, M., Inoue, Y., Ohminami, H., Terada, K. & Fujita, S. (1998). Apoptosis of CD4+ T lymphocytes in human herpesvirus-6 infection. *J Gen Virol* 79 ( Pt 1), 143–147.
- Yasukawa, M., Ohminami, H., Sada, E., Yakushijin, Y., Kaneko, M., Yanagisawa, K., Kohno, H., Bando, S. & Fujita, S. (1999). Latent infection and reactivation of human herpesvirus 6 in two novel myeloid cell lines. *Blood* 93, 991–999.
- Yoshikawa, T., Nakashima, T., Suga, S., Asano, Y., Yazaki, T., Kimura, H., Morishima, T., Kondo, K. & Yamanishi, K. (1992a). Human herpesvirus-6 DNA in cerebrospinal fluid of a child with exanthem subitum and meningoencephalitis. *Pediatrics* 89, 888–890.
- Yoshikawa, T., Nakashima, T., Asano, Y., Suga, S., Yazaki, T., Kojima, S., Mukai, T. & Yamanishi, K. (1992b). Endonuclease analyses of DNA of human herpesvirus-6 isolated from blood before and after bone marrow transplantation. *J Med Virol* 37, 228–231.
- Yoshikawa, T., Asano, Y., Kobayashi, I., Nakashima, T. & Yazaki, T. (1993). Exacerbation of idiopathic thrombocytopenic purpura by primary human herpesvirus 6 infection. *Pediatr Infect Dis J* 12, 409–410.
- Yoshikawa, T., Ihira, M., Suzuki, K., Suga, S., Iida, K., Saito, Y., Asonuma, K., Tanaka, K. & Asano, Y. (2000). Human herpesvirus 6 infection after living related liver transplantation. *J Med Virol* 62, 52–59.
- Yoshikawa, T., Ihira, M., Suzuki, K., Suga, S., Kito, H., Iwasaki, T., Kurata, T., Tanaka, T., Saito, Y. & Asano, Y. (2001a). Fatal acute myocarditis in an infant with human herpesvirus 6 infection. *J Clin Pathol* 54, 792–795.
- Yoshikawa, T., Ihira, M., Ohashi, M., Suga, S., Asano, Y., Miyazaki, H., Hirano, M., Suzuki, K., Matsunaga, K. & other authors. (2001b). Correlation between HHV-6 infection and skin rash after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 28, 77–81.
- Yoshikawa, T., Asano, Y., Ihira, M., Suzuki, K., Ohashi, M., Suga, S., Kudo, K., Horibe, K., Kojima, S. & other authors. (2002). Human herpesvirus 6 viremia in bone marrow transplant recipients: clinical features and risk factors. *J Infect Dis* 185, 847–853.

- Yoshikawa, T., Akimoto, S., Nishimura, N., Ozaki, T., Ihira, M., Ohashi, M., Morooka, M., Suga, S., Asano, Y. & other authors. (2003). Evaluation of active human herpesvirus 6 infection by reverse transcription-PCR. *J Med Virol* 70, 267–272.
- Yoshikawa, T., Kato, Y., Ihira, M., Nishimura, N., Ozaki, T., Kumagai, T. & Asano, Y. (2011). Kinetics of cytokine and chemokine responses in patients with primary human herpesvirus 6 infection. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol* 50, 65–68.
- Zerr, D. M. (2006). Human herpesvirus 6 and central nervous system disease in hematopoietic cell transplantation. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol* 37 Suppl 1, S52–56.
- Zerr, D. M., Meier, A. S., Selke, S. S., Frenkel, L. M., Huang, M.-L., Wald, A., Rhoads, M. P., Nguy, L., Bornemann, R. & other authors. (2005a). A population-based study of primary human herpesvirus 6 infection. *N Engl J Med* 352, 768–776.
- Zerr, D. M., Corey, L., Kim, H. W., Huang, M.-L., Nguy, L. & Boeckh, M. (2005b). Clinical outcomes of human herpesvirus 6 reactivation after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 40, 932–940.
- Zerr, D. M., Fann, J. R., Breiger, D., Boeckh, M., Adler, A. L., Xie, H., Delaney, C., Huang, M.-L., Corey, L. & Leisenring, W. M. (2011). HHV-6 reactivation and its effect on delirium and cognitive functioning in hematopoietic cell transplantation recipients. *Blood* 117, 5243–5249.
- Zerr, D. M., Boeckh, M., Delaney, C., Martin, P. J., Xie, H., Adler, A. L., Huang, M.-L., Corey, L. & Leisenring, W. M. (2012). HHV-6 reactivation and associated sequelae after hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 18, 1700–1708.
- Zerr, D. M., Huang, M. L., Corey, L., Erickson, M., Parker, H. L. & Frenkel, L. M. (2000). Sensitive method for detection of human herpesviruses 6 and 7 in saliva collected in field studies. *J Clin Microbiol* 38, 1981–1983.
- Zerr, D. M., Gooley, T. A., Yeung, L., Huang, M. L., Carpenter, P., Wade, J. C., Corey, L. & Anasetti, C. (2001). Human herpesvirus 6 reactivation and encephalitis in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 33, 763–771.
- Zhen, Z., Bradel-Tretheway, B., Sumagin, S., Bidlack, J. M. & Dewhurst, S. (2005). The human herpesvirus 6 G protein-coupled receptor homolog U51 positively regulates virus replication and enhances cell-cell fusion in vitro. *J Virol* 79, 11914–11924.
- Zhou, Z. H., Stoops, J. K. & Krueger, G. R. (2006). Ultrastructure and Assembly of Human Herpesvirus-6. In *Hum Herpesvirus-6 2nd Ed*, Perspectives in Medical Virology, 2nd edn., pp. 11–21. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- Zou, P., Isegawa, Y., Nakano, K., Haque, M., Horiguchi, Y. & Yamanishi, K. (1999). Human herpesvirus 6 open reading frame U83 encodes a functional chemokine. *J Virol* 73, 5926–5933.

**ANNEXE 1 : PUBLICATIONS ISSUES DU TRAVAIL DE THESE**

**Article n°1**

Impact of stem cell graft on early viral infections and immune reconstitution  
after allogeneic transplantation in adults

Marina Illiaquer, Berthe-Marie Imbert-Marcille, Lucie Planche, Marie Rimbart, Céline Bressollette-Bodin, Thierry Guillaume, Amandine Le Bourgeois , Jacques Delaunay, Pierre Peterlin, Claire Le Houerou, Philippe Moreau, Mohamad Mohty , Patrice Chevallier

Article soumis dans *Haematologica*

IMPACT OF STEM CELL GRAFT ON EARLY VIRAL INFECTIONS AND IMMUNE RECONSTITUTION AFTER ALLOGENEIC TRANSPLANTATION IN ADULTS

Marina Illiaquer <sup>1-2</sup>, Berthe-Marie Imbert-Marcille <sup>1-2</sup>, Lucie Planche <sup>3</sup>, Marie Rimbart <sup>4</sup>, Céline Bressollette-Bodin <sup>1-2</sup>, Thierry Guillaume <sup>5</sup>, Amandine Le Bourgeois <sup>5</sup>, Jacques Delaunay <sup>5</sup>, Pierre Peterlin <sup>5</sup>, Claire Le Houerou <sup>5</sup>, Philippe Moreau <sup>5</sup>, Mohamad Mohty <sup>6</sup>, Patrice Chevallier <sup>5</sup>

<sup>1</sup>Virology laboratory, Nantes University Hospital, Nantes, France; <sup>2</sup>EA4271 « Immunovirology and genetic polymorphism », University of Nantes, Nantes, France; <sup>3</sup>Department of promotion for clinical research, Nantes University Hospital, Nantes, France; <sup>4</sup>Immunology laboratory, Nantes University Hospital, Nantes, France; <sup>5</sup>Department of Clinical Haematology, Nantes University Hospital, Nantes, France <sup>6</sup>Department of Clinical Haematology, Saint Antoine Hospital, Paris, France.

**Running head:** Viral infections and Immune Recovery afterallo-SCT.

**Words count:** Abstract, 245 words; Main text, 3998 words

**Number of figures: 2; Number of Tables: 3; Number of references: 50**

This study has been previously presented as a poster at the 55<sup>th</sup> Blood ASH Annual Meeting in New-Orleans, USA, in December 2013 (abstract : 3284)

**Correspondance to:**

Marina Illiaquer, PharmD, PhD student ; Service de Virologie, CHU Hotel Dieu, 9 quai Moncoussu, 44093 Nantes Cedex, France. Phone: (33) 240084122; Fax: (33) 240084139; E-Mail: marina.illiaquer@chu-nantes.fr

&Patrice Chevallier, MD, PhD; Service d'Hématologie Clinique, CHU Hotel-Dieu, Place A. Ricordeau, 44093 Nantes Cedex, France. Phone: (33) 240083271; Fax: (33) 240083250; E-Mail: patrice.chevallier@chu-nantes.fr

## **Abstract**

The main objective of this monocentric prospective study was to compare incidences of five opportunistic viral (HHV-6, CMV, EBV, ADV and BKPyV) reactivations in adults receiving either a double Umbilical Cord Blood (dUCB) allogeneic stem cell transplant (allo-SCT) or an unrelated peripheral blood stem cell (uPBSC) allo-SCT and using a reduced-intensity conditioning (RIC) regimen. Between December 2009 and August 2012, 65 consecutive patients were enrolled in the study (uPBSC n=34; dUCB n=31). During the 6-month follow-up period, main outcomes were not statistically different between both groups. Overall, 33 (51%), 24 (37%), 28 (43%), 29 (45%) and 4 (6%) patients experienced at least one positive PCR for HHV-6, EBV, CMV, BKPyV and ADV, respectively. Incidences of HHV-6 and BKPyV infections were significantly higher in the dUCB group (84% vs 21% and 58% vs 32%, respectively). In multivariate analysis, dUCB graft was the only independent factor associated with HHV-6 (OR: 19.0; 95%CI: 5.2–69.1;  $p < 0.0001$ ). Conversely, PBSC RIC allo-SCT using antithymocyte globulines as GVHD prophylaxis was significantly associated with EBV reactivation (OR: 29.9; 95%CI: 5.68–158,  $p < 0.0001$ ). Incidences of CMV reactivation were similar between both groups while ADV reactivation developed only in the dUCB group. Finally, significant higher median counts and faster recoveries of B lymphocytes ( $p < 0.0001$ ) and monocytes ( $p = 0.0007$ ) were observed in the dUCB group. In conclusion, we demonstrated strong correlations between source of graft and some viral reactivations and the pattern of immune reconstitution after RIC allo-SCT. The mechanisms responsible for that remain to be elucidated.



## **Introduction**

Over the last decades, umbilical cord blood (UCB) have become a well-established alternative source of hematopoietic stem cells (HSC) in patients without available bone marrow or peripheral blood stem cell (PBSC) grafts.<sup>1</sup> Because of lower quantity of HSC and naïve status of T cells infused, UCB allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) can be associated with delayed engraftment, poor immune reconstitution (IR), and higher incidence of opportunistic infections compared to transplants using conventional sources of HSC.<sup>2,3</sup>

Five main opportunistic viruses cause complications after allo-SCT, all being double-stranded DNA viruses: the herpesviruses, human Cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr Virus (EBV) and Human Herpesvirus 6 (HHV-6); one polyomavirus, BK polyomavirus (BKPyV) and adenovirus (ADV).<sup>2</sup> Seroprevalences for these viruses are high in adults (> 90%), except for CMV, for which seroprevalence varies between 45-90%.<sup>4</sup> Viral infections and diseases are the consequence of delayed IR post-graft and remain a matter of concern as there are associated with high morbidity and mortality rates<sup>5,6</sup>. HHV-6 can be responsible for encephalitis, interstitial pneumonitis, fever, cutaneous rash, delayed engraftment or severe graft-versus-host-disease (GVHD)<sup>7</sup> while CMV is associated mainly with colitis, retinitis, meningo-encephalitis and pneumonia,<sup>8</sup> EBV with lymphoproliferative diseases,<sup>9</sup> BKPyV with hemorrhagic cystitis<sup>10</sup> (BKPyV-HC) and ADV with fever, diarrhea, hepatitis, pneumonia and cystitis.<sup>11</sup>

So far, knowledge about epidemiology and risk factors for viral infections after allo-SCT is still limited. Besides changing defects in the immune status, the role of HSC source on viral reactivations remains poorly studied. Comparative studies reporting on one or two viral reactivations or on IR alone are still the rule, making difficult to reach any strong definitive conclusion.<sup>2</sup> In an effort to better define the impact of alternative HSC source on viral

reactivations and IR after allo-SCT, we conducted a retrospective analysis in 2009, showing that HHV-6 reactivations were more frequently observed after double UCB (dUCB) than after unrelated PBSC (uPBSC) allo-SCT, while no correlation could be established for CMV or EBV. Also, in term of IR, higher counts of B lymphocytes were documented using dUCB while CD8+ T-cells counts were higher using PBSC as HSC source, that, up to 9 and 6 months post-transplant, respectively.<sup>12</sup> Since, the specific relationship between HHV-6 and dUCB transplant has been also widely reported.<sup>13–16</sup>

To confirm our data, we conducted the first prospective study comparing IR and the pattern of viral reactivations mentioned above after allo-SCT in patients receiving either a dUCB or uPBSC allo-SCT after a reduced intensity conditioning (RIC) regimen, which is currently the main type of regimen used in adults, at least in France.<sup>17</sup>

## **Patients and methods**

### *Inclusion criteria and study design*

This was a monocentric prospective study conducted over a 3-year period at the CHU of Nantes. All consecutive adult patients (>18 years old) programmed to receive either a dUCB allo-SCT or an uPBSC allo-SCT after a RIC regimen were proposed to participate to the study. All types of disease, disease status or RIC regimens<sup>18</sup> were permitted. The main objective was to compare concomitantly between both groups (dUCB vs uPBSC) the incidences of 5 viral infections/diseases (HHV-6, CMV, EBV, ADV and BKPyV), up to 6 months post-transplant, and to evaluate the impact of viral infections on clinical symptoms (fever, skin rash, respiratory symptoms, meningeal syndrome, digestive or urinary symptoms) and other outcomes (neutrophils and platelets recoveries, relapse, survivals, acute GVHD). Due to relative short follow-up, chronic GVHD, overall and the disease free survivals were

not considered in this study. The secondary objective was to compare IR, up to 6 months post-transplant. Whole blood (WB) samples for virological and immunological analyses were collected at transplant, every 15 days during the first 3 months and then at 4, 5 and 6 months post-transplant (10 samples/patient). All patients provided informed consent, and the study was approved by the review board of Nantes University Hospital.

### *Definitions*

#### *Hematopoietic recovery, engraftment and GVHD*

Neutrophil and platelet recoveries were defined as the first day with an absolute neutrophil count of  $>0.5$  Giga/L of blood and a platelet count of  $>50$  Giga/L of blood without transfusion support. Engraftment was defined as sustained neutrophil recovery with donor chimerism  $>5\%$  (both units combined for dUCB patients). Acute GVHD were diagnosed and graded according to the standard Seattle criteria.<sup>19</sup>

#### *Viremia, Viral Infection, Viral Disease, EBV-related lymphoma, antiviral treatment*

Viral reactivation was defined as any positive PCR whatever the viral load (VL) in WB. An active infection was defined by at least one positive PCR with a VL  $>3 \log_{10}$  number of viral DNA copies ( $\log_{10}\text{cop}$ ) per mL of WB/ $10^6$  cells or  $/10^5$  cells according to virus type, see below) or two consecutive PCR with a VL  $> 2 \log_{10}\text{cop}$ .

Viral disease was defined as any detection of virus by PCR or immunohistochemistry in normally virus-free body fluids or organ tissues, together with symptoms and/or signs from the affected organ.<sup>5,20,21</sup> EBV-related lymphoma was defined as biopsy proven lymphoma or EBV reactivation along with computerized tomography nodal or soft-tissue abnormalities consistent with lymphoproliferative disorder.<sup>6</sup> Antiviral strategy was applied according the European Conference on Infections in Leukemia (ECIL) guidelines.<sup>5,6,20</sup>

### *Viral monitoring after transplant*

Briefly, total nucleic acids were extracted from 200 µL of WB with a QIAAsymphony<sup>®</sup> instrument and the QIAAsymphony<sup>®</sup> DNA mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. Virus DNA quantifications were performed using in-house real-time procedures adapted from previously described protocols.<sup>22–25</sup> HHV-6 (U65-66 gene), CMV (US8 gene), EBV (BNRF-1 gene), ADV (protein of capsid gene) and BKPyV (large T antigen gene) DNA were quantified from 5 µL of DNA extract and VL were expressed log<sub>10</sub>cop per mL of WB for HHV-6, ADV and BKPyV or per 10<sup>6</sup> and 10<sup>5</sup> cells, respectively, in WB for CMV and EBV. All PCR were performed using the Taqman<sup>®</sup> Gene Expression Mastermix (Applied Biosystem<sup>®</sup>, USA) on a Rotorgene<sup>®</sup> (Corbett Life, Sydney, Australia).

### *Immune monitoring after transplant*

Complete blood counts were assessed for each patient by a standard numeration obtained from an automate analyser (XE2100, Sysmex). The CD3<sup>+</sup> T cells (normal range: 0.9–1.8 Giga/L), the CD4<sup>+</sup> (normal range: 0.5–1.2 Giga/L) and CD8<sup>+</sup> T (normal range: 0.3–0.7 Giga/L) cell subsets, the CD19<sup>+</sup> B cells (normal range: 0.1–0.4 Giga/L) and the CD56<sup>+</sup> NK cells (normal range: 0.1–0.4 Giga/L) were quantified by flow cytometry. Absolute counts of lymphocytes were determined using BD Multitest<sup>™</sup>CD3/CD8/CD45/CD4 or BD Multitest<sup>™</sup>CD3/CD19/CD16+56/CD45 in BD Trucount<sup>™</sup> Tubes (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

### *Statistical analysis*

Patients' characteristics, transplant-related events and association of each viral infection with relevant variables were evaluated by univariate analysis, using either the Khi2 test or the two-tailed test Fisher's exact test, for proportions, and the Wilcoxon test, for quantitative data.

Risk factors for developing viral reactivations associated with a p value <.20 on univariate analysis were included in the final logistic regression model for multivariate analysis. Only engrafted patients were considered for immune reconstitution, which was analysed using mixed linear models. A p value <0.05 was considered as statistically significant. All statistical analyses were performed using SAS 9.3 (SAS Institute Inc., NC, USA).

## **Results**

### *Patients*

Between December 2009 and August 2012, 65 consecutive patients were enrolled in the study, 34 receiving an uPBSC RIC allo-SCT and 31 a dUCB RIC allo-SCT. Characteristics of patients (**Table 1**) were similar between both groups except the higher use of rabbit antithymocyte globuline (ATG) in the uPBSC group and the lower number of HSC infused in the dUCB group. Also, types of RIC regimen and GVHD prophylaxis were different. In the uPBSC group, patients received either a FB2A2<sup>26</sup> or a CLOB2A2<sup>27</sup> RIC regimens. In the dUCB group, all patients but 2, received the so-called TCF-RIC regimen developed by the Minneapolis team.<sup>28</sup> The same regimen was used in 2 other cases but combined with a 5 mg/Kg single dose of thiotepa.<sup>29</sup> Details of RIC regimens and GVHD prophylaxis is given in **Table 1**.

### *Outcomes (Table 2)*

The rate of engraftment and the incidences of acute GVHD, relapse and death, during the 6-month follow-up period were similar between both groups. As expected, the median times to neutrophil and platelet recoveries were significantly higher in the dUCB group.

*Viral reactivation, infection and disease, risk factors and influence on outcome.*

*1- Overall data*

A total number of 608 samples (uPBSC group, n=312; dUCB group, n=296) were analysed. Collection of samples has been complete for a large majority of patients (median: 10 samples/patient; range: 5-10). Among the whole cohort (n=65), 33 (51%), 24 (37%), 28 (43%), 29 (44%) and 4 (6%) patients experienced at least one positive PCR for HHV-6, EBV, CMV, BKPyV and ADV, respectively. Only 6 (9%) patients, mainly in the uPBSC group (n=5), showed none of these viral reactivations. Also, 16 (25%), 30 (46%), 10 (15%) and 3 (5%) reactivated 1, 2, 3 and 4 viruses, respectively. In all, 26 (40%), 28 (43%) and 1 (2%) patients presented one, two or three herpesvirus reactivations. No association between viral infections each other or between viral infection and acute GVHD or death were established. For each viral infection, comparisons between both groups of number of infected patients and of positive samples/overall samples, median positive samples/patient and median VL are given in **Table 3**.

*2- HHV-6, BKPyV and Adenovirus infections are associated with dUCB RIC transplant*

HHV-6 reactivation occurred in 38/65 (59%) patients at a median 0.9 month post-transplant (range: 0.8–1.0). Thirty-three (52%) cases were considered as HHV-6 infected. The incidence of HHV-6 infection was significantly higher in the dUCB group (84% vs 21%;  $p < 0.0001$ ) (**Figure 1A**) lasting a longer period of time in this group (median: 148 vs 31 days;  $p < 0.0001$ ). Indeed, at 6 months post-transplant, persistence of HHV-6 infection was documented in 73% of patients (n=19/26) in the dUCB group vs 0% in the uPBSC group ( $p < 0.0001$ ).

No case of HHV-6 disease was observed in both groups but one dUCB patient was treated pre-emptively with ganciclovir because of high HHV-6 VL in order to avoid clinical manifestations.

In univariate analysis, factors associated with HHV-6 infection were the use of dUCB graft (Odds ratio [OR]: 19.3; 95% confidence interval [CI]: 5.42–68.7;  $p < 0.0001$ ) and no ATG administration (OR: 9.00; 95%CI: 2.81–28.9;  $p = 0.0002$ ). Nevertheless, because dUCB and no ATG administration are linked in our study, ATG was not considered for multivariate analysis. Thus, use of dUCB graft remained the only independent risk factor for HHV-6 infection (OR: 19.0; 95%CI: 5.2–69.1;  $p < 0.0001$ ).

HHV-6 infections were responsible for significant delay of neutrophil and platelets recoveries (median: 20 vs 15 days in the uPBSC group,  $p = 0.002$ ; and 40 vs 12 days;  $p < 0.0001$ , respectively), especially when they occurred before the end of aplasia (neutrophils: 28 vs 17 days;  $p = 0.0054$ , and platelets: 56 vs 15 days;  $p = 0.0004$ ). The delayed recoveries were accordingly associated with a higher need for red blood cells and platelet transfusions in infected patients (median number of transfused units/patient: 8 vs 2;  $p = 0.006$  and 11 vs 1;  $p < 0.0001$ , respectively).

BKPyV reactivation occurred in 29/65 (45%) patients at a median of 1.6 months (range: 1.1–2.6) post-transplant with a significant higher incidence in the dUCB group (58% vs 32%;  $p = 0.03$ ) (**Figure 1B**). BKPyV infection also tended to last longer in the dUCB group (median: 54 vs 31 days,  $p = 0.07$ ).

Ten patients (15%; dUCB  $n = 6$ , uPBSC  $n = 4$ ) were documented with BKPyV-HC. They were managed for pain and received intravenous immunoglobulines and hyperhydration while only 2 patients received cidofovir: one for BKPyV disease alone and one for concomitant BKPyV disease and ADV infection. All patients had favourable evolution.

In univariate analysis, use of dUCB graft was the only risk factor associated with BKPyV infection (uPBSC vs dUCB, OR: 0.35; 95%CI: 0.13–0.95;  $p = 0.039$ ). However, the

multivariate analysis showed no independent risk factor for BKPyV infection, especially the HSC source.

ADV reactivation occurred in 4/65 (6%) patients all in the dUCB group at variable times post-transplant (d+62, d+80, d+160 and d+175). Three of them were considered as ADV infected, 2 presented ADV disease. Two patients received cidofovir, one for ADV disease and one for concomitant ADV infection and BKPyV disease. The third one was already in palliative care because of relapse. Considering the low incidence of ADV infection, no statistical analyses were performed in this setting.

### *3- EBV infections are associated with uPBSC RIC allo-SCT*

EBV reactivation occurred in 32/65 (49%) patients at a median of 2.8 months (range: 1.4-5.5) post-transplant with a higher incidence in the uPBSC group (71% vs 26%; p=0.0003) (**Figure 1C**).

Five patients in the uPBSC group were documented with EBV infection and received pre-emptive therapy by rituximab. Two cases, one in each group, received curative chemotherapy for EBV-related lymphoma with favourable evolution.

In univariate analysis, factors associated with EBV reactivation were the use of uPBSC graft (OR: 6.90; 95%CI: 2.32-20.6; p=0.0005) and ATG (No vs Yes, OR: 0.12; 95%CI: 0.04-0.38; p=0.0003). However, as previously described, the use of ATG was closely linked to the type of graft. Thus, in the multivariate analysis, independent risk factors for EBV infection remained the use of uPBSC or ATG (OR: 29.9; 95%CI: 5.68–158; p< 0.0001), a myeloid disease (OR: 12.2; 95%CI: 2.43–61.3; p=0.002) and a younger age (< median) at transplant (OR: 0.90; 95%CI: 0.84–0.96]; p= 0.002).



*4- CMV infections have the same incidences in both groups*

CMV reactivation occurred in 24/65 (37%) patients at a median of 1.4 months (range: 0.4-2.5) post-transplant with the same incidence between both groups (**Figure 1D**).

CMV infection occurred in 15 patients (uPBSC, 26% vs dUCB, 19%; p=0.49) who received pre-emptive therapy by ganciclovir or foscavir. Three patients (PBSC n=2, UCB n=1) presented with CMV disease (one colitis, one colitis plus encephalitis and one disseminated CMV infection) and were treated with curative therapy. Among the 18 patients treated, 1 dUCB patient died of this infection but in a multi-infections context. Seven out of these 18 patients (including 5 dUCB patients) presented also concomitantly an HHV-6 infection and remained HHV-6 positive during anti CMV therapy.

As expected, the patients at risk of CMV reactivation/infection were those presenting a positive CMV serology at time of graft (CMV+: n=22/27, 81.4% vs CMV-: n=2/38, 5.3%, p<0.0001). In univariate analysis, the only factor associated with CMV reactivation/infection was an older age (>median) at time of transplantation (OR: 1.08; 95%CI: 1.02-1.1; p=0.0077).

*Immune reconstitution and comparison between both groups (Figure 2)*

Immune reconstitution was considered only in engrafted patients (dUCB= 27; uPBSC n=33).

A total number of 533 samples (uPBSC group, n=284; dUCB group, n=249) was analysed (median: 8 samples/patient; range: 3-10).

The median absolute number of total T lymphocytes remained below the normal range in both groups during the 6-month follow-up period. The same result was observed for median CD4+ T cells counts in both groups and for CD8+ T cells count in the dUCB group. A significant higher median CD3+ T-cells count was observed in the uPBSC group only at day +60 (**Figure 2A**). Median CD4+ T-cells counts were significantly higher in the dUCB group between days+ 30 and +45 and between days +90 and +180 (**Figure 2B**).

Reconstitution of CD8+ T-cells was faster for the uPBSC group which reached normal range as soon as day +90 (while it was day +180 for the dUCB group). Median CD8+ T-cells counts were significantly higher in the uPBSC group between days +60 and +90 (**Figure 2C**).

Conversely, reconstitution of CD19+ B-cells was faster in the dUCB group, reaching normal value as soon as day +60 and expanding above the normal value between days +75 and +180 post-transplant. Normal value of CD19+ lymphocytes was reached only at day +180 in the uPBSC group and median counts remained significantly lower between days +75 and +180 compared to the dUCB group (**Figure 2D**).

NK cells were the first lymphocyte subset to reconstitute after allo-SCT and normal counts were reached as soon as day +30 in both groups. Median counts remained comparable all along the 6-months follow-up period between the two groups (**Figure 2E**).

Finally, median monocytes counts were all along comprised in the normal range for the PBSC group, except at day +15 (above the normal upper value). In the UCB group, monocytes counts were in the normal value during the first month post-transplant then remained above or in the upper normal value up to day+180. Median monocyte counts were significantly higher in the dUCB group at day +45 and from day +75 until day +150 (**Figure 2F**).

Overall, considering the 6-months follow-up period and using a mixed linear model, significant higher median counts (and faster recoveries) of B lymphocytes ( $p < 0.0001$ ) and monocytes ( $p = 0.0007$ ) were observed in the dUCB group while there were only a trend for higher median counts of CD4+ T-cells in the dUCB group ( $p = 0.09$ ) and a higher median counts of CD8+ T-cells in the uPBSC group ( $p = 0.06$ ).

## Discussion

Here we evaluated the impact of alternative UCB as HSC source on IR and incidences of five main opportunistic viral infections encountered after allo-SCT. For the purpose of the study, two homogeneous cohorts of adult patients were prospectively compared, differing only by the type of graft, dUCB or uPBSC. While cumulative incidences of engraftment, relapse, acute GVHD and mortality were similar between both groups, confirming previous results,<sup>28,30,31</sup> we could demonstrate strong correlation between type of graft and predominance of some viral infections or pattern of IR. The two most significant results were the association observed between dUCB and HHV-6 reactivation and between uPBSC and EBV reactivation.

Considering the former, we have in fact prospectively confirmed the high rate (here 84% of patients) of HHV-6 infection observed after dUCB allo-SCT.<sup>12,13,15,16</sup> HHV-6 reactivations occur within the first month post-transplant, persist in most patients during the first year, and can last up to 4 years in half of the patients after dUCB allo-SCT, as recently reported by our group.<sup>32</sup> This phenomenon remains unexplained. It is postulated that HHV6 originates from the reactivation of endogenous HHV6 as no detection of the virus is documented in CB graft.<sup>12</sup> Also, HHV-6 reactivation after allo-SCT is the fact only of HHV-6B species (and not of HHV-6A species) and CD4+T cells are the main targets of the virus.<sup>33</sup> OX-40 (CD134) has been recently described as the HHV-6B cell receptor,<sup>34</sup> which may play a role in terms of higher reactivation of HHV-6 after CB transplant. Further investigations are needed to investigate a potential difference of OX-40 expression according to the type of graft. However, the particular IR seen after UCB allo-SCT with faster B lymphocytes and monocytes recoveries but no differences in term of CD4+ T cells counts do not allow to explain higher HHV-6 reactivation after UCB transplant. A yet unknown factor in the CB graft<sup>35</sup> or some specific features during IR would exacerbate the reactivation of HHV6.

Clinical consequences of HHV-6 infections are debated as only few HHV-6 diseases are documented in comparison to the high incidence of this viral infection seen after UCB transplant.<sup>16</sup> It is well recognized that impact of HHV-6 reactivation is mainly observed early after transplant, demonstrated by significant delayed engraftment and higher need of red blood and platelets transfusions in patients.<sup>12,36–38</sup> Other teams reported higher incidence of transplant-related mortality or HHV-6 encephalitis in patients reactivating HHV-6 after CB transplant.<sup>14,15</sup> The absence of such complications in our dUCB cohort may be explained in part by the intensity of the conditioning regimen or the particular type of RIC regimen used here.<sup>16,38</sup> Indeed, deleterious impact of HHV-6 reactivation has been mainly described after myeloablative regimen, and thereafter in children, where this type of regimen is predominant.<sup>39</sup> Also, almost all of our patients received the TCF RIC regimen developed by the Minneapolis team more than a decade ago, which is the standard RIC regimen currently used for dUCB allo-SCT in adults.<sup>31</sup> It has the particularity to not contain ATG which has been described as deleterious after UCB transplant in term of survivals as well as non-relapse mortality.<sup>40</sup> ATG has been associated with severe EBV infections after UCB transplant, in studies where HHV-6 reactivations were not monitored.<sup>41</sup> The recent study by Olson *et al.* (2014), demonstrated that the risk of HHV-6 encephalitis in dUCB transplanted patients may be also due to ATG administration.<sup>42</sup> As a consequence, ATG is not recommended anymore for GVHD prophylaxis in the setting of CB transplant.

Finally, as previously reported,<sup>12,16,38</sup> HHV-6 reactivation was not associated with other virus reactivations, especially CMV, although these two herpesviruses are pretty close belonging to the same  $\beta$ -*Herpesvirinae* subfamily and sharing similar target cells such as monocytes and bone marrow progenitors.<sup>4,33</sup> Thus, the fact that CMV reactivation doesn't depend on HSC source as demonstrated here and by others<sup>43</sup> highlights even more the particular correlation which exists between the use of CB graft and HHV-6 reactivation.

Of note, incidence of CMV reactivation in our cohort was relatively low compared to others studies, especially after UCB transplant,<sup>44</sup> but it has to be kept in mind that CMV seroprevalence is particularly low in the West of France (around 30% of the population). CMV reactivation was correlated with CMV positive status before transplant as previously reported.<sup>43</sup>

Interestingly, we prospectively confirm that BKPyV reactivations are significantly associated with dUCBT allo-SCT.<sup>10</sup> If ATG may be also a risk factor,<sup>45</sup> this was not the case here. The direct role of CB grafts on BKPyV reactivation remains unclear but decreased quantitative and qualitative BKPyV-specific immunity may both explain the defecting control of BKPyV reactivation as well as the fact that most patients are asymptomatic after transplant, as previously described.<sup>21</sup> Indeed, further mucosal damage and haemorrhage in the genitourinary tract, which are thought to be induced by anti-BKPyV cytotoxic T lymphocytes,<sup>21</sup> may be decreased because of lower counts or lower functionality of these cells after UCB transplant.

ADV reactivations were only detected in the dUCB group with a low incidence, as previously reported.<sup>11</sup> Here again, this association remains unclear. For example it is not explain by a higher CD46 expression on CB graft cells,<sup>46</sup> CD46 being a cell receptor for ADV.

Regarding EBV reactivation, a close association was found with the use of PBSC as HSC source. This correlation has not been found significant in our previous report<sup>12</sup>, probably because of a very heterogeneous cohort of patients and the retrospective setting of the study. In fact, EBV reactivation may be due rather to the use of ATG in this group, as it has been well identified as the main risk factor for EBV infections and EBV post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD) both after PBSC<sup>9</sup> and CB<sup>41</sup> grafts, when comparing with regimens not incorporating ATG. However, rituximab seems to offer a good balance between efficacy and toxicity in order to avoid EBV-PTLD when EBV reactivation is detected.<sup>9</sup>

Finally, the majority of patients were documented with several viral reactivations after transplant. This point strengthens the clinical relevance to develop some alternative therapeutic like the rapid generation of multiple virus-specific T-cells, method recently developed by Papadopoulou *et al.*,<sup>47</sup> allowing to treat distinct viral infections at the same time. Regarding IR, although all patients were documented with persistent overall lymphopenia, the most significant result was the faster recovery and higher counts of B lymphocytes documented after dUCB. This phenomenon has been reported before<sup>48,49</sup> and persist for a long period of time, as reported by us in a recent study.<sup>32</sup> One of possible mechanism for that could be a higher BAFF (B-cell activating receptor) secretion after UCB transplant.<sup>49</sup> BAFF, which is a member of the tumor necrosis factor (TNF) family, has been shown to play a critical role in B-cells recovery following myeloablation.<sup>49</sup> It is possible that more prompt recovery of B-cells may compensate for early higher T-cell deficits seen after UCB transplant.<sup>48</sup> The same could be hypothesized regarding faster recovery and higher counts of monocytes in the UCB group. Monocytes recovery has not yet been studied in the setting of UCB transplant, but it would be interesting to confirm our results as early higher monocytes count has been associated with significant better outcomes in the PBSC setting.<sup>50</sup> Of note, significant higher CD8+ T-cells counts recoveries were not confirmed here after PBSC allo-SCT.<sup>12</sup>

In conclusion, we demonstrated strong associations between type of graft and some viral reactivations and the pattern of immune reconstitution after RIC allo-SCT. The mechanisms responsible for that remain to be elucidated.

**Acknowledgements:**

This work was supported by two grants funded by the Laurette Fugain Association.

**Authorship contributions**

M. I., P. C., and B.M.I. designed, performed, and coordinated the research, collected, analyzed, interpreted the data, and wrote the manuscript.

L. P. performed the statistical analyses.

M.R., C.B.B., T. G., J.D., P.P., C. LH., P.M., and M.M. contributed data and commented on the manuscript.

**Conflicts of interest:**

The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Ballen KK, Gluckman E, Broxmeyer HE. Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. *Blood*. 2013;122(4):491–8.
2. Danby R, Rocha V. Improving engraftment and immune reconstitution in umbilical cord blood transplantation. *Front Immunol*. 2014;5:68.
3. Parody R, Martino R, Rovira M et al. Severe infections after unrelated donor allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adults: comparison of cord blood transplantation with peripheral blood and bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2006;12(7):734–48.
4. Crough T, Khanna R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(1):76–98.
5. Ljungman P, de la Camara R, Cordonnier C, et al. Management of CMV, HHV-6, HHV-7 and Kaposi-sarcoma herpesvirus (HHV-8) infections in patients with hematological malignancies and after SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2008;42(4):227–40.
6. Styczynski J, Reusser P, Einsele H, et al. Management of HSV, VZV and EBV infections in patients with hematological malignancies and after SCT: guidelines from the Second European Conference on Infections in Leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 2009;43(10):757–70.
7. de Pagter PJ, Schuurman R, Meijer E, van Baarle D, Sanders EAM, Boelens JJ. Human herpesvirus type 6 reactivation after haematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Virol*. 2008;43(4):361–6.
8. Ljungman P, Hakki M, Boeckh M. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2011;25(1):151–69.
9. Peric Z, Cahu X, Chevallier P, et al. Features of Epstein-Barr Virus (EBV) reactivation after reduced intensity conditioning allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2011;25(6):932–8.
10. Silva L de P, Patah PA, Saliba RM, et al. Hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic stem cell transplants is the complex result of BK virus infection, preparative regimen intensity and donor type. *Haematologica*. 2010;95(7):1183–90.
11. Robin M, Marque-Juillet S, Scieux C, et al. Disseminated adenovirus infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: incidence, risk factors and outcome. *Haematologica*. 2007;92(9):1254–7.
12. Chevallier P, Hebia-Fellah I, Planche L, et al. Human herpes virus 6 infection is a hallmark of cord blood transplant in adults and may participate to delayed engraftment: a comparison with matched unrelated donors as stem cell source. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45(7):1204–11.
13. Yamane A, Mori T, Suzuki S, et al. Risk factors for developing human herpesvirus 6 (HHV-6) reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and its association with central nervous system disorders. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007;13(1):100–6.
14. Scheurer ME, Pritchett JC, Amirian ES, Zemke NR, Lusso P, Ljungman P. HHV-6 encephalitis in umbilical cord blood transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Bone Marrow Transplant*. 2012; 13(1):100-6.



15. Hill JA, Koo S, Guzman Suarez BB, et al. Cord-Blood Hematopoietic Stem Cell Transplant Confers an Increased Risk for Human Herpesvirus-6-Associated Acute Limbic Encephalitis: A Cohort Analysis. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2012; 18(11):1638-48.
16. Jeulin H, Agrinier N, Guery M, et al. Human herpesvirus 6 infection after allogeneic stem cell transplantation: incidence, outcome, and factors associated with HHV-6 reactivation. *Transplantation*. 2013;95(10):1292–8.
17. Blaise D, Castagna L. Do different conditioning regimens really make a difference? *Hematol Educ Program Am Soc Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:237–45.
18. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, et al. Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2009;15(12):1628–33.
19. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation*. 1974;18(4):295–304.
20. Matthes-Martin S, Feuchtinger T, Shaw PJ, et al. European guidelines for diagnosis and treatment of adenovirus infection in leukemia and stem cell transplantation: summary of ECIL-4 (2011). *Transpl Infect Dis*. 2012;14(6):555–63.
21. Dropulic LK, Jones RJ. Polyomavirus BK infection in blood and marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2008;41(1):11–8.
22. Gautheret-Dejean A, Manichanh C, Thien-Ah-Koon F, et al. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of human herpesvirus-6 infection and application to bone marrow transplant patients. *J Virol Methods*. 2002;100(1-2):27–35.
23. Bressollette-Bodin C, Coste-Burel M, Besse B, André-Garnier E, Ferre V, Imbert-Marcille B-M. Cellular normalization of viral DNA loads on whole blood improves the clinical management of cytomegalovirus or Epstein Barr virus infections in the setting of pre-emptive therapy. *J Med Virol*. 2009;81(1):90–8.
24. Bressollette-Bodin C, Coste-Burel M, Hourmant M, Sebille V, Andre-Garnier E, Imbert-Marcille BM. A prospective longitudinal study of BK virus infection in 104 renal transplant recipients. *Am J Transplant*. 2005;5(8):1926–33.
25. Heim A, Ebnet C, Harste G, Pring-Akerblom P. Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. *J Med Virol*. 2003;70(2):228–39.
26. Oudin C, Chevallier P, Furst S, et al. Reduced-toxicity conditioning prior to allogeneic stem cell transplantation improves outcome in patients with myeloid malignancies. *Haematologica*. 2014;99(11):1762–8.
27. Chevallier P, Labopin M, Socié G, et al. Results from a clofarabine-busulfan containing reduced-toxicity conditioning regimen prior to allogeneic stem cell transplantation: the phase II prospective CLORIC trial. *Haematologica*. 2014; 99(9):1486-91.
28. Brunstein CG, Eapen M, Ahn KW, et al. Reduced-intensity conditioning transplantation in acute leukemia: the effect of source of unrelated donor stem cells on outcomes. *Blood*. 2012;119(23):5591–8.

29. Ponce DM, Sauter C, Devlin S, et al. A novel reduced-intensity conditioning regimen induces a high incidence of sustained donor-derived neutrophil and platelet engraftment after double-unit cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2013;19(5):799–803.
30. Le Bourgeois A, Mohr C, Guillaume T, et al. Comparison of outcomes after two standards-of-care reduced-intensity conditioning regimens and two different graft sources for allogeneic stem cell transplantation in adults with hematologic diseases: a single-center analysis. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2013;19(6):934–9.
31. Brunstein CG, Barker JN, Weisdorf DJ, et al. Umbilical cord blood transplantation after nonmyeloablative conditioning: impact on transplantation outcomes in 110 adults with hematologic disease. *Blood.* 2007;110(8):3064–70.
32. Illiaquer M, Malard F, Guillaume T, et al. Long-lasting HHV-6 reactivation in long-term adult survivors after double umbilical cord blood allogeneic stem cell transplantation. *J Infect Dis.* 2014;210(4):567–70.
33. Agut H, Bonnafous P, Gautheret-Dejean A. Laboratory and Clinical Aspects of Human Herpesvirus 6 Infections. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(2):313–35.
34. Tang H, Serada S, Kawabata A, et al. CD134 is a cellular receptor specific for human herpesvirus-6B entry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(22):9096–9.
35. Chevallier P, Robillard N, Illiaquer M, et al. Characterization of various blood and graft sources: a prospective series. *Transfusion (Paris).* 2013;53(9):2020–6.
36. Imbert-Marcille BM, Tang XW, Lepelletier D, et al. Human herpesvirus 6 infection after autologous or allogeneic stem cell transplantation: a single-center prospective longitudinal study of 92 patients. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2000;31(4):881–6.
37. Boutolleau D, Fernandez C, André E, et al. Human herpesvirus (HHV)-6 and HHV-7: two closely related viruses with different infection profiles in stem cell transplantation recipients. *J Infect Dis.* 2003;187(2):179–86.
38. Dulery R, Salleron J, Dewilde A, et al. Early human herpesvirus type 6 reactivation after allogeneic stem cell transplantation: a large-scale clinical study. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18(7):1080–9.
39. de Pagter PJA, Schuurman R, Keukens L, et al. Human herpes virus 6 reactivation: important predictor for poor outcome after myeloablative, but not non-myeloablative allo-SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2013; 48(11):1460-4.
40. Pascal L, Mohty M, Ruggeri A, et al. Impact of rabbit ATG-containing myeloablative conditioning regimens on the outcome of patients undergoing unrelated single-unit cord blood transplantation for hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant.* 2015;50(1):45–50.
41. Brunstein CG, Weisdorf DJ, DeFor T, et al. Marked increased risk of Epstein-Barr virus-related complications with the addition of antithymocyte globulin to a nonmyeloablative conditioning prior to unrelated umbilical cord blood transplantation. *Blood.* 2006;108(8):2874–80.
42. Olson AL, Dahi PB, Zheng J, et al. Frequent human herpesvirus-6 viremia but low incidence of encephalitis in double-unit cord blood recipients transplanted without antithymocyte globulin. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20(6):787–93.

43. Walker CM, van Burik J-AH, De For TE, Weisdorf DJ. Cytomegalovirus infection after allogeneic transplantation: comparison of cord blood with peripheral blood and marrow graft sources. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007;13(9):1106–15.
44. Matsumura T, Narimatsu H, Kami M, et al. Cytomegalovirus infections following umbilical cord blood transplantation using reduced intensity conditioning regimens for adult patients. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007;13(5):577–83.
45. Gaziev J, Paba P, Miano R, et al. Late-onset hemorrhagic cystitis in children after hematopoietic stem cell transplantation for thalassemia and sickle cell anemia: a prospective evaluation of polyoma (BK) virus infection and treatment with cidofovir. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010 May;16(5):662–71.
46. Chevallier P, Robillard N, Illiaquer M, et al. HHV-6 cell receptor CD46 expression on various cell subsets of six blood and graft sources: a prospective series. *J Clin Virol.* 2013;56(4):331–5.
47. Papadopoulou A, Gerdemann U, Katari UL, et al. Activity of broad-spectrum T cells as treatment for AdV, EBV, CMV, BKV, and HHV6 infections after HSCT. *Sci Transl Med.* 2014;6(242):242ra83.
48. Kanda J, Chiou L-W, Szabolcs P, et al. Immune recovery in adult patients after myeloablative dual umbilical cord blood, matched sibling, and matched unrelated donor hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18(11):1664–76.
49. Jacobson CA, Turki AT, McDonough SM, et al. Immune reconstitution after double umbilical cord blood stem cell transplantation: comparison with unrelated peripheral blood stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18(4):565–74.
50. Le Bourgeois A, Lestang E, Guillaume T, et al. Prognostic impact of immune status and hematopoietic recovery before and after fludarabine, IV busulfan, and antithymocyte globulins (FB2 regimen) reduced-intensity conditioning regimen (RIC) allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT). *Eur J Haematol.* 2013;90(3):177–86.

**Table 1. Characteristics of Patients.**

	uPBSC group (n=34)	dUCB group (n=31)	p-value
<i>Gender: male, n (%)</i>	21 (61.8)	19 (61.3)	NS
<i>Median age at transplant: years (range)</i>	60 (26-70)	54 (22-70)	NS
<i>Median interval between diagnosis and transplant: months (range)</i>	10.5 (3 - 255)	12 (4 - 187)	NS
<i>Type of Disease, n (%)</i>			
Acute myeloid leukemia	9 (26.5)	15 (48.4)	NS
Acute lymphoblastic leukemia	8 (23.5)	1 (3.2)	
Myelodysplastic syndrome	5 (14.7)	5 (16.1)	
Non-Hodgkin lymphoma	5 (14.7)	6 (19.3)	
Hodgkin lymphoma	2 (5.6)	3 (9.7)	
Myeloproliferative syndrome	2 (5.6)	1 (3.2)	
Myeloma	2 (5.6)	0	
Chronic lymphoid leukemia	1 (2.3)	0	
<i>Status at allo-SCT</i>			
First complete remission	13	13	NS
Second/third complete remission	9	8	
Active disease	12	10	
<i>HLA matching<sup>a</sup>, n (%)</i>			
Unrelated donor			
10/10	31 (91.2)	-	
9/10	3 (8.8)	-	
Double cord blood units			
6/6 and 6/6	-	1 (3.2)	
5/6 and 5/6	-	20 (64.5)	
5/6 and 4/6	-	7 (22.6)	
4/6 and 4/6	-	3 (9.7)	
<i>Conditioning<sup>b</sup>, n</i>			
FB2A2-RIC	30	-	
CLOB2A2-RIC	4	-	
TCF-RIC	-	31	
<i>GVHD prophylaxis</i>			
CsA + MMF	28	28	NS
CsA + methotrexate	2	2	
CsA alone	4	1	
<i>ATG: yes, n (%)</i>	30 (88.2)	4 (12.9)	<0.0001
<i>Number of cells infused</i>			
Total nucleated cells, x10 <sup>8</sup> /kg, median (range)	10.4 (1.2-18.3)	0.48 (0.17-0.78)	<0.0001
CD34+ cells, x10 <sup>6</sup> /kg, median (range)	7 (1.1-10)	0.11 (0.05-0.25)	
<i>Recipient CMV serology - n (%)</i>			
Positive	15 (44.1)	12 (38.7)	NS
Negative	19 (55.9)	19 (61.3)	

Recipient EBV serology - n (%)

Positive	33 (97.1)	30 (96.8)	NS
Negative	1 (2.9)	1 (3.2)	

uPBSC, unrelated PBSC; dUCB, double umbilical cord blood; CsA, cyclosporine A; MMF, mycophenolate mofetil; ATG, anti-thymoglobuline

<sup>a</sup>UCB units were required to be matched at greater than 3 of 6 HLA antigens while 10 or 9 out of 10 HLA matched donor were authorized in the uPBSC group

<sup>b</sup>FB2A2 or a CLOB2A2 RIC regimens combine fludarabine 30 mg/m<sup>2</sup> per day (n=30) or clofarabine 30 mg/m<sup>2</sup> per day (n=4) for 5-6 days (days -6 or -5 to -2) with busulfan 3.2 mg/kg i.v. per day for 2 days (days -3 and -2) and ATG 2.5 mg/kg per day on days -2 and -1. FB2A2 patients received cyclosporine plus mycophenolate mofetil (n=28) or plus methotrexate (n=2) as GVHD prophylaxis while CLOB2A2 patients received cyclosporine alone. TCF-RIC combines fludarabine 200 mg/m<sup>2</sup> per day for 5 days (days -6 to -2), cyclophosphamide 50 mg/kg per day for 1 day (day -6), and low-dose (2 Grays) total body irradiation (TBI) on day -1. All dUCB patients received cyclosporine and mycophenolate mofetil as GVHD prophylaxis, including 5 patients receiving also ATG 2.5 mg/kg/day for 2 days (days -2 and -1) to ensure engraftment.

**Table 2. Comparison of Outcomes after allo-SCT between both groups during the 6-month follow-up.**

	uPBSC group (n=34)	dUCB group (n=31)	<i>p</i> -value
Engraftment rate	33 (97%)	27 (87%)	NS
Median days of neutrophil recovery (range)	15 (1-23)	20 (6-53)	0.0126
Median days of platelet engraftment (range)	12 (1-44)	44 (11-180)	<0.0001
Acute GVHD: yes			
Grade 1-2	17 (50%)	16 (51.6%)	NS
Grade 3-4	3 (8.8%)	5 (16.1%)	
Relapses	7 (20.6%)	4 (12.9%)	NS
Deaths	4 (11.8%)	3 (9.7%)	NS
<i>Causes of death</i>			
GVHD	2	1	
Relapse	0	1	
Infection	2 <sup>a</sup>	1 <sup>b</sup>	

uPBSC, unrelated PBSC; dUCB, double umbilical cord blood; GVHD, graft-versus-host disease; <sup>a</sup>one aspergillosis, one multiple infections (aspergillosis + bacterial sepsis); <sup>b</sup>multi-organ failure in sepsis context  
Abbreviations: NS, not significant

**Table 3. Comparison of viral reactivations/infections between the two groups.**

	uPBSC group (n=34)	dUCB group (n=31)	<i>p</i> -value
<i>HHV-6</i>			
Number of infected patients	7(21%)	26 (84%)	<0.0001
Number of positive samples/overall	22/312 (7%)	166/296 (56%)	<0.0001
Median of positive samples/patient (range)	0/10 (0-5)	6/10 (0-9)	<0.0001
Median VL: log <sub>10</sub> cop/mL (range)	2.6 (2.0-4.5)	3.0 (2.0-4.8)	NS
<i>CMV</i>			
Number of infected patients	12 (35%)	12 (39%)	NS
Number of positive samples/overall	46/312 (14%)	45/296 (15%)	NS
Median of positive samples/patient (range)	3.5/10 (3-7)	4/10 (2-7)	NS
Median VL: log <sub>10</sub> cop/10 <sup>6</sup> cells (range)	2.5 (<2.0-4.1)	2.6 (<2.0-4.5)	NS
<i>EBV</i>			
Number of infected patients	24 (71%)	8 (26%)	0.0003
Number of positive samples/overall	71/312 (23%)	14/296 (5%)	<0.0001
Median of positive samples/patient (range)	3/10 (1-8)	1/10 (1-4)	NS
Median VL: log <sub>10</sub> cop/10 <sup>5</sup> cells (range)	2 (<1.0-5.9)	1.9 (<1.0-3.1)	NS
<i>BKPyV</i>			
Number of infected patients	11 (32%)	18 (58%)	0.03
Number of positive samples/overall	29/312 (9%)	73/296 (25%)	<0.0001
Median of positive samples/patient (range)	2/10 (1-5)	3.5/10 (1-9)	NS
Median VL: log <sub>10</sub> cop/mL (range)	2.8 (<2.0-5.2)	3.1(<2.0-5.3)	NS
<i>ADV</i>			
Number of infected patients/overall	0	4 (6%)	NA
Number of positive samples/overall	0/312	7/296 (1%)	NA
Median VL: log <sub>10</sub> cop/mL (range)	NA	3.3 (2.9-4.5)	NA

uPBSC, unrelated PBSC; dUCB, double umbilical cord blood; VL, viral load; NS, not significant; NA, not applicable

### Figure legends

**Figure 1.**Percentage of positive patients reactivating HHV-6 (A), BKPyV (B), EBV (C) and CMV (D) at various times (days) of the 6-month follow-up period after double umbilical cord blood (dUCB; n=31) or unrelated PBSC (uPBSC; n=34) RIC allo-SCT.

**Figure 2.**Comparison of immune reconstitution between engrafted double umbilical cord blood allo-SCT (dUCB; n=27; light grey box plots) vs unrelated allo-SCT (uPBSC; n=33; dark-grey box plots) patients according the day post-transplant during the 6-month follow-up period. A: CD3+ T lymphocytes; B: CD4+ T cells, C: CD8+ T cells ; D : CD19+ B cells ; E : NK cells ; F : monocytes. Range of normal absolute counts for each sub-population is comprised between the dotted horizontal lines.\* indicates significant difference ( $p<0.05$ ) between both groups. Abbreviation: WB, whole blood.



Figure 1

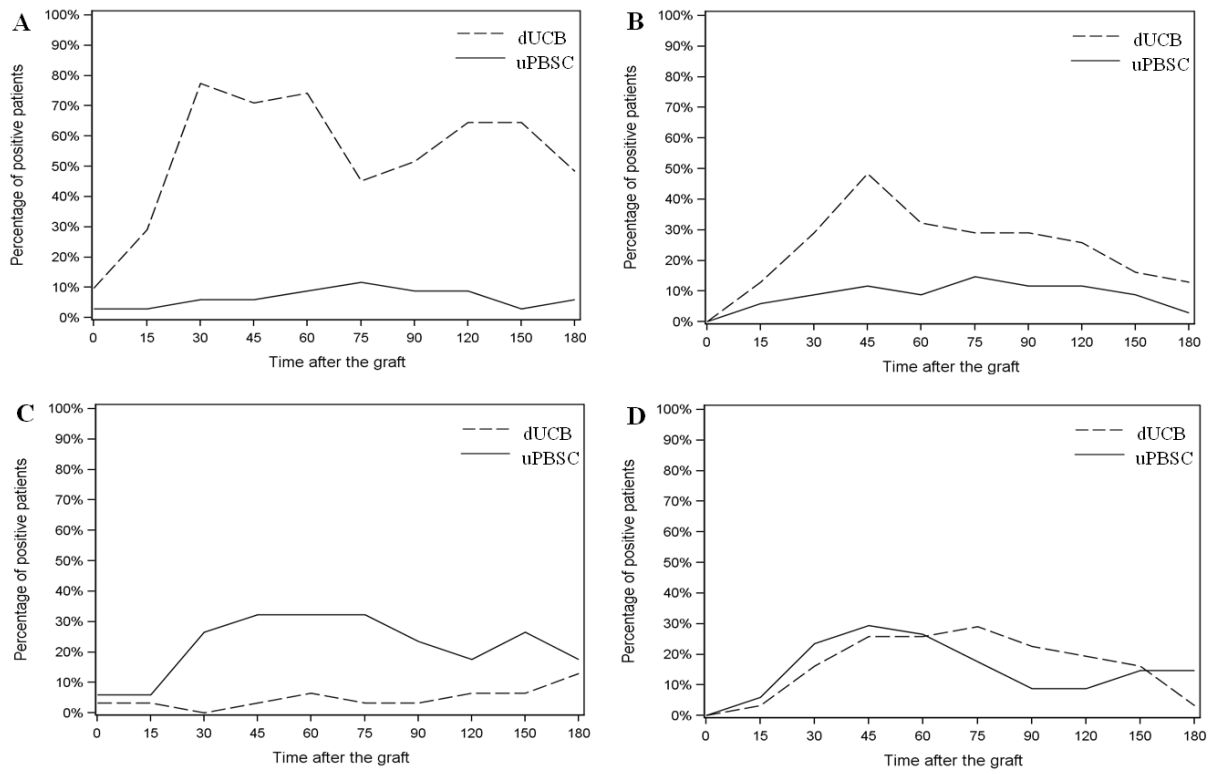
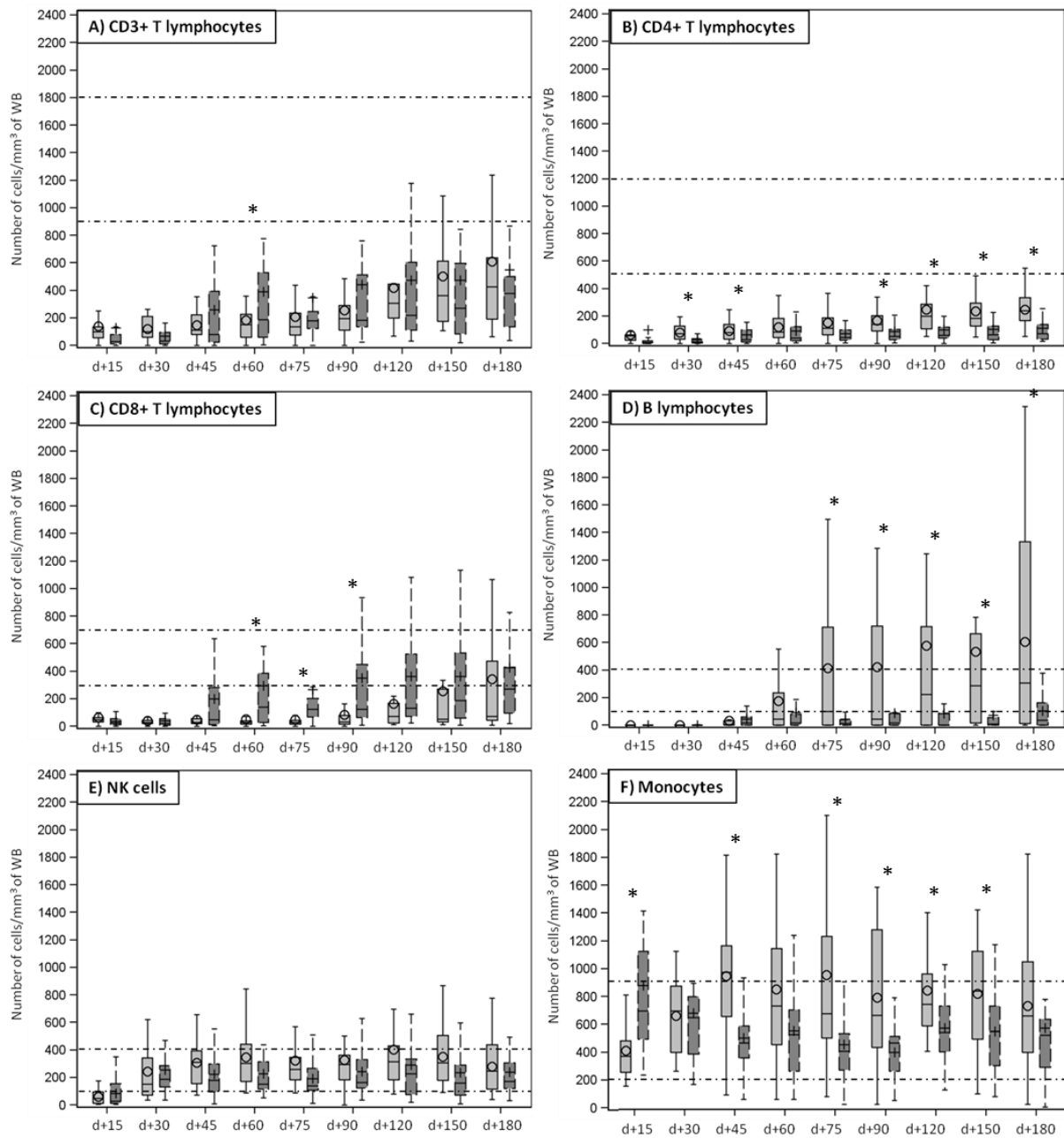


Figure 2



---

**Article n°2**

Long-lasting HHV-6 reactivation in long-term survivors after double umbilical cord blood

Marina Illiaquer, Florent Malard, Thierry Guillaume, Berthe-Marie Imbert-Marcille, Jacques Delaunay, Amandine Le Bourgeois, Marie Rimbert, Celine Bressollette-Bodin, Cristina Precupanu, Sameh Ayari, Pierre Peterlin, Philippe Moreau, Mohamad Mohty, Patrice Chevallier.

Article accepté pour publication dans Journal of Infectious Diseases

# Long-Lasting HHV-6 Reactivation in Long-Term Adult Survivors After Double Umbilical Cord Blood Allogeneic Stem Cell Transplantation

Marina Illiaquer,<sup>1</sup> Florent Malard,<sup>2</sup> Thierry Guillaume,<sup>2</sup> Berthe-Marie Imbert-Marcille,<sup>1</sup> Jacques Delaunay,<sup>2</sup> Amandine Le Bourgeois,<sup>2</sup> Marie Rimbart,<sup>3</sup> Céline Bressollette-Bodin,<sup>1</sup> Cristina Precupanu,<sup>2</sup> Sameh Ayari,<sup>2</sup> Pierre Peterlin,<sup>2</sup> Philippe Moreau,<sup>2</sup> Mohamad Mohty,<sup>4</sup> and Patrice Chevallier<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centre Hospitalier et Universitaire (CHU) de Nantes, Département de Virologie, Nantes France and EA4271, Immunovirology and Genetic Polymorphism, University of Nantes; <sup>2</sup>Centre Hospitalier et Universitaire (CHU) de Nantes, Hématologie Clinique, Centre d'Investigation Clinique en Cancérologie (CI2C), Nantes; <sup>3</sup>Centre Hospitalier et Universitaire (CHU) de Nantes, Département d'Immunologie, Nantes and <sup>4</sup>Hôpital Saint Antoine, Hématologie Clinique, Paris, France

**Higher incidence of human herpesvirus 6 (HHV-6) infection has been documented after umbilical cord blood allo-transplant in adults. Here we demonstrate that HHV-6 reactivation persists for a very long time in half of the patients after this type of graft. Long-term immune reconstitution does not explain this event, which remains to be explained.**

**Keywords.** adults; allo-SCT; cord blood; HHV-6; immune reconstitution; PBSC.

Human herpesvirus 6 (HHV-6) is a CD4<sup>+</sup> T lymphotropic beta-herpesvirus discovered in 1986 with 2 distinguished species A and B [1]. Significant higher incidence of HHV-6B reactivation have been documented in adults after double umbilical cord blood (dUCB) allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) compared to peripheral blood stem cells (PBSC) allo-SCT [2]. If this infection can affect >80% of patients in the former setting, before or after engraftment [2], no clear reasons can explain this phenomenon [3, 4]. Probably originating from endogeneous

reactivation [5], HHV-6 infection has been mainly associated with delayed engraftment and encephalitis [6]. Nevertheless, the clinical impact of HHV-6 reactivation remains debated [7]. HHV-6 reactivations occur within the first month post-transplant and may persist a few months after dUCB allo-SCT with little or no consequences [2]. To our knowledge, no data are known about the frequencies of HHV-6 reactivation far from transplantation and its clinical features. The aim of our study was to evaluate the long-term persistence of HHV-6 reactivation and its consequences for the patients by comparing frequencies of HHV-6 positive viremia and pattern of immune reconstitution between 2 groups of long-surviving patients who received either double UCB units or PBSC as stem cells source for allo-SCT.

## PATIENTS AND METHODS

### Patients

This prospective study included 48 adults with a median age of 54 years (range: 20–69) who received a dUCB (n = 23, males n = 10, median age, 54 years) or a PBSC (n = 25, males n = 12, median age: 53 years) allo-SCT between February 2006 and January 2012 at the CHU of Nantes. As inclusion criteria, all patients had to be alive at least 1 year after transplant. Also, all cases were required to be fit with no symptoms and in persistent complete remission at time of analyses. There were no differences between dUCB vs PBSC groups in term of sex (male: 56% vs 55%), type of disease (myeloid: 52% vs 55%), disease status at diagnosis (high-risk: 89% vs 71%), conditioning regimen (reduced-intensity conditioning: 83% vs 84%), or median year of transplant (2008 vs 2009). The use of antithymocyte globulins (ATG) was significantly higher in the PBSC group: 93% of cases vs 10%,  $P < .0001$ . Samples were collected prospectively once (predominantly) or twice in each patient between October 2012 and June 2013. The median time between the graft and the time of analyses was 3.9 years (range: 1.3–7.1) with no difference between both groups (dUCB: median 4 years vs PBSC: median 3.8 years,  $P = NS$ ). All patients provided informed consent, and the study was approved by the Nantes University Hospital's institutional review board. Characteristics of patients are given in Table 1.

### HHV-6 Infection

HHV-6 DNA quantification was performed after total nucleic acids extraction from whole blood in recipients with a QIASymphony instrument and the QIASymphony DNA mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions and stored in a final volume of 100  $\mu$ L at  $-20^{\circ}\text{C}$

Received 13 January 2014; accepted 5 February 2014; electronically published 4 March 2014.

This study has been previously presented as a poster at the 55th Blood ASH Annual Meeting in New Orleans, Louisiana in December 2013.

Correspondence: Patrice Chevallier, MD, PhD, Service d'Hématologie Clinique, CHU Hotel-Dieu, Place A. Ricordeau, 44093 Nantes Cedex, France (patrice.chevallier@chu-nantes.fr).

The Journal of Infectious Diseases 2014;210:567–70

© The Author 2014. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

DOI: 10.1093/infdis/jiu129

**Table 1. Characteristics of Patients**

Characteristic	UCB Group N = 23	PBSC Group N = 25	P Value
Median age, years (range)	54 (20–69)	53 (38–69)	.26
Gender, male	10 (56%)	12 (55%)	.75
<b>Disease</b>			
Acute myeloid leukemia	9 (39%)	12 (48%)	
Myeloproliferative disorder	1 (4.5%)	1 (4%)	
Chronic myeloid leukemia	1 (4.5%)	1 (4%)	
Non-Hodgkin lymphoma	10 (43%)	6 (24%)	
Chronic lymphocytic leukemia	0	1 (4%)	
Acute lymphoblastic leukemia	1 (4.5%)	2 (8%)	
Aplastic anemia	1 (4.5%)	2 (8%)	.52
Myeloid/lymphoid	10/12	14/9	.90
<b>Disease status<sup>a</sup></b>			
Standard risk	7 (32%)	12 (52%)	
High risk	15 (68%)	11 (48%)	.38
Median year of transplant (range)	2008 (2006–2012)	2009 (2006–2011)	.44
<b>Conditioning regimen</b>			
Myeloablative	4 (17%)	4 (16%)	
Reduced-intensity	19 (83%)	21 (84%)	1
ATG, yes	2 (10%)	19 (93%)	<.0001

Abbreviations: ATG, antithymocyte globulins; PBSC, peripheral blood stem cells; UCB, umbilical cord blood.

<sup>a</sup> Not including aplastic anemia.

until further analysis. HHV-6 (U65-U66 gene) DNA quantifications were performed using in-house real-time polymerase chain reaction (PCR) procedures adapted from previously described protocols [2]. Viral loads were expressed as the number of viral DNA copies/mL of blood.

### Immune Reconstitution

Total lymphocytes counts (normal range: 1.5–4.0 Giga/L) were assessed for each patient by a standard numeration. The CD3<sup>+</sup> T cells (normal range: 0.9–1.8 Giga/L), the CD4<sup>+</sup> (normal range: 0.5–1.2 Giga/L), and CD8<sup>+</sup> T (normal range: 0.3–0.7 Giga/L) cell subsets, the CD19<sup>+</sup> B cells (normal range: 0.1–0.4 Giga/L), and the CD56<sup>+</sup> natural killer (NK) lymphocytes (normal range: 0.1–0.4 Giga/L) were quantified using standard flow cytometry analysis. Absolute numbers of cells were calculated by multiplying the peripheral white blood cell count by the percentage of positive cells. Also, immunoglobulins were quantified (normal range: 8–13.5 g/L) for each patient in the serum using a standard electrophoresis method at the same time points after allo-HSCT.

### Statistical Analyses

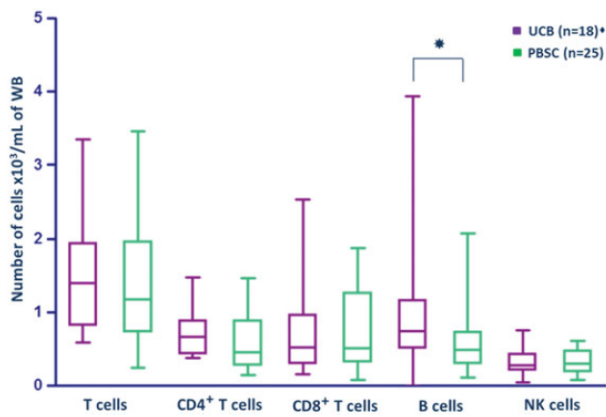
For categorical variables, comparison between the dUCB and the PBSC groups was carried out using the  $\chi^2$  test for patient gender, whereas the Fisher exact test was used for diagnosis, disease status at transplantation, conditioning regimen, and use of

ATG. For continuous data, comparison between regimens was performed using the Mann–Whitney test for patient age, median year of transplant, median time between the graft and the time of analyses, median HHV6 viral load, and median lymphocytes counts. A *P* value of < .05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

## RESULTS

Half of the patients (52%, *n* = 12) showed a long-lasting HHV-6 positive viremia in the dUCB group (median viral load: 2.7 log<sub>10</sub>copies/mL (range: 2–3.4) compared to only 4% of the patients (*n* = 1, viral load: 2 log<sub>10</sub>copies/mL) in the PBSC group (*P* < .0001).

Unfortunately, status regarding HHV-6 reactivation within the first year post-transplant was incomplete for 11 patients (*n* = 1 in the dUCB group and *n* = 10 in the PBSC group) who were ineligible for comparison. However, among 19 cases with HHV-6 reactivation within the first year post-transplant in the UCB group, 12 still showed HHV-6 reactivation far from transplant, whereas 7 were documented with negative HHV-6 PCR. Three patients in this same group had persistent negative HHV-6 PCR. In the PBSC group, 14 patients remained with negative HHV-6 PCR, whereas 1 positive PCR case became negative at a distance.



**Figure 1.** Comparison of long-term immune status and median lymphocytes counts between both graft sources (median time of analyses: UCB: 4 years after transplant; PBSC: 3.8 years after transplant).  $\sigma$  Data are missing for 5 patients in the UCB group. \* $P < .05$ . Abbreviations: PBSC, peripheral blood stem cells; UCB, umbilical cord blood; WB, whole blood.

Except a significant higher long-lasting B lymphocytes recovery in the dUCB group (median: 0.74 vs 0.49 Giga/L,  $P = .03$ ), there were no significant differences regarding long-term immune reconstitution between both groups, where total lymphocytes, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, and CD8<sup>+</sup> T cells, NK cells counts, and gammaglobulin rates were in the normal ranges (Figure 1). In the dUCB group, patients with higher B lymphocytes count (>median: 0.74 Giga/L) showed no higher incidence of HHV6 reactivation (56% vs 67%,  $P = 1$ ). Furthermore, no statistically significant correlation was observed between B lymphocyte counts and HHV6 reactivation. The persistence of HHV-6 reactivation has no clinical impact in this cohort, according to inclusion criteria.

## DISCUSSION

This is the first study to our knowledge evaluating the long persistence of HHV-6 reactivation after dUCB allo-SCT. Double UCB allo-SCT has been extensively used in recent years in adults lacking suitable related or unrelated donors, showing significantly higher incidence of HHV-6 reactivation compared to transplants using other sources of graft, mainly PBSC [2]. Here we were able to demonstrate that HHV-6 positive viremia persists in half of the cases receiving a dUCB allo-SCT up to a median of 4 years post-transplant. As expected, this reactivation seems to have no clinical impact. Even if it was part of inclusion criteria, absence of symptoms in patients reactivating HHV-6 may be explained by the low level of HHV-6 detection here. More surprisingly, this phenomenon was not explained by the particular immune status of patients, namely, a higher B lymphocyte count far after transplant. The reason for such an event remains unexplained. Indeed, increased risk of infections is generally limited to the first 3 months after UCB allo-SCT [8],

whereas B-cell deficiency has been described as the main factor for late infection occurrence [9]. Also, except for B lymphocyte excess, all patients in our series were documented with normal quantitative immune status. Thus, one can hypothesize that either different qualitative functions of immune cells or factors related to the stem-cell source itself influence the long-lasting HHV-6 reactivation after dUCB allo-SCT. However, weaker immune status should also be associated with other detectable complications, but it was not the case here. It remains that cells originated from UCB graft; probably (especially) CD4<sup>+</sup> T cells, the main targets of the virus, have particular long-term susceptibility to HHV-6. Recently, CD134, a member of the tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily, has been identified as a specific receptor for HHV-6B [10]. CD134 expression in particular should be studied in patients not only early but also later after UCB allo-SCT in comparison to cases receiving PBSC transplants in order to demonstrate whether higher antigen detection exists for the former.

Interestingly, we also were able to evaluate and compare for the first time the very long-term immune status of patients after dUCB allo-SCT vs PBSC allo-SCT. Indeed, such results are generally provided within the first year post-transplant, and only a few series have explored the long-term immune status after UCB allo-SCT but only up to 2–3 years post-transplant [8, 11]. It is known that early faster B and NK cells reconstitutions and delayed T-cell reconstitution is the hallmark of patients within the first year after UCB allo-SCT [2, 8, 12]. These differences can persist thereafter, especially higher B-cell counts [8]. The reason for the persistence of a higher B-cell count far from UCB transplant also remains unexplained but could be the key to long-term survival as all of our patients were fit without any medication at time of analyses [9].

In conclusion, HHV-6 reactivation persists for a very long time in half of the patients after dUCB allo-SCT but is not clinically relevant. Long-term immune reconstitution does not explain this event. The cause of long-lasting HHV-6 reactivation after dUCB allo-SCT in adults remains to be explained.

## Notes

**Contributions.** M. I. and P. C. designed, performed, and coordinated the research, collected, contributed, analyzed and interpreted the data, and wrote the manuscript. F. M. performed the statistical analyses and critically revised the manuscript. T. G., B. M. I. M., J. D., A. L. B., M. R., C. B. B., C. P., S. A., P. P., P. M., and M. M. collected and contributed data, analyzed the results, and critically revised the article.

**Potential conflicts of interest.** All authors: No reported conflicts.

All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

## References

1. Ablashi D, Agut H, Alvarez-Lafuente R, et al. Classification of HHV-6 and HHV-6B as distinct viruses. Arch Virol 2013. E-pub ahead of print. PMID: 24193951.

2. Chevallier P, Hebia-Fellah I, Planche L, et al. Human herpes virus 6 infection is a hallmark of cord blood transplant in adults and may participate to delayed engraftment: a comparison with matched unrelated donors as stem cell source. *Bone Marrow Transplant* **2010**; 45:1204–11.
3. Chevallier P, Robillard N, Illiaquer M, et al. HHV-6 cell receptor CD46 expression on various cell subsets of six blood and graft sources: a prospective series. *J Clin Virol* **2013**; 56:331–5.
4. Chevallier P, Robillard N, Illiaquer M, et al. Characterization of various blood and graft sources: a prospective series. *Transfusion* **2013**; 53:2020–6.
5. Behzad-Behbahani A, Pouransari R, Tabei SZ, et al. Risk of viral transmission via bone marrow progenitor cells versus umbilical cord blood hematopoietic stem cells in bone marrow transplantation. *Transplant Proc* **2005**; 37:3211–2.
6. Scheurer ME, Pritchett JC, Amirian ES, Zemke NR, Lusso P, Ljungman P. HHV-6 encephalitis in umbilical cord blood transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Bone Marrow Transplant* **2012**; 48:574–80.
7. Jeulin H, Agrinier N, Guery M, et al. Human herpesvirus 6 infection after allogeneic stem cell transplantation: incidence, outcome, and factors associated with HHV-6 reactivation. *Transplantation* **2013**; 95:1292–8.
8. Jacobson CA, Turki AT, McDonough SM, et al. Immune reconstitution after double umbilical cord blood stem cell transplantation: comparison with unrelated peripheral blood stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* **2012**; 18:565–74.
9. Corre E, Carmagnat M, Busson M, et al. Long-term immune deficiency after allogeneic stem cell transplantation: B-cell deficiency is associated with late infections. *Haematologica* **2010**; 95:1025–9.
10. Tang H, Serada S, Kawabata A. CD134 is a cellular receptor specific for human herpesvirus-6B entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**; 110:9096–9.
11. Cohen G, Carter S, Weinberg KI, et al. Antigen-specific T lymphocyte function following cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* **2006**; 12:1335–42.
12. Kanda J, Chiou LW, Szabolcs P, et al. Immune recovery in adult patients following myeloablative dual umbilical cord blood, matched sibling, and matched unrelated donor hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* **2012**; 18:1664–76.

**ANNEXE 2 : MATERIELS ET METHODES**



## Annexe 2A. Protocoles d'extraction des acides nucléiques

### 1. Extraction acides nucléiques à partir de culots cellulaires

#### 1.1 Extraction d'ADN

##### ▪ Matériel

- Kit DNeasy® Blood and Tissue de chez Qiagen (références : 69506 (250) et 69504 (50)) contenant :
  - DNeasy Mini Spin Columns
  - Tubes collecteurs de 2 mL
  - Tampon ATL
  - Tampon AL
  - Tampon AW1\*
  - Tampon AW2\*
  - Tampon AE
  - Protéinase K
- Ethanol 96-100%
- Micropipettes + cônes
- PBS stérile
- Tubes Eppendorff 1,5 mL

\* Lors de la première utilisation du kit, ajouter la quantité d'éthanol (96-100%) nécessaire pour chacun des tampons (volume indiqué sur chaque bouteille). Faire une croix sur la bouteille lorsque le tampon a été reconstitué.

##### ▪ Echantillons de départ

- Cellules (maximum  $5.10^6$ ) : reprendre le culot dans 200 µl de PBS
- Laisser les échantillons s'équilibrer à T° ambiante

##### ▪ Procédure

1. Préparer le nombre suffisant de tube eppendorff (nombre d'échantillons + témoin d'extraction)
2. Distribuer **20 µl** de **protéinase K** dans chaque tube
3. Distribuer 200 µl de l'échantillon dans chaque tube
4. Distribuer **200 µl** de **tampon AL**
5. Vortexer pendant 15 secondes
6. Incuber à 56 ° C pendant 10 min
7. Centrifugation brève pour faire tomber gouttelettes au fond du tube
8. Ajouter **200 µl** d'**éthanol (96-100%)** et vortex 15 sec
9. Transférer l'ensemble sur une colonne Qiagen (**DNeasy Spin Column**) placée sur un tube collecteur 2 ml

10. Centrifuger 1 min 8000 rpm
11. Déposer la colonne Qiagen sur un nouveau tube collecteur, jeter l'ancien
12. Ajouter **500 µl** de **tampon AW1**
13. Centrifuger 1 min 8000 rpm
14. Déposer la colonne Qiagen sur un nouveau tube collecteur, jeter l'ancien
15. Ajouter **500 µl** de **tampon AW2**
16. Centrifuger 3 min à 14000 rpm
17. Placer la colonne sur un tube eppendorf 1.5 ml. Déposer **200 µl** de **tampon AE** dans la colonne, incubé 1 min à température ambiante.
18. Centrifuger 1 min à 8000 rpm
19. Conserver l'éluat à -80 °C

## 1.2 Extraction d'ARN

### ▪ Matériel

- - Kit RNeasy® Mini Kit de chez Qiagen (références : 74106 (250) et 74104 (50)) contenant :
  - RNeasy Mini Spin Columns (rose)
  - Tubes collecteurs de 2 mL
  - Tubes Eppendorf de 1,5 mL
  - Tampon RLT
  - Tampon RW1
  - Tampon RPE (concentré)\*
  - Eau RNase-free
- - Micropipettes + cônes
- - Ethanol 70%
- - β-mercaptoéthanol (β-ME)
- - DNase I (RNase-Free DNase Set de chez Qiagen ; référence : 79254)
- - PBS stérile
- 
- \* Lors de la première utilisation du kit, ajouter la quantité d'éthanol (96-100%) nécessaire (volume indiqué sur chaque bouteille). Faire une croix sur la bouteille lorsque le tampon a été reconstitué.

### ▪ Echantillons de départ

- - Cellules animales, tissus animaux
- - Culot cellulaires maximum  $1.10^7$

### ▪ Notes importantes avant de commencer

- Penser à allumer un bain-marie à 37°C avant de débiter l'extraction
- - Si le culot cellulaire était conservé à -80°C, décongeler rapidement le tube au bain-marie à

37°C

- - Etapes préalables à chaque extraction :

-- Reconstitution du tampon RLT : ajouter 10 µL de β-ME pour 1ml de tampon RLT (conservation 1 mois à RT, à l'abri de la lumière)

-- Préparation de la quantité de solution de DNase nécessaire : 10 µl de DNase<sup>+</sup> + 70 µl de tampon RDD (compris dans le RNase-Free DNase Set) par tube d'extraction

-

- \* DNase : solution de DNase à utiliser est conservée -20°C après reconstitution (lyophilisat et eau RNase-free contenus dans le kit RNase-Free DNase Set)

▪ **Procédure**

1. Préparer le nombre suffisant de tube eppendorff (nombre d'échantillons + témoin d'extraction)

2. Distribuer le tampon RLT dans chaque tube et vortexer 30 sec (bien homogénéiser) :

- - < 5.10<sup>6</sup> cellules : 350 µl de tampon RLT

- - 5.10<sup>6</sup> – 1.10<sup>7</sup> cellules : 600 µl de tampon RLT

3. Ajouter 350 µl (ou 1 volume) d'éthanol 70°C, mélanger par aller-retour avec la pipette (ne pas centrifuger)

4. Transférer l'ensemble sur une **colonne RNeasy** (RNeasy Spin Column) placée sur un tube collecteur 2 ml

5. Centrifuger 15 sec à >8000g (> 10000 rpm)

6. Déposer la colonne Qiagen sur un nouveau tube collecteur, jeter l'ancien

7. Ajouter **350 µl de tampon RW1** sur la colonne, centrifuger 15 sec à >8000g (> 10000 rpm)

8. Déposer la colonne Qiagen sur un nouveau tube collecteur, jeter l'ancien

9. Ajouter **80 µl de DNase** préparée extemporanément sur la colonne, incuber 15 min à RT (20-30°C)

10. Ajouter **350 µl de tampon RW1** sur la colonne, centrifuger 15 sec à >8000g (> 10000 rpm)

11. Déposer la colonne Qiagen sur un nouveau tube collecteur, jeter l'ancien

12. Ajouter **500 µl de tampon RPE** sur la colonne, centrifuger 15 sec à >8000g (> 10000 rpm)

13. Déposer la colonne Qiagen sur un nouveau tube collecteur, jeter l'ancien

14. Ajouter **500 µl de tampon RPE** sur la colonne, centrifuger 2 min à >8000g (> 10000 rpm)

15. Placer la colonne sur un tube eppendorf 1.5 ml.

16. Déposer **30-50 µld'eau RNase-free** sur la membrane de la colonne, incuber 1 min à température ambiante. puis centrifuger 1 min à >8000g (> 10000 rpm)\*

17. Conserver l'éluat\* à -80 °C

-

- \* Conservation des ARN : ajout de 1 unité de RNasin<sup>®</sup> par µL d'extrait ==> RNasin<sup>®</sup>Plus RNase Inhibitor – 10, 000 units – Ref : N2615 - Promega-

-

## Annexe 2B : Quantification des acides nucléiques

### 1. PCR temps réel quantitative HHV-6

#### ▪ Objectifs

Ce mode opératoire décrit les étapes de l'analyse biologique pour la détection et la quantification du génome du virus HHV-6 par technique de PCR quantitative temps réel.

#### ▪ Descriptif

##### - REACTION :

Amplification d'un fragment de 176 pb dans la région des gènes U65-U66 (Gautheret-Dejean *et al.*, 2000)

- **Composition des amorces** [Genbank N° AB021506.1 souche HST]

- Nom: HHV6RG1

Séquence: 5'-3' GAC AAT CAC ATG CCT GGA TAA TG      Position      102812-102834  
Tm :66°C

- Nom: HHV6RG2

Séquence: 5'-3' TGT AAG CGT GTG GTA ATG GAC TAA      Position      102659-102682  
Tm:68°C

- **Composition de la sonde:**

- Nom: HHV6SRG

Séquence: 5'-3' FAM – AGCAGCTGGCGAAAAGTGCTGTGC – BHQ  
Position 102758-102781      Tm:76°C

- **Composition du mélange réactionnel PCR qsp 25µL :**

	Concentration initiale	Volume / tube	Concentration finale
Prémix Ex Taq X2*	2 X	12,5 µl	1X
Amorce HHV6RG1	20 µM	0,375 µl	0,3 µM
Amorce HHV6RG2	20 µM	0,375 µl	0,3 µM
Sonde HHV6SRG	20 µM	0,125 µl	0,1 µM
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2 µl	2 mM
IPC Mix** (amorces + sondes)	10 X	1,25 µl	0,5 X
IPC DNA**	50 X	0,25 µl	0,5 X
Eau		3,125 µl	
ADN		5 µl	

\*Prémix Ex Taq (Perfect RT) Kit – Ref FRRR039A - Lonza

\*\*Taqman® Exogenous Internal Positive Control Reagents- Ref 4308323 – Applied Biosystem

- **Témoins**

Pour chaque série de PCR, inclure les témoins suivants :

- un témoin d'extraction (PBS)
- un témoin négatif
- les quatre points de la gamme ( $5.10^4$ ,  $5.10^3$ ,  $5.10^2$  et  $5.10^1$ )

- **Amplification**

L'amplification est réalisée sur le Corbett Rotor-gene 6000 cycler®.

Programme d'amplification :

	Température	Temps	Etape
Hold	95°C	10 min	
Cycle X 45	94°C	15 s	Dénaturation
	57°C	20 s	Hybridation
	72°C	20 s	Elongation

Choisir le protocole "Mix ADN TAKARA"

- **Validation**

- **Analyse des résultats**

La valeur du treshold cycle (Ct) est fixée à 0.025.

- **Validation**

Canal VIC : amplification de l'IPC

Canal FAM (Green) : amplification de l'ADN d'HHV6

## 2. Quantification de l'ADN génomique cellulaire

- **Objectifs**

Quantifier le nombre de cellules contenues dans les extraits par la méthode de quantification du gène de l'albumine humaine (Laurendeau *et al.*, 1999).

- **Composition des amorces :**

[Genbank N° M\_12523]

- Nom: ALBRG1

Séquence: 5'-3' GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGTCGA

Position 151261-151284

Tm: 52,3°C

- Nom: ALBRG2

Séquence: 5'-3' AACTCATGGGAGCTGCTGGTT

Position 151593-151570

Tm: 52,3°C

- **Composition de la sonde:**

- Nom: ALBSRG

Séquence: 5'-3' JOE – CCTGTCATGCCACACAAATCTCTCC– BHQ-1

Position 151541-151566 Tm: 54,4°C

- **Composition du mélange réactionnel PCR qsp 25µL :**

	Concentration initiale	Volume / tube	Concentration finale
Prémix Ex Taq X2*	2 X	12,5 µl	1X
Amorce ALBRG1	20 µM	0,625 µl	0,5 µM
Amorce ALBRG2	20 µM	0,625 µl	0,5 µM
Sonde ALBSRG	20 µM	0,125 µl	0,1 µM
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2 µl	2 mM
Eau		4,125 µl	
ADN		5 µl	

*Prémix Ex Taq (Perfect RT) Kit – Ref FRRR039A - Lonza*

- **Témoins**

Pour chaque série de PCR, inclure les témoins suivants :

- un témoin d'extraction (PBS)
- un témoin négatif
- les quatre points de la gamme ( $5.10^4$ ,  $5.10^3$ ,  $5.10^2$  et  $5.10^1$ ) (Human Genomic DNA Roche (référence commerciale 1 691 112))

- **Amplification**

L'amplification est réalisée sur le Corbett Rotor-gene 6000 cycler®.

Programme d'amplification :

	Température	Temps	Etape
Hold	95°C	10 min	
Cycle X 45	94°C	15 s	Dénaturation
	57°C	20 s	Hybridation
	72°C	20 s	Elongation

Choisir le protocole "Mix ADN TAKARA"

### 3. RT-PCR temps réel quantitative HHV-6 (U90)

- **Objectifs**

Ce mode opératoire décrit les étapes de l'analyse biologique pour la détection et la quantification de l'ARNm du gène U90 du virus de l'herpesvirus humain de type 6 et de sous-type B par technique de RT-PCR en temps réel.

- **Descriptif**

- REACTION :

Reverse transcription et amplification de l'ARNm du gène U90, codant pour une protéine transactivatrice, localisé dans la région IE-A (Immediate Early Antigen). Les fragments amplifiés sont de 110 bp (épissé) et 224 pb (non épissé).

- **Composition des amorces :**

- Nom: HHV-6—U90P1S

Séquence: 5'-3' TTG GAT GCA ATT GCC AAC GGA C

[Genbank N° AB021506.1 souche HST]

Position 137712-137733

Tm: 49,7°C

- Nom: HHV-6-U90P2R

Séquence: 5'-3' GAG TCT TCC AAC GAC ATC GCT T

Position 137935-137914

Tm: 49,7°C

- **Composition de la sonde:**

- Nom: HHV6-U90S

Séquence: 5'- JOE - CKT CAG ATG CTC CTT CTT CCA CAT TAC TGG A – BHQ – 3'

Position 137865-137896 Tm: 58°C

- **Composition du mélange réactionnel PCR qsp 25µL :**

	Concentration initiale	Volume / tube	Concentration finale
Tampon X2 (1)*	2 X	12,5 µl	1X
Amorce U90P1S	20 µM	0,5 µl	0,4 µM
Amorce U90P2R	20 µM	0,5 µl	0,4 µM
Sonde U90S	20 µM	0,125 µl	0,1µM
T4 gene 32 protein**	10 µg/µL	0,2 µl	0,08 µg/µL
TaKaRa Ex Tag TM HS (2)*	2,5 U/ µL	0,5 µl	0,05 U/ µL
Prime Script (3)*	2,5 U/ µL	0,5 µl	0,05 U/ µL
Eau RNase free (4)*		5,175 µl	
ARN		5 µl	

\*One-step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit – Lonza – Ref FRRR066A

\*\* T4 gene 32 protein (500 µL) – Biolabs - Ref MO300L

- **Témoins**

Pour chaque série de PCR, inclure les témoins suivants :

- un témoin d'extraction
- un témoin négatif
- les quatre points de la gamme ( $5 \cdot 10^4$ ,  $5 \cdot 10^3$ ,  $5 \cdot 10^2$  et  $5 \cdot 10^1$ )

- **Amplification**

L'amplification est réalisée sur le Corbett Rotor-gene 6000 cycler®.

Programme d'amplification :

	Température	Temps	Etape
Hold	42°C	5 min	Reverse Transcription
Hold2	94°C	10 s	
Cycle X 45	94°C	5 s	Dénaturation
	57°C	20 s	Hybridation
	72°C	15 s	Elongation

Choisir le protocole “qRT U90 one-step SYBR + sonde JOE”

- **Validation**

- **Analyse des résultats**

Canal JOE (Yellow) : amplification de l'ARNm U90 d'HHV6.

#### 4. RT-PCR temps réel quantitative HHV-6 (U100)

- **Objectifs**

Ce mode opératoire décrit les étapes de l'analyse biologique pour la détection et la quantification de l'ARNm du gène U100 du virus de l'herpesvirus humain de type 6 et de sous-type B par technique de RT-PCR en temps réel.

- **Descriptif**

- REACTION :

Reverse transcription et amplification de l'ARNm du gène U100, transcrit au stade tardif, codant pour une glycoprotéine virale gQ du complexe gp 82-105. Les fragments amplifiés sont de 201 bp (épissé) et 333 (non épissé).

- **Composition des amorces :**

- Nom: HHV-6-U100P1S [Genbank N° AB021506.1 souche HST]  
 Séquence: 5'-3' ATA GCA GAG AGA AGT GAA GGC CGA Position 151261-151284  
 Tm: 52,3°C

- Nom: HHV-6-U100P2R  
 Séquence: 5'-3' TCC TGA ACT ACG CCA TTT GCG ATG Position 151593-151570  
 Tm: 52,3°C

- **Composition de la sonde:**

- Nom: HHV6-U100S  
 Séquence: 5'-3' JOE – TGT CTC TAT GAG ACA ACC GCA GCT GT – BHQ-1  
 Position 151541-151566 Tm: 54,4°C

- **Composition du mélange réactionnel PCR qsp 25µL :**

	Concentration initiale	Volume / tube	Concentration finale
Tampon X2 (1)*	2 X	12,5 µl	1X
Amorce U100P1S	20 µM	0,5 µl	0,4 µM
Amorce U100P2R	20 µM	0,5 µl	0,4 µM
Sonde U100S	20 µM	0,125 µl	0,1µM
T4 gene 32 protein**	10 µg/µL	0,2 µl	0,08 µg/µL
TaKaRa Ex Tag TM HS (2)*	2,5 U/ µL	0,5 µl	0,05 U/ µL
Prime Script (3)*	2,5 U/ µL	0,5 µl	0,05 U/ µL
Eau RNase free (4)*		5,175 µl	
ARN		5 µl	

\*One-step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit – Lonza – Ref FRRR066A



\*\* T4 gene 32 protein (500  $\mu$ L) – Biolabs - Ref MO300L

- **Témoins**

Pour chaque série de PCR, inclure les témoins suivants :

- un témoin d'extraction
- un témoin négatif
- les quatre points de la gamme ( $5.10^4$ ,  $5.10^3$ ,  $5.10^2$  et  $5.10^1$ )

- **Amplification**

L'amplification est réalisée sur le Corbett Rotor-gene 6000 cycler®.

Programme d'amplification :

	Température	Temps	Etape
Hold	42°C	5 min	Reverse Trancription
Hold2	94°C	10 s	
Cycle X 45	94°C	20 s	Dénaturation
	59°C	20 s	Hybridation
	72°C	20 s	Elongation

Choisir le protocole “qRT U100 one-step SYBR + sonde JOE”

- **Validation**

- **Analyse des résultats**

La valeur du treshold cycle (Ct) est fixée à 0.005.

- **Validation**

Canal JOE (Yellow) : amplification de l'ARNm U100 d'HHV6

## Annexe 2C : Culture MS-5 et pDCs

### Milieux :

$\alpha$ -MEM : D.Dutscher , marque Pan Biotech réf P04-21050

RPMI 1640 : D.Dutscher , marque D.Dutscher, réf L0501-500

TRYPHINE/EDTA 0.05%/0.02% : D.Dutscher , marque Pan Biotech, réf P10-023100

SVF (lot S08796S181H) : D.Dutscher , marque D.Dutscher, réf 500105I

PENICILLINE-STREPTOMICINE 10 000 U/10 mg/ml: D.Dutscher , marque Pan Biotech, réf P06-07100

L-GLUTAMINE 100x, 200mM : D.Dutscher , marque D.Dutscher, réf X0550-100

SODIUM PYRUVATE 100mM : D.Dutscher , marque Pan Biotech, réf P04-43100

PBS (Phosphate Buffered Saline) : Sigma, réf P3813-10PAK

### Cellules :

MS-5 : DSMZ réf ACC 441

pDCs Gen 2.2: EFS Nantes

### Décongélation des MS-5 :

-Préparer le milieu de culture :

$\alpha$ -MEM+ SVF 10%+ L-Glu 2mM (ou 1%) + PS 1% + sodium pyruvate 2mM

-Décongeler l'ampoule (entre 1 et 2 millions de cellules) le plus rapidement possible, lorsqu'elle est pratiquement décongelée prélever le milieu et le déposer dans 9 ml du  $\alpha$ -MEM complet. Rincer l'ampoule.

-Homogénéiser le milieu et le mettre dans une flasque 75 cm<sup>2</sup>. Garder 200  $\mu$ l pour le comptage des cellules.

- Compléter pour avoir un volume final de 25 ml et incuber à 37°C sous CO<sub>2</sub> 5%.

### Trypsination des MS-5 (tous les 3 ou 4 jours):

Lorsque les cellules sont à 90-100% de confluence, en générale après 3 jours :

-Enlever le milieu et rincer le tapis cellulaire avec 7 ml de PBS stérile (3ml pour les flasques 25 cm<sup>2</sup>)

-Jeter le PBS et déposer 5 ml de Trypsine/EDTA (2ml pour les flasques 25 cm<sup>2</sup>)

-Incuber à 37°C et attendre 10min.

-Lorsque le tapis cellulaire se décolle, ajouter 8 ml de  $\alpha$ -MEM complet (même volume pour les flasques 25 cm<sup>2</sup>), bien homogénéiser et transférer le milieu dans un tube 15 ml.

- Garder un peu de milieu pour le comptage et centrifuger le reste 5 min à 1250 rpm. Lorsque les cellules sont confluentes il y a entre 0.5 et 0.6 millions de cellules/ml

- Jeter le surnageant du tube 15 ml et casser le culot avec le volume nécessaire de  $\alpha$ -MEM complet.

-Remettre en culture les cellules :

Flasque 25 cm<sup>2</sup> : 150 000 cellules pour 4 jours ou 200 000 cellules pour 3 jours + 5 ml de milieu

Flasque 75 cm<sup>2</sup> : 500 000 cellules pour 4 jours ou 700 000 cellules pour 3 jours + 25 ml de milieu

Ampoule de congélation : 1.5 millions de cellules dans du  $\alpha$ -MEM+ SVF 20%+ L-Glu 1% + PS 1% + sodium pyruvate 2mM + DMSO 10%

Décongélation des pDCs :

-Préparer le milieu de culture :

RPMI+ SVF 10%+ L-Glu 1% + PS 1%

-3 ou 4 jours avant, préparer 2 flasques 25 cm<sup>2</sup> de MS-5 pour qu'elles soient confluentes le jour de la décongélation. Irradier la flasque à 35 Gy (Grays).

-Décongeler l'ampoule (1,5 millions de cellules) le plus rapidement possible, lorsqu'elle est pratiquement décongelée prélever le milieu et le déposer dans 9 ml de RPMI + svf 50%

-Homogénéiser le milieu, rincer l'ampoule 1 à 2 fois. Garder 200 µl pour le comptage des cellules et centrifuger le reste 5 min à 1250 rpm.

- Changer le milieu des MS-5, remettre 5 ml de RPMI complet, et changer aussi le bouchon (pour éviter les contaminations après l'irradiation)

-Jeter le surnageant et casser le culot cellulaire avec 2 ml de RPMI complet.

- Déposer 1 ml par flasque de MS-5 et incuber à 37°C sous CO<sub>2</sub> 5%.

Repassage des pDCs (tous les 3 ou 4 jours):

Prélever uniquement le surnageant, tapoter légèrement la flasque pour décoller au maximum les pDCs. (Si en aspirant les MS-5 se décollent, filtrer la suspension avec un tamis cellulaire 40µm, BD Falcon réf 352340)

- Bien homogénéiser et transférer le milieu dans un tube 15 ml.

- Garder un peu de milieu pour le comptage et centrifuger le reste 5 min à 1250 rpm. Normalement le nombre de cellules double en 3 jours.

- Jeter le surnageant du tube 15 ml et casser le culot avec le volume nécessaire de RPMI complet.

-Remettre en culture les cellules sur des flasques irradiées de MS-5:

1 million cellules pour 4 jours ou 1,5 millions cellules pour 3 jours + 5 ml de milieu.

Infection des pDCs :

Le jour de l'infection, déposer 1 million (ou 1,5) de pDCs par flasque irradiée de MS-5.

-Préparer la solution de HHV6 :

La solution mère est à  $5.10^{11}$  copies/ml donc pour avoir une infection à  $10^3$  EqGen /cellule pour 1.5 millions de pDCs , prélever 3µl de la solution mère, les déposer dans 1 ml de RPMI complet , bien homogénéiser et les mettre dans la flasque. Agiter doucement et incuber à 37°C sous CO<sub>2</sub> 5%.

Préparer la solution de CMV :

La solution mère est à  $4.9.10^9$  copies/ml donc pour avoir une infection à  $10^3$  EqGen /cellule pour 1.5 millions de pDCs , prélever 306µl de la solution mère, les déposer dans 1 ml de RPMI complet , bien homogénéiser et les mettre dans la flasque. Agiter doucement et incuber à 37°C sous CO<sub>2</sub> 5%.

Récupération des pDCs :

Prélever uniquement le surnageant, tapoter légèrement la flasque pour décoller au maximum les pDCs.

- Bien homogénéiser et transférer le milieu dans un tube 15 ml.

- Garder un peu de milieu pour le comptage et centrifuger le reste 5 min à 1250 rpm.

- Garder 1 ml de surnageant dans un tube Eppendorf et jeter le reste.

- Casser le culot avec le volume nécessaire de RPMI complet pour pouvoir faire 2 tubes Eppendorf avec 1 million de cellules pour l'extraction d'ADN et d'ARN, une lame IF et remettre en culture 1 ou 1.5 millions de cellules dans une nouvelle flasque irradiée de MS-5.

-Centrifuger 5 min à 1250 rpm les tubes Eppendorf. Jeter le surnageant et le culot cellulaire pour l'extraction d'ADN peut être cassé avec 200µl de PBS stérile. Les 3 tubes Eppendorf sont conservés à -80°C.

Ampoule de congélation : 2 millions de cellules dans du RPMI+ SVF 20%+ L-Glu 1% + PS 1% + DMSO 10%

## **Annexe 2D : Immunofluorescence indirecte**

L'anticorps anti-HHV6 (de sous-type G1) utilisé est un anticorps anti-p41, le HHV-6 p41 early antigen (clone 9A5D12, Santa Cruz Biotechnology, Inc.CA, USA) de localisation nucléaire.

L'anticorps secondaire utilisé est l'immunoglobuline (Ig) de chèvre anti-Ig de souris (Beckman-Coulter, Immunotech, Fulerton, Etats-Unis) couplée au FITC.

### **1. Préparation des lames pour immunofluorescence :**

- Lorsque environ 50% de la culture présente un effet cytopathique (ECP), les cellules sont centrifugées une première fois pendant 10 min à 1500 tours/min, afin d'éliminer le milieu de culture, puis lavées deux fois dans du PBS\* avec entre deux lavages une centrifugation à 300g.
- Les cellules sont ensuite reprises dans la quantité de PBS nécessaire pour obtenir une concentration d'environ  $4.10^6$  cellules/ml puis déposées sur des lames pour immunofluorescence.
- Déposer dans chaque puits 10  $\mu$ l de suspension cellulaire, soit environ 40 000 cellules en homogénéisant la suspension entre chaque dépôt.
- Laisser sécher les lames sous hotte à flux laminaire toute la nuit puis fixer les lames pendant 10 minutes dans l'acétone à +2/+8°C.
- Les lames sont ensuite conservées à -20 ou -80°C.

### **2. Réaction d'immunofluorescence indirecte :**

- Décongeler les lames préalablement préparées à partir des cellules infectées.
- Déposer environ 30  $\mu$ l par puits d'anticorps monoclonal dilué au 1/100 dans du PBS\*
- Incuber de 45 à 60 minutes en chambre humide à +37°C.
- Rincer les lames avec du PBS\* en prenant soin de ne pas diriger le jet directement sur les puits et faire deux lavages en PBS pendant 5 minutes.
- Sécher rapidement le pourtour des puits avec du papier absorbant sans laisser sécher l'intérieur des puits.
- Déposer 30  $\mu$ l par puits du conjugué préalablement préparé à l'aide de l'anticorps secondaire anti-immunoglobuline de souris (IgG+IgM) marqué à la fluorescéine, dilué au 1/100 dans du PBS\* additionné de Bleu Evans (1%) dilué au 1/100 soit 1/10 000 final.
- Incuber les lames pendant 30 min à +37°C, en chambre humide, à l'obscurité.
- Rincer les lames avec du PBS\* en prenant soin de ne pas diriger le jet directement sur les puits et faire deux lavages en PBS pendant 5 minutes.
- Monter chaque lame avec du milieu de montage\* et une lamelle.
- Lire au microscope à fluorescence.
- Le marquage positif en immunofluorescence est nucléaire.

## **Annexe 2E : Culture cellules MT4**

### **1. Cellule**

La lignée MT4 est une lignée de cellules T humaines transformées par le virus HTLV1. Ces cellules sont particulièrement sensibles au virus HHV-B avec apparition entre 10 à 15 jours d'un ECP.

Elles sont permissives pour le HHV-6 de type B et aboutissent à la formation de nouveaux virions après un cycle viral complet. Elles sont utilisées pour la culture *in vitro* du HHV-6 B.

### **2. Culture cellulaire**

Les cellules MT4 sont préparés sous forme d'une suspension à  $10^6$  cellules/ml en milieu de croissance constitué de milieu nutritif RPMI-1640 (Sigma Aldrich) supplémenté 10% sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté par chauffage pendant 30 minutes à 56 °C, 1% de la L-glutamine et 1% d'un mélange d'antibiotiques (pénicilline + streptomycine). La suspension cellulaire est répartie dans des flasques de 25 cm<sup>2</sup> (10ml de milieu par flasque). Les flasques sont incubées à 37 °C sous 5% de CO<sub>2</sub>.

Le milieu est changé tous les 4 jours et la concentration cellulaire est ajustée à  $10^6$  cellules/ml

### **3. Congélation des cellules MT4**

- La congélation se faire rapidement et à +4°C, dans les boîtes de congélation Mr Freeze. Les cellules sont congelées à raison de 20M par cryotube.
- Déposer le tube sur de la glace et reprendre le culot cellulaire par du SVF à raison de 500µl pour 20M de cellules (=1 ampoule).
- Répartir la suspension cellulaire dans les cryotubes (500 µl par cryotube).
- Ajouter goutte à goutte 500 µl par ampoule de RPMI/DMSO 20% en tournant le cryotube. Homogénéiser la suspension.
- Placer les ampoules dans la boîte Mr Freeze et la mettre au congélateur -80°C.
- Descendre les cellules dans les containers à azote dans un délai de 1 semaine si possible.

### **4. Décongélation des cellules MT4**

- Mettre rapidement le tube congelé dans un bain-Marie à 37°C
- Agiter doucement
- Décontaminer le tube avec de la gaze imbibée d'alcool
- Immédiatement après la décongélation, transférer la suspension cellulaire dans un tube à centrifuger conique, contenant 30 ml de RPMI+10% SVF
- Centrifuger 10 mn à 1500 tours/mn +4°C
- Elimination du surnageant
- Reprendre le culot cellulaire avec 30 ml de RPMI+10% SVF

- Homogénéisation de la suspension et numération des MT4
- Centrifuger 10 mn à 1500 tours/mn +4°C
- Mise en suspension dans une flasque ventilée de 25 cm<sup>2</sup> à 37 °C sous CO<sub>2</sub> à raison de 10<sup>6</sup> cellules MT4/ml dans le milieu d'entretien des MT4 (RPMI avec 15%de SVF, 1% d'antibiotique)
- Le milieu est changé tous les 4 jours et la concentration cellulaire est ajustée à 10<sup>6</sup> cellules / ml à chaque fois de changement.

## **Annexe 2F : Culture HHV-6 (souche HST)**

### **1. Souche virale**

La souche japonaise de référence HST représente des souches de type B

### **2. Infection virale**

- Centrifuger une suspension des cellules MT4 d'environ  $10^7$  cellules.
- Ce culot cellulaire est remis en suspension dans un volume de stock viral (le volume de stock viral dépendant du titre infectieux souhaité).
- Au bout de 1 à heures de contact à 37°C, ajouter du milieu de culture à raison de  $10^6$  cellules/ml.
- Le suivi de la réplication virale est suivie par observation au microscope inverse pendant deux ou trois semaines jusqu'à l'apparition d'un effet cytopathique (ECP) caractéristique (une ballonnisation et une réfringence des cellules. Les cellules ballonnées contiennent souvent un ou deux noyaux. Après la présence de l'ECP, la dégénérescence lytique des cellules a lieu). Une observation régulière permettra de suivre son apparition.
  - Le résultat de l'ECP est confirmé par immunofluorescence indirecte (IFI)

### **3. Préparation des stocks viraux**

- Quand l'IFI indique un pourcentage de cellules infectées d'au moins 50-70% l'ensemble de la suspension cellulaire est congelée à -80°C.
- Suspensions soumises à trois phases de congélation (15 min) à -70° C/décongélation rapide.
- Après décongélation et centrifugation à 2500 g pendant 15 minutes à 4° C pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant de centrifugation est aliquoté .
- Conservation du surnageant en aliquote de 1.5ml à 5 ml à -70° C.

### **4. Titrage du stock viral obtenu**

- Inoculation de 100 µl de chaque dilution de raison 10 dans 6 puits d'une plaque de titration de 24 puits contenant chacun 1ml d'une suspension à  $1.10^6$  cellules MT4/ml
- Incubation à 37° C sous 5% de CO2 pendant 14 jours
- Lecture de l'ECP associée à un contrôle de la positivité des cellules sur lame IF par marquage avec l'anticorps anti-p41, le HHV-6 p41 early antigen (clone 9A5D12).
- A partir de ces données, le titre du virus en cfu/ml est calculé selon la formule de Kärber



# Thèse de Doctorat

Marina ILLIAQUER

## Interactions entre l'Herpesvirus Humain de type 6 (HHV-6) et les cellules effectrices de l'immunité

Interactions between the Human Herpesvirus 6 (HHV-6) and the effector cells of the immune system

### Résumé

Les infections virales représentent une complication majeure des allogreffes de cellules souches hématopoïétiques (CSH) et sont associées à des mortalité/morbidité élevées. Nous avons conduit une étude prospective visant à évaluer l'impact de l'utilisation d'un greffon de sang placentaire (SP) sur la survenue de réactivation à HHV-6 et de quatre autres virus opportunistes ainsi que sur les cinétiques de reconstitution immunitaire (RI), pendant les 6 premiers post-greffe, en comparant des patients recevant soit une greffe de SP soit une greffe de CSH périphériques (CSP) d'un donneur non apparenté. L'étude a confirmé une association significative entre HHV-6 et greffe de SP et entre EBV et greffe de CSP. L'analyse de la RI montre des différences significatives entre les deux groupes, en particulier pour les lymphocytes B et les monocytes qui reconstituent plus rapidement et avec des taux plus élevés après greffe de SP. Une deuxième étude comparant les mêmes paramètres à distance de l'allogreffe a montré que les infections à HHV-6 durent longtemps après greffes de SP et que la RI diffère en fonction de la source de greffon. L'ensemble de ces données ne permet pas, pour le moment, d'expliquer le lien particulier entre HHV-6 et SP. Enfin, afin de caractériser l'impact d'une infection à HHV-6 sur des cellules jouant un rôle majeur dans la réponse antivirale, nous avons conduit des essais d'infection *in vitro* de cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs). Ces données montrent l'absence de permissivité des pDCs à l'infection par HHV-6. L'HHV-6 induit la sécrétion d'interféron de type I par les pDCs sans influencer l'expression des molécules HLA de classe I et II ou de co-stimulation.

### Mots clés

Herpesvirus humain de type 6 – Allogreffe de cellules souches périphériques – Allogreffe de sang placentaire – Reconstitution immunitaire- Cellules dendritiques plasmacytoïdes

### Abstract

Viral infections are well-known complications after allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) and are responsible for morbidity and mortality in patients. To better define the impact of UCB as stem cell source we conducted a prospective study comparing the frequencies of HHV6 and four other opportunistic viruses during the first six months post-graft as well as the kinetic of immune reconstitution in adults receiving either UCB allo-SCT or unrelated PBSC allo-SCT. We prospectively confirm a specific relationship between HHV6 and UCB allo-SCT and between EBV and PBSC allo-SCT. The data of the immune reconstitution showed significant differences between the both groups and particularly for the B lymphocytes and monocytes subsets which reconstituted faster and with higher count in the UCB group that however. A second study comparing the same parameters in long-term UCB survivors, shows long-lasting HHV-6 reactivation and highlight differences in the kinetic of immune reconstitution, according to the type of graft. However, our results don't explain the link between HHV-6 and UCB, which so far remains to be elucidated. Finally, to evaluate the impact of HHV-6 infection on cells professionally involved in antiviral defense of the organism, the plasmacytoid dendritic cells (pDCs), we performed *in vitro* experiments consisting on HHV-6 infection of human peripheral pDCs. The HHV-6 induce secretion of type I interferons by pDCs without influencing significantly the expression of the co-stimulation molecules or the class I and II HLA molecules.

### Key Words

Human Herpesvirus 6 – Peripheral blood stem cells allograft – Umbilical cord blood allograft – Immune reconstitution – Plasmacytoid dendritic cells