

Université de Nantes  
Faculté de Médecine

**ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE**

Année 2013

01

INFECTION PAR L'HERPES VIRUS HUMAIN DE TYPE 6 (HHV-6)  
APRES  
ALLOGREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOIETIQUES :  
Influence de la nature du greffon sur la réactivation virale.

THESE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie, Médecine et Santé  
Spécialité : Aspects moléculaires et Cellulaires de la Biologie  
Laboratoire de Recherche : EA4271

Présentée et soutenue publiquement par  
**Mr Patrice Chevallier**  
Le 25 janvier 2013, devant le jury ci-dessous

Président : Pr Magali Giral, PU-PH (Néphrologie, Nantes)

Rapporteurs : Pr Henri Agut, PU-PH (Virologie, Pitié-Salpêtrière, Paris)  
Pr Ibrahim Yakoub-Agha, PU-PH (Hématologie, Lille)

Examineur : Pr Noel Milpied, PU-PH (Hématologie, Bordeaux)

Directeur de Thèse : Pr Berthe-Marie Imbert-Marcille, PU-PH (Virologie, Nantes)

Co-Directeur de Thèse : Pr Mohamad Mohty, PU-PH (Hématologie, Nantes)

Par voie de connaissance chacun libérera l'avenir de ce qui aujourd'hui le défigure.  
Walter Benjamin  
« La vie des étudiants » in Œuvres I (Folio)

# **TABLES DES MATIERES:**

- Liste des Abréviations	p 7
- Liste des Figures	p 9
- Liste des Tableaux	p 11
<b><u>- INTRODUCTION</u></b>	p 13
<b><u>-RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES</u></b>	p 15
<i><u>I-ALLOGREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOIETIQUES (CSH)</u></i>	p 15
I-1: Les conditionnements à la greffe	p 16
I-2: Choix du donneur	p 17
I-3: Les sources de greffons	p 20
I-4: Complications post-allogreffe	p 22
a) Réactions du greffon contre l'hôte (ou GVHD pour graft-versus-host disease)	p 22
b) Complications infectieuses après allogreffe de CSH	p 25
I-5: L'allogreffe de sang placentaire chez l'adulte	p 26
<i><u>II- HERPES VIRUS HUMAIN DE TYPE 6 (HHV-6)</u></i>	p 29
II-1 : Caractéristiques virales	p 29
II-2 : Cycle de réplication du virus HHV-6	p 34
II-3 : Tropisme cellulaire et tissulaire : Permissivité, Latence et Intégration chromosomique du virus HHV-6	p 36
II-4 : Méthodes de détection du virus HHV-6	p 38
II-5 : Epidémiologie, Transmission, Diagnostic and Manifestations Cliniques de l'infection à HHV-6	p 41
II-6 : Traitements de l'infection/maladie à HHV-6 : faut-il traiter et quand ?, traitements disponibles	p 46
<i><u>III- HHV-6 et Allogreffe de CSH</u></i>	p 50

<b><u>PARTIE EXPERIMENTALE</u></b>	p 53
<b><u>Partie I:</u></b> Infections à HHV-6, CMV et EBV après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) chez l'adulte: comparaison entre greffe de cellules souches périphériques (CSP) non apparentées et greffe de sang placentaire	p 54
<b><u>Partie II:</u></b> Comparaison quantitative (valeurs absolues et pourcentages) des composants cellulaires de différentes sources sanguines et de greffons	p 75
<b><u>Partie III:</u></b> Comparaison de l'expression cellulaire du CD46, récepteur membranaire du virus HHV-6, dans différentes sources sanguines et de greffons	p 100
<b><u>PARTIE IV:</u></b> Essais <i>in vitro</i> d'infection de cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) humaines périphériques par la souche virale HHV-6B HST : résultats préliminaires	p 115
<b><u>CONCLUSION GENERALE</u></b>	p 148
<b><u>REFERENCES</u></b>	p 150
<b><u>FINANCEMENTS</u></b>	p 171
<b><u>ANNEXE</u></b> : Textes issus du travail de cette thèse	p 172

# **ABREVIATIONS:**

ADN : acide désoxyribonucléique  
ARN: acide ribonucléique  
ATG : anti-thymoglobuline  
BDCA: blood dendritic cell antigen  
CB: cord blood  
CI-HHV6: hromosomally-integrated HHV-6  
CMV: cytomégalovirus  
CR1 : complement receptor type 1  
CSH: cellules souches hématopoïétiques  
CSP: cellules souches périphériques et par extension greffe ou greffon de CSP  
DAF: decay-acceleratory factor  
EBV: Epstein-Barr virus  
G-CSF: granulocyte colony stimulating factor  
GVHD: graft-versus-host disease ou réaction du greffon contre l'hôte  
HHV-6 : herpesvirus humain de type 6  
HHV-7 : herpesvirus humain de type 7.  
HIV : human immunodeficiency virus ou virus d'immunodéficience humaine  
HLA : human leucocyte antigens ou complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)  
HSV : virus herpes simplex  
ICT : irradiation corporelle totale  
IE : immediate early (très précoce)  
IFN : interféron  
IFNAR : récepteur de l'interféron alpha  
IL- : interleukine  
ILT: immunoglobulin-like transcript  
IRF7 : interferon regulatory factor 7  
kb: kilobase  
L : late (tardif)  
LCR : liquide céphalo-rachidien  
LP : leukaphérèse  
MCP : membrane cofactor protein  
mDCs: cellules dendritiques monocytoïdes (monocytoid dendritic cells)  
MIRL: membrane inhibitor of reactive lysis  
MO : moelle osseuse  
moi: multiplicity of infection (multiplicité d'infection)  
MCP : protéine majeure de capsid (major capsid protein)  
mCP: protéine mineure de capsid (minor capsid protein)  
MMF : mycophenolate mofétyl  
MUD : matched unrelated donor ou donneur non familial HLA-matché 10/10  
NA : non applicable  
NK : natural killer  
NS : non significatif  
ORF : cadre ouvert de lecture (open reading frame)  
pb : paires de bases  
PAMPs : pathogen associated molecular pattern  
PBMC : cellules nucléées sanguines (peripheral mononuclear cells)

pDCs : cellules dendritiques plasmacytoïdes (plasmacytoid dendritic cells)  
PCR : polymerase chain reaction (amplification de l'ADN)  
RAC : régulateur de l'activation du complément  
RIC : reduced-intensity conditioning ou conditionnement à intensité réduite  
RT-PCR : reverse transcriptase/polymerase chain reaction (amplification de l'ARN)  
SC : sang de cordon ou stem cells (cellules souches) suivant le contexte  
SP : sang périphérique  
TCR : T cell receptor ou récepteur à l'antigène du lymphocyte T  
TLR : toll-like receptor  
Th : lymphocyte T CD4+ helper  
TNF : tumor necrosis factor  
TRM : transplant related mortality ou mortalité liée à la greffe  
VIH : virus de l'immunodéficience humaine.  
VZV : virus varicelle-zona

# Liste des Figures:

- Figure 1:** Evolution de l'allogreffe de CSH depuis son origine p 16
- Figure 2:** Modèle physiopathologique de la GVH aiguë p 24
- Figure 3:** Chronologie des complications infectieuses après allogreffe p 26
- Figure 4:** Allogreffes réalisées à Nantes depuis l'origine jusqu'en 2010 en fonction du type de greffon (moelle, CSP ou greffon placentaire) p 27
- Figure 5:** Comparaison de la survie sans maladie à 2 ans après greffe à conditionnement atténué de CSP ou de sang placentaire (expérience nantaise) p 28
- Figure 6:** Vue en microscopie électronique du virus HHV-6 p 30
- Figure 7:** Structure génomique du virus HHV-6 p 32
- Figure 8:** Cycle de réplication du virus HHV-6 p 35
- Figure 9:** Principales molécules actives contre HHV-6 p 49
- Figure 10:** Cinétique de la charge virale HHV-6 post-greffe chez les deux patients inclus dans l'étude présentant un probable virus HHV-6 intégré au génome avant la greffe (patient A) et après la greffe (patient B) p 63
- Figure 11:** Pourcentage de patients présentant une infection à HHV-6 post-greffe dans le groupe cordons (CBT) vs le groupe CSP (MUD) p 64
- Figure 12:** Comparaison de la charge virale HHV-6 à chaque point du suivi mensuel entre le groupe cordon (CBT) et le groupe CSP (MUD) p 65
- Figure 13:** Pourcentage de patients présentant une infection à EBV post-greffe dans le groupe cordons (CBT) vs le groupe CSP (MUD) p 66
- Figure 14:** Pourcentage de patients à risques présentant une infection à CMV post-greffe dans le groupe cordons (CBT) vs le groupe CSP (MUD) p 67
- Figure 15:** Exemple d'analyse en cytométrie de flux des différents composants cellulaires des prélèvements sanguins ou de greffons considérés p 83
- Figure 16:** Représentation de la molécule CD46 p 102
- Figure 17:** Activation et régulation du Complément p 103
- Figure 18:** Un exemple d'analyse FACS du CD46 sur différentes populations cellulaires p 108

- Figure 19:** Expression du CD46 (exprimé en MFI) au niveau des populations cellulaires de trois sources sanguines et trois sources de greffons différentes p 111
- Figure 20:** Ontogénie des cellules dendritiques humaines p 117
- Figure 21:** Phénotype des pDCs humaines p 121
- Figure 22:** Activation des monocytes, mDCs et pDCS par différents motifs conservés de pathogènes via les TLR et réponses induites p 125
- Figure 23:** Cellules immunitaires régulées par les pDCs via la sécrétion d'Interféron et implication des pDCs en pathologie humaine p 126
- Figure 24:** Profils de sécrétion cytokinique des pDCs en réponse à différents stimuli p 127
- Figure 25:** Un exemple d'analyse FACS à HO avant et après tri : caractérisation des pDCs (expérience 4) p 137
- Figure 26:** Variations d'expression (% moyen) du CD80, CD86, CD83 par les pDCs à HO, H24 et H72 en fonction des différentes conditions de cultures p 141
- Figure 27:** Variations d'expression (MFI moyenne) du CD46, HLA classe I, HLA classe 2 (DR) par les pDCs à HO, H24 et H72 en fonction des différentes conditions de cultures p 142
- Figure 28:** Production d'IF alpha par les pDCS à H24 et H72 en fonction des différentes conditions de culture p 143



# Liste des Tableaux:

- Tableau 1:** Principaux avantages et inconvénients des trois sources de greffons utilisés pour une allogreffe p 21
- Tableau 2:** Principales souches virales d'HHV-6 utilisés pour les études in vitro p 37
- Tableau 3:** Caractéristiques des patients p 57
- Tableau 4:** Comparaison des principaux évènements post-greffes entre les deux groupes considérés dans l'étude (greffe de CSP non apparentée vs greffe de sang placentaire) p 60
- Tableau 5:** Comparaison de la cinétique de la reconstitution immunitaire post-greffe entre les deux groupes considérés dans l'étude (greffe de CSP non apparentée vs greffe de sang placentaire) p 69
- Tableau 6:** Caractéristiques des différents donneurs p 79
- Tableau 7:** Combinaisons des différents anticorps monoclonaux utilisés pour l'étude de la composition cellulaire des trois sources sanguines et des trois sources de greffons considérés p 80
- Tableau 8:** Comparaison des nombres absolus médians des principaux composants cellulaires des trois sources sanguines considérées p 88
- Tableau 9:** Comparaison des proportions médianes des principaux composants cellulaires des trois sources sanguines et des trois sources de greffons considérés p 89
- Tableau 10:** Comparaison des proportions médianes des sous-types cellulaires T, B et NK des trois sources sanguines et des trois types de greffons considérés p 90
- Tableau 11:** Comparaison entre les trois différentes sources de greffons du nombre médian de cellules en valeur absolue p 91
- Tableau 12:** Comparaison des MFI du CD46 (valeur absolue) au niveau des populations cellulaires de trois sources sanguines et trois sources de greffons différentes p 110
- Tableau 13:** Composition en pDCs de différentes sources sanguines et de greffons p 118
- Tableau 14:** Caractéristiques phénotypiques des mDCs et des pDCs humaines p 121
- Tableau 15:** Ligands, récepteurs et fonctions cellulaires : comparaison entre pDCs et mDCs p 124
- Tableau 16:** Combinaison d'anticorps utilisés en FACS pour l'étude fonctionnelle des pDCs humaines après stimulation par la souche virale HST HHV-6B p 135

**Tableau 17:** Rendement en pDCs après tri des cellules nucléées issues de donneurs volontaires de plaquettes et récupérées à partir de la tubulure (« anneau de kit ») de prélèvement p 137

**Tableau 18:** Nombre de conditions de culture testées pendant l'étude p 138

# **INTRODUCTION:**

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) reste le traitement de référence d'un grand nombre d'hémopathies malignes. Les années récentes ont vu émerger la réalisation d'allogreffes à partir de sang placentaire chez les patients adultes sans donneur vivant compatible. Cette pratique, développée il y a plus de vingt ans chez les enfants, est maintenant courante dans les services d'hématologie adulte. Le greffon de sang placentaire est caractérisé par un faible nombre de CSH et la présence de cellules immunes naïves. Ainsi, les principaux problèmes rencontrés après greffe de sang placentaire sont en toute logique représentés par une incidence de prise de greffe moindre et une incidence d'infections plus importante par rapport aux autres types d'allogreffe. Les données pédiatriques ont montré une incidence accrue d'infections bactériennes après greffe de sang placentaire et une incidence accrue d'infections virales en particulier à herpesvirus de type 6 (HHV-6). Le travail de cette thèse a consisté dans un premier temps à étudier et confirmer cette incidence accrue d'infections à HHV-6 chez l'adulte recevant un greffon de sang placentaire en comparaison des infections à cytomégalo virus (CMV) et Epstein-Barr virus (EBV), principaux virus se réactivant et posant problèmes après allogreffe. Nous avons cherché ensuite à expliquer ce phénomène, ce qui a nous conduit à étudier de façon exhaustive la composition cellulaire des différents greffons disponibles ainsi que l'expression du CD46, seul récepteur cellulaire connu de HHV-6, sur les différentes populations cellulaires étudiées. Finalement, constatant un déficit majeur quantitatif (à la fois en pourcentage et en valeur absolue) dans les greffons de sang placentaire en cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs), cellules professionnelles impliquées dans l'immunité antivirale, nous avons voulu étudier l'infection *in vitro* des pDCs humaines par HHV-6.

Cette thèse s'organise ainsi en quatre parties principales après une introduction détaillant les principes et les complications de l'allogreffe, les principales caractéristiques du virus HHV-6, et les connexions existantes entre allogreffe et HHV-6 :

**Partie I:** Infections à HHV-6, CMV et EBV après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) chez l'adulte: comparaison entre greffe de cellules souches périphériques (CSP) non apparentées et greffe de sang placentaire.

**Partie II:** Comparaison quantitative (valeurs absolues et pourcentages) des composants cellulaires de différentes sources sanguines et de greffons.

**Partie III:** Comparaison de l'expression cellulaire du CD46, récepteur membranaire du virus HHV-6, dans différentes sources sanguines et de greffons.

**Partie IV:** Essais *in vitro* d'infection de cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) humaines périphériques par la souche virale HHV-6B HST : résultats préliminaires.

Nous terminons par une conclusion générale à la fin de ces quatre parties.

# RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

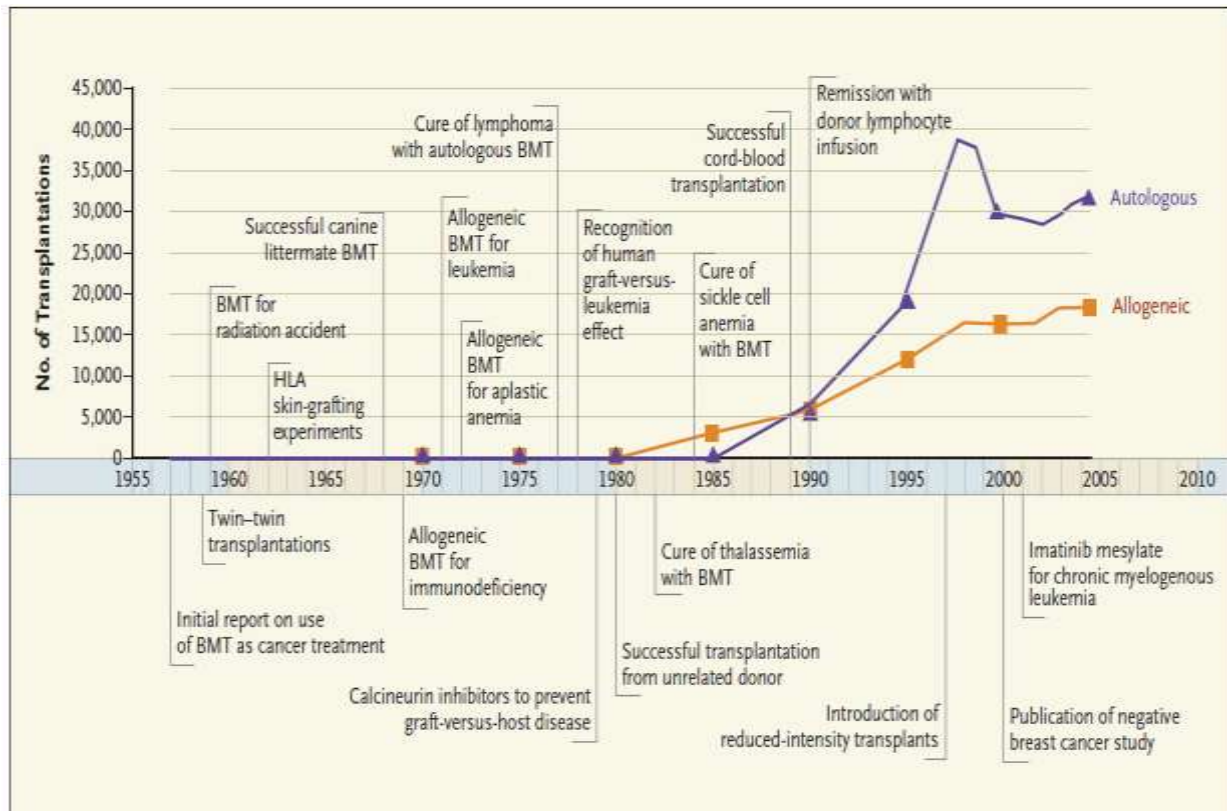
## I- ALLOGREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOIETIQUES (CSH).

(Copelan, 2006 ; Gyurkocza et al, 2010).

L'allogreffe de CSH représente une thérapie cellulaire pratiquée maintenant depuis plus de cinquante ans. Il s'agit d'une stratégie thérapeutique curatrice dans un grand nombre d'hémopathies malignes mais aussi bénignes (hémoglobinopathies, déficits immunitaires et certaines maladies génétiques par exemple). Dans les pathologies malignes, l'action curatrice repose essentiellement sur un effet immunologique du greffon lui même appelé effet du greffon contre maladie et dû principalement aux lymphocytes T. Dans les pathologies bénignes, l'effet curateur est principalement lié au remplacement pur et simple de la moelle du malade, (moelle à l'origine des anomalies génétiques ou structurelles des cellules) par une moelle saine capable de générer des cellules normales. Après des essais pratiqués chez l'animal au début des années cinquante, les premiers résultats de l'allogreffe sont rapportés chez l'homme en 1957 par Donnall Thomas (décédé en octobre 2012) et collaborateurs (Thomas et al, 1957). Six patients traités au préalable par chimiothérapie et radiothérapie ont reçu une infusion de moelle osseuse d'un donneur sain. La détection du greffon sera transitoire chez deux patients et tous décéderont avant le jour 100 post-greffe. L'activité d'allogreffe a ensuite connue une phase expérimentale et discrète jusqu'aux débuts des années 80 où la découverte des inhibiteurs de la calcineurine pour la prévention de la réaction du greffon contre l'hôte et la possibilité d'utiliser des donneurs alternatifs aux donneurs familiaux ont permis le développement exponentiel de cette thérapie cellulaire (Appelbaum, 2007) (**Figure 1**). Plus de 13 000 allogreffes ont ainsi été répertoriées en Europe jusqu'en 2010 (Passweg et al, 2012). Le développement des conditionnements non myélo-ablatifs et de la greffe de sang placentaire chez l'adulte est responsable en majeure partie d'une progression

importante du nombre d'allogreffes réalisées ces dix dernières années. Nous rappelons ci-dessous les principes généraux et les complications de l'allogreffe.

**Figure 1 :** Evolution de l'allogreffe de CSH depuis son origine (d'après Appelbaum, 2007).



### **I-1: Les conditionnements à la greffe.**

La préparation pour la greffe de CSH s'appelle le conditionnement. Il s'agit en général d'une poly-chimiothérapie ou d'une combinaison chimio-radiothérapie ayant trois buts principaux : la myélosuppression (destruction de la moelle) plus ou moins totale permettant de « faire de la place » pour l'installation du greffon ; l'action immunosuppressive pour garantir la prise du greffon et par voie de conséquence éviter son rejet ; l'action anti-tumorale afin d'éradiquer le plus possible les cellules tumorales résiduelles. On distingue en fait les conditionnements myélo-ablatifs qui ont été utilisés depuis l'origine et qui ont pour effet une éradication totale de la moelle du patient. Cet effet est assuré par deux conditionnements qui sont maintenant des standards : l'association Endoxan/Busulfan et l'association Irradiation Corporelle Totale (ICT) à forte dose/Endoxan (Ciurea & Andersson, 2009). Ces conditionnements sont réservés

à des sujets jeunes (<50 ans) du fait de leur toxicité importante pouvant entraîner jusqu'à 30 à 40 % de décès non lié à la rechute. Récemment la notion de conditionnement myéloablatif à toxicité réduite a fait son apparition, où l'on remplace l'ICT ou l'endoxan par de la fludarabine (analogue des purines de première génération) ou de la clofarabine (analogue des purines de deuxième génération) (protocole dit « FB4 » ou « CLOB4 ») (Chae et al ; 2007 ; Andersson et al ; 2011). La fin des années 1990 a été marquée par une importante révolution avec la démonstration qu'un conditionnement non myéloablatif ou à intensité réduite pouvait permettre une prise de greffe adéquate chez les patients (Giralt et al, 1997 ; Slavin et al, 1998 ; McSweeney et al, 2001). Ces conditionnements à toxicité réduite ont permis la réalisation de l'allogreffe chez des patients plus âgés ou avec des co-morbidités. Ces patients présentaient jusqu'alors une contre-indication pour un conditionnement myéloablatif et donc sans possibilité de réalisation d'une greffe standard et d'une action curatrice vis à vis de leur maladie. Les résultats des études rétrospectives comparant les conditionnements standards versus atténués seraient en faveur d'une survie globale identique chez les patients. Dans le premier cas en effet la survie sans rechute est meilleure mais les patients meurent plus de toxicité, dans le second cas, la toxicité est réduite mais les patients meurent plus de rechute (Aoudjane et al, 2005 ; Martino et al, 2006 ; Mohty et al, 2010). Les greffes à conditionnements atténués représentent aujourd'hui 40% environ de l'activité d'allogreffe en Europe (Passweg et al, 2012) et peuvent être réalisées chez les patients jusqu'à 65-70 ans (Chevallier et al, 2011).

### **I-2: Choix du donneur.**

Le choix d'un donneur repose en premier lieu sur la compatibilité tissulaire entre le donneur et le receveur. Cette compatibilité tissulaire correspond à l'expression similaire d'un certain nombre d'antigènes du soi, appelés encore antigènes HLA (pour human leucocyte antigens) ou antigènes majeurs d'histocompatibilité, à la surface des cellules. Le système HLA

regroupe plus de 200 gènes présents sur le bras court du chromosome 6. On distingue trois régions, groupes ou classes d'antigènes HLA : classes I, II et III. Chaque classe est subdivisée en plusieurs régions appelées locus. Seuls les loci A, B et Cw de la classe I et les loci DRB1, DQB1 de la classe II sont pris en compte pour la compatibilité entre patient et donneur (Klein & Sato, 2000a & 2000b). Ainsi, en France, la compatibilité maximale (greffe matchée) est celle où les 10 allèles A, B, CNW, DRB1, DQB1 du receveur correspondent aux mêmes 10 allèles chez le donneur (compatibilité dite 10/10ème). On estime alors que le risque de complications (rejet ou réaction du greffon contre l'hôte, voir plus loin) est minimale après la greffe. On tolère néanmoins des greffes 9/10ème (greffe mismatch). L'importance du matching DQB1 est discutée (greffe 8/8) (Kamani et al, 2008). A noter cependant que près de 70% des greffes matchées 8/8 sont en réalité matchées 10/10 en raison d'une association génétique forte entre les loci DR et DQ. On sait également qu'il existe un certain nombre d'antigènes mineurs d'histocompatibilité (MiHA) (HY, HA-1, HA-2, HA-3) (il s'agit essentiellement de gènes présents au niveau du chromosome Y chez l'homme) et un certain degré de polymorphisme non-HLA qui peuvent aussi influencer le devenir des patients après greffe, mais ceux-ci ne sont pas pris en compte actuellement pour le choix du donneur (Miklos et al, 2005 ; Bettens et al, 2012).

On distingue deux types de donneurs: les donneurs familiaux ou apparentés et les donneurs non familiaux ou non apparentés. Dans la famille, les lois de la génétique font que seuls les frères et sœurs (héritant également du patrimoine génétique pour moitié de la mère et pour l'autre moitié du père) peuvent être retrouvés HLA compatible 10/10 avec un patient. Il y a une chance sur quatre pour chaque individu et la probabilité globale estimée de trouver un donneur familial matché est d'environ 15-30%. On distingue les greffes syngéniques réalisées à partir d'un jumeau monozygote et les greffes dites génoidentiques réalisées à partir d'un frère ou d'une sœur non jumeau 10/10ème. Dans le cas où aucun donneur n'a été retrouvé, on



peut faire le choix d'un donneur seulement semi-compatible (5/10ème) familial (un parent, un frère, une sœur ou un enfant): on parle alors de greffe haplo-identique. Ce type de greffe a tendance à augmenter aujourd'hui et nécessite des conditionnements spécifiques et/ou des manipulations du greffon (T déplétion par exemple).

En l'absence de donneur apparenté matché (70-85% des cas), la recherche d'un donneur non apparenté est possible grâce à l'interrogation des fichiers nationaux et internationaux de donneurs volontaires. La probabilité de trouver un donneur 10/10ème non apparenté est d'environ 30 à 40% (on parle de greffe MUD pour matched unrelated donor). Dans certains cas, on tolère des greffes non apparentées 9/10ème (greffe mis-match non apparentée).

Lorsque plusieurs donneurs compatibles sont disponibles, le choix se fait sur un certain nombre d'autres facteurs comme l'âge et le sexe du donneur, le statut vis-à-vis du cytomegalovirus (séropositivité ou non) et la compatibilité de groupe sanguin ABO.

#### *Cas particulier du greffon de sang placentaire*

En l'absence de donneur, l'utilisation d'un sang placentaire est parfaitement envisageable aujourd'hui. Après avoir été utilisé initialement et restrictivement chez les enfants (pour des problèmes de quantité suffisante de cellules) pendant une vingtaine d'années, le sang de cordon est devenu une alternative fiable aux donneurs vivants depuis quelques années chez les adultes. Du fait de l'immaturité des cellules immunitaires du sang placentaire, seuls les loci A, B et DRB1 sont pris en compte pour la compatibilité maximale (6/6) entre donneur et receveur et des greffes mis-match sont permises (jusqu'à 4/6). Récemment l'importance du locus C a été néanmoins évoquée (Eapen et al, 2011).

Au total aujourd'hui, on peut admettre que presque 100% des patients peuvent avoir un donneur pour la réalisation d'une allogreffe lorsque celle-ci est indiquée, notamment pour les hémopathies à haut risque.

### I-3: les sources de greffons (Demiriz et al, 2012).

La transfusion du greffon, réalisée après l'administration du conditionnement et après prélèvement chez le donneur, survient par définition au jour 0. Les cellules les plus importantes du greffon sont les cellules souches CD34+ dont une certaine quantité (dépendante du poids du receveur) est requise pour permettre la prise de greffe. Ces cellules souches vont être à l'origine de la reconstitution d'une moelle nouvelle chez le patient. Trois sources de cellules souches sont aujourd'hui disponibles: la moelle osseuse, les cellules souches périphériques (CSP) et le sang placentaire. La moelle osseuse contient naturellement des cellules souches et a été la première source de greffon à être utilisée. Le prélèvement s'effectue au niveau de la crête iliaque postérieure chez le donneur sous anesthésie générale. Le sang périphérique ne contient quasiment pas de cellules souches. L'apparition du granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), facteur de croissance de la lignée blanche hématopoïétique, dans les années 80, a permis d'envisager de récupérer les cellules souches directement en périphérie. Après stimulation du donneur (4 ou 5 jours), ce facteur induit la mobilisation des cellules souches vers le sang périphérique où elles peuvent ensuite être récupérées par cytophérèse. Cette source de greffon a commencé à être utilisée au milieu des années 90 et représente maintenant la source principale des greffons (environ 60%). Le sang placentaire contient également des cellules souches en faible quantité mais leur capacité de prolifération est plus grande. On peut donc envisager d'utiliser cette source cellulaire comme greffon. Les principaux avantages et inconvénients de ces trois sources de greffons sont détaillés dans le **Tableau 1** ci-dessous.

**Tableau 1** : Principaux inconvénients et avantages des trois sources de greffons utilisés pour une allogreffe (d'après Michallet, 2011 & Demiriz et al, 2012).

	Types de Greffons		
	Sang Placentaire	CSP	Moelle
Recueil	Ponction de la veine ombilicale puis congélation (banques)	Stimulation par G-CSF : 10 µg/kg/j pendant 4 à 5 jours puis recueil par cytophèrese	Ponction crête iliaque postérieure sous anesthésie générale
Risques et désavantages pour le donneur	aucun	Oui Effet tardif du G-CSF ?	Oui Hospitalisation, risque anesthésique, douleur
Temps de recherche d'un donneur non apparenté (disponibilité)	<=1 mois	3 à 6 mois	3 à 6 mois
Facteurs limitant la prise de greffe	Compatibilité HLA Nombre de cellules souches	Compatibilité HLA	Compatibilité HLA
Facteurs influençant la survie	Echec ou retard à la prise de greffe Reconstitution immunitaire plus lente (risque infectieux)	GVH	GVH
Compatibilité HLA minimale possible	4/6	9/10 (ou 7/8)	9/10 (ou 7/8)
Nombre de cellules nécessaires	>3 10*7 CN/kg du receveur	2 à 8 10*6 CD34/kg du receveur	2 à 3 10*8 CN/kg du receveur
Risque de GVH Aiguë Chronique	Bas Bas Bas	Elevé Elevé Plus important	Elevé Elevé Elevé
Risque d'infections après greffe	Plus important	élevé	élevé
Possibilité d'immunothérapie après greffe (DLI)	aucune	possible	possible

Abréviations : CSP : cellules souches périphériques ; GVH : réaction du greffon contre l'hôte ; DLI : donor lymphocyte infusion ou injection de lymphocytes du donneur ; G-CSF : granulocyte colony stimulating factor; CN : cellules nucléées.

#### **I-4: Complications post-allogreffe.**

##### **a) Réactions du greffon contre l'hôte (ou GVHD pour graft versus host disease)** (Ferrara et al, 2009).

C'est une des complications majeures de l'allogreffe de CSH et qui repose sur une « attaque » du greffon vis-à-vis de l'hôte receveur. Elle est la cause d'une morbidité et d'une mortalité encore importante après greffe. Elle survient chez environ 70% des malades et entraîne le décès dans à peu près 30% des cas (jusqu'à 80-90% des cas dans les formes sévères) (Cahn et al, 2005). On distingue deux types de GVH : la GVH aiguë habituellement précoce (survenant classiquement dans les 100 premiers jours) et la GVH chronique, plus tardive, chacune présentant une physiopathologie particulière et des manifestations cliniques spécifiques. La GVH est paradoxalement associée également à un effet bénéfique car il est admis que la survenue d'une GVH s'accompagne d'un effet greffe contre maladie.

Les critères pour la survenue d'une GVH ont été définis par Billingham en 1966 (Billingham et al, 1966):

-le greffon doit contenir des cellules immunocompétentes : lymphocytes T, cellules Naturel killer (ou NK) principalement.

-le receveur doit posséder des antigènes absents chez le donneur (allo-antigènes) qui apparaissent donc comme étrangers au greffon et engendrent ainsi une réponse immunitaire du greffon vis à vis de l'hôte.

-le receveur doit être incapable de produire lui-même une réponse immunitaire contre le greffon. C'est la conséquence des traitements et du conditionnement reçus avant la greffe proprement dite. L'activité immunosuppressive du conditionnement vise à détruire le système immunitaire du patient afin qu'il accepte et ne rejette pas le greffon.

Un quatrième critère a récemment été proposé par R Sackstein (2006) reposant sur la nécessité pour les cellules effectrices de la GVH (lymphocytes principalement) de migrer au niveau des tissus cibles.

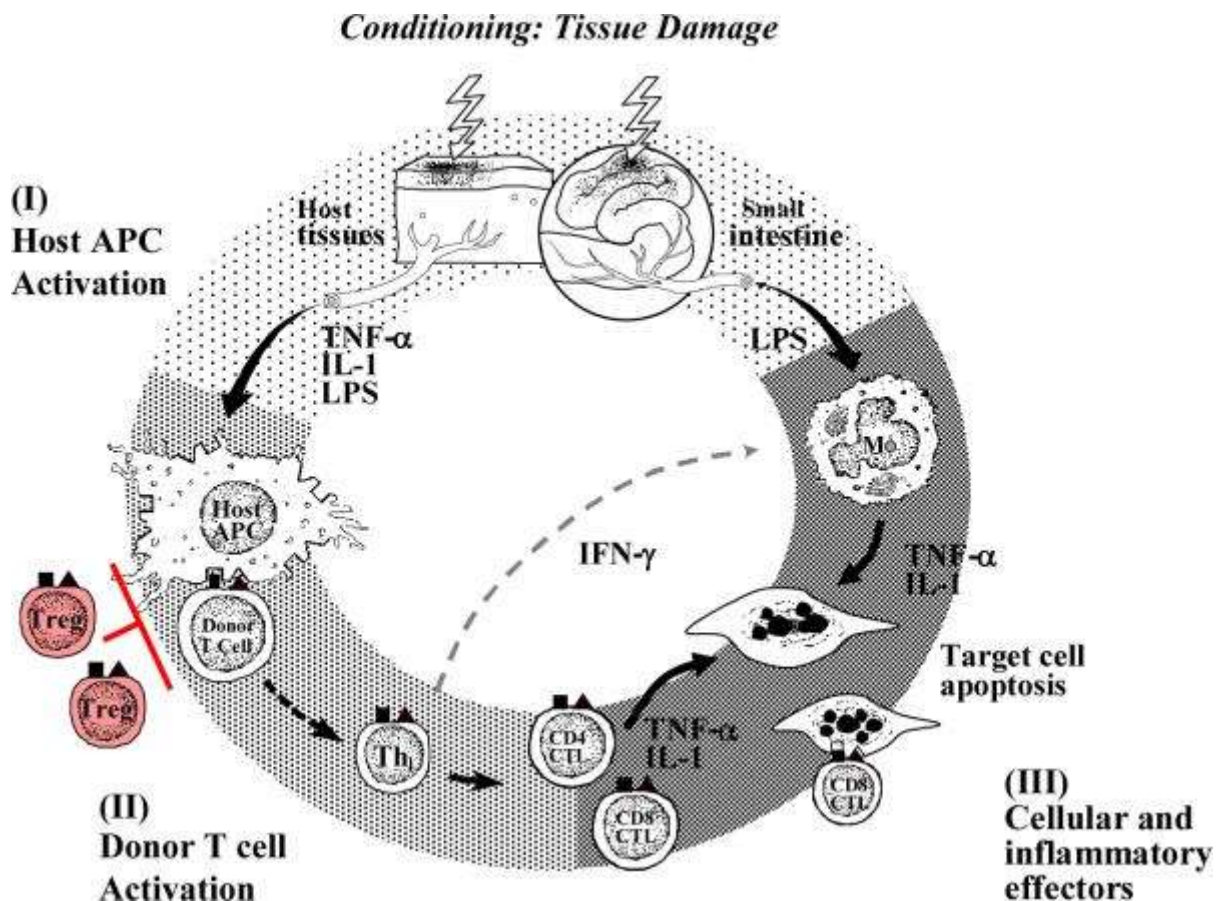
Les antigènes reconnus dans la réponse allogénique peuvent être les molécules du complexe majeurs d'histocompatibilité (CMH) de classe I (HLA A, B, Cw) ou II (HLA DP, DQ, DR), des antigènes mineurs d'histocompatibilité, des antigènes polymorphiques non HLA et peut être des antigènes viraux (cytomégalovirus). Les molécules HLA de classe I sont exprimées par quasiment toutes les cellules nucléées de l'organisme avec cependant un degré d'expression variable. Les molécules HLA de classe II sont exprimées principalement par les lymphocytes B, les cellules dendritiques, et les monocytes.

La physiopathologie de la GVH aiguë reste beaucoup mieux connue que celle de la GVH chronique qui s'apparente à une maladie auto-immune. La survenue d'une GVH aiguë distingue trois étapes successives dans le modèle actuellement admis (voir **Figure 2**): Après les dommages tissulaires induits par le conditionnement, une première étape survient qui consiste en une activation au niveau tissulaire des cellules présentatrices d'antigènes de l'hôte avec production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF alpha) ; une seconde étape lui succède avec activation des lymphocytes T alloréactifs du donneur et sécrétion de cytokines de type Th1 (IL-2, TNF alpha, IFN gamma); finalement une troisième étape apparaît correspondant à l'activation des cellules effectrices (lymphocytes T CD8+ cytotoxiques, cellules NK, macrophages principalement) par les cytokines produites lors de la deuxième étape.

La prévention de la GVH repose sur l'administration d'un traitement immunosuppresseur en plus du conditionnement. Classiquement on utilise une association de ciclosporine (neoral®, inhibiteur de la calcineurine apparu dans les années 1980) et de méthotrexate à petites doses (drogue la plus anciennement utilisée dans cette indication) ± du sérum antilymphocytaire T (SAL) (si donneur non apparenté) dans les conditionnements myéloablatifs. Dans les RIC, on utilise une association de ciclosporine et de SAL +/- du mycophenolate mofétyl (MMF, ou cell-cept®) (si donneur non apparenté). D'autres molécules peuvent être utilisées comme le

sirolimus (ou rapamune®, inhibiteur de la voie cellulaire mTOR) ou le tacrolimus (prograf®, autre inhibiteur de la calcineurine) ou des anticorps monoclonaux anti-TNF ou anti récepteur à l'interleukine-2 (IL-2) (infiximab, daclizumab, basiliximab (simulect®), inolimomab). Une déplétion du greffon en lymphocytes T (par sélection positive CD34+ par exemple) est possible mais entraîne un risque accru de rejet et de rechute.

**Figure 2** : Modèle physiopathologique de la GVH aiguë (d'après Ferrara et al, 2009).



Les facteurs de risques de la GVH identifiés sont nombreux : disparité HLA, mis-match sexuel, allo-immunisation avec anticorps anti-HLA, âge du receveur, statut CMV positif, intensité du conditionnement et du traitement immunosuppresseur, la maladie et le statut avant greffe, le polymorphisme génétique entre donneur/receveur pour les gènes codant pour les cytokines impliquées dans la « tempête cytokinique » ou l'expression variante du gène NOD2/CARD15. Le type de greffon a aussi une influence importante. En effet, on constate plus de GVH chronique extensive avec un greffon CSP, ceci étant probablement lié à la présence d'au moins 10 fois plus de lymphocytes injectés chez le receveur par rapport à des greffons médullaires ou placentaires. On constate par contre moins de GVH aiguë ou chronique avec un sang placentaire, ceci étant probablement lié à l'injection de lymphocytes naïfs et en faible quantité chez le receveur.

La physiopathologie de la GVH chronique associerait quant à elle une évolution vers un profil lymphocytaire Th2 (secrétions d'IL-4 et d'IL-10 qui stimulent la production de collagène par les fibroblastes) et une réaction « auto-immune » qui serait consécutive à l'absence de sélection négative thymique des lymphocytes « auto-réactifs ».

Les manifestations cliniques sont spécifiques également lorsque l'on considère les formes aiguë (atteintes cutanée, hépatique et digestive) et chronique (atteintes cutanée sclérodermiforme, oculo-buccale, pulmonaire) de GVH. Le traitement de référence est la corticothérapie à la dose de 1 à 2 mg/kg/jour en association ou non avec de la ciclosporine. Le traitement de deuxième ligne n'est pas standardisé.

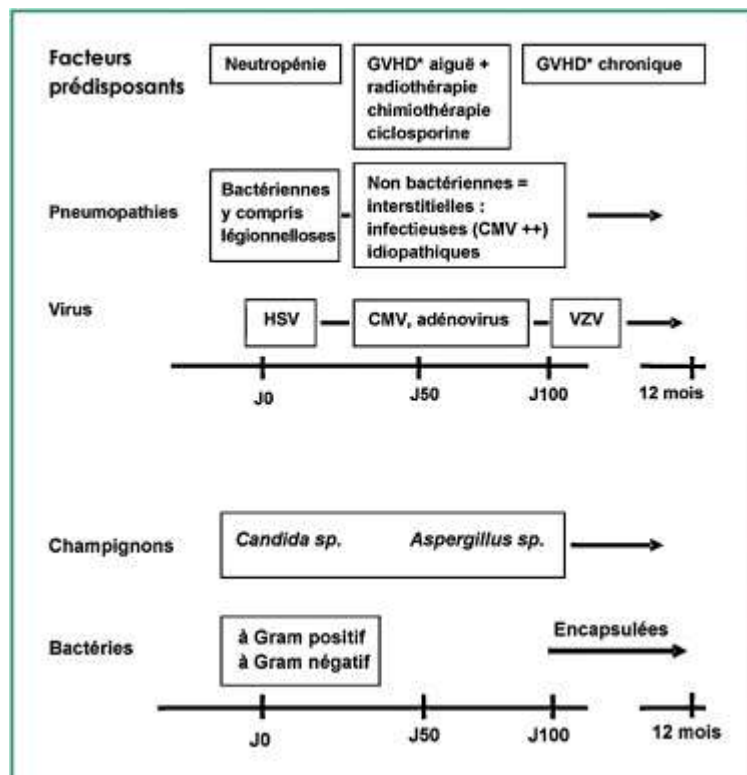
### **b) Complications infectieuses après allogreffe de CSH.**

Les infections sont fréquentes et responsables là encore d'une morbidité et d'une mortalité importantes après allogreffe. La neutropénie du premier mois (aplasie) est responsable surtout de complications infectieuses bactériennes (bacilles gram – et cocci gram +) et fongiques (aspergillose). Le traitement immunosuppresseur entraîne des complications surtout virales à

partir du deuxième mois (CMV, EBV, adénovirus). La corticothérapie prolongée en cas de GVH est responsable d'un risque fongique important. Après le 100ème jour, le risque d'infections à germes encapsulés (surtout si le patient a reçu une ICT entraînant une asplénie fonctionnelle) et à virus VZV est majoré. Le risque infectieux dépend aussi de l'origine du greffon, avec un risque deux à trois fois supérieur de développer une infection en cas de donneur non apparenté, de neutropénie prolongée après greffe de sang placentaire, ou de faible richesse du greffon en lymphocytes T (greffe de sang placentaire également).

La chronologie des infections survenant après allogreffe est représentée dans la **Figure 3**.

**Figure 3:** Chronologie des complications infectieuses après allogreffe (d'après Michallet, 2011).



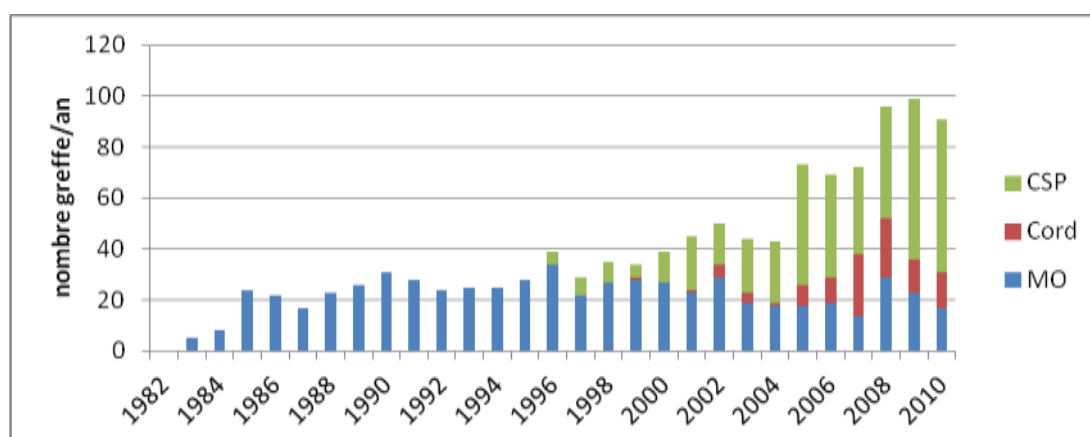
**I-5: L'allogreffe de sang placentaire chez l'adulte (Sauter & Barker, 2008).**

La première greffe de sang placentaire a été réalisée à l'hôpital Saint-Louis en 1988 chez une enfant atteinte de maladie de Fanconi (Gluckman et al, 1989). L'indication de la greffe de sang placentaire a été réservée ensuite pendant une dizaine d'années aux enfants en raison de la quantité de cellules souches nécessaire pour réaliser la greffe et qui est dépendante du poids



du receveur. On admet en effet que le greffon doit contenir une quantité d'au moins  $3 \cdot 10^7$  cellules nucléées/kg du receveur pour pouvoir obtenir une prise de greffe. Cette quantité est difficilement atteignable avec un seul cordon chez les adultes. Par contre en injectant deux unités de sang placentaire à la fois, cette quantité peut facilement être atteinte. La constatation que l'on pouvait réaliser sans problème de compatibilité des greffes de double sang placentaire chez l'adulte au début des années 2000, a permis d'envisager cette approche de manière courante chez les patients sans donneur. Ainsi depuis 2005 environ, le nombre de greffe de sang placentaire a augmenté de manière importante dans les services d'hématologie adulte comme on peut le constater sur la **Figure 4** qui détaille le nombre de greffes en fonction du type de greffon à Nantes.

**Figure 4:** Allogreffes réalisées à Nantes depuis l'origine jusqu'en 2010 en fonction du type de greffon (moelle (MO), CSP ou greffon placentaire (Cord)).



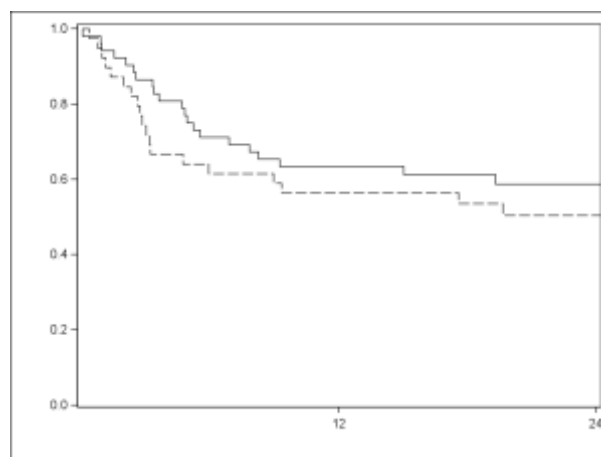
Les avantages et les inconvénients de la greffe de sang placentaire sont détaillés dans le **Tableau 1** (page 21). Ainsi, le risque infectieux est plus important alors que le risque de GVH est considéré moindre après greffe de sang placentaire en comparaison des autres types de greffon. Ce profil particulier est lié à l'immaturité des cellules T (T naïfs) et à la faible quantité de cellules souches et de lymphocytes T contenus dans le greffon placentaire. On observe ainsi fréquemment un retard à la prise de greffe ou une non prise (qui augmentent le risque

infectieux) et une moindre production de cytokines inflammatoires (TNF alpha et IFN gamma) par les lymphocytes T.

Par ailleurs, les comparaisons rétrospectives entre greffe de moelle à partir d'un donneur non apparenté et greffe de sang placentaire après conditionnement myélo-ablatif pour traitement de leucémies ont montré des survies sans maladie comparables à la fois chez les enfants (Eapen et al, 2007) et chez les adultes (Laughlin et al, 2004 ; Rocha et al, 2004). De même après RIC, des études rétrospectives montrent que les survies semblent comparables après greffe de CSP ou greffe de sang placentaire (Majhail et al, 2008 ; Chen et al, 2012), ce que confirme également notre expérience (LeBourgeois et al, 2012, **Figure 5**). Dans un certain nombre de cas, le sang placentaire peut donc être considéré comme une alternative parfaitement appropriée chez des patients adultes éligible à la greffe et sans donneur. L'immaturation des cellules immunitaires du sang placentaire permet de plus une incompatibilité HLA entre le receveur et le donneur, ce qui explique que plus de 95% des patients caucasiens peuvent être assurés d'avoir un greffon disponible en cas d'indication de ce type d'allogreffe.

Nous discutons par ailleurs des relations entre greffe de sang placentaire et infection virale à herpèsvirus de type 6 (HHV-6) dans la **Partie III** de ces **Rappels Bibliographiques**.

**Figure 5** : Comparaison de la survie sans maladie à 2 ans après greffe à conditionnement atténué de CSP (n=52 ; \_\_\_\_\_) ou de sang placentaire (n=39, - - - - -) : 59% vs 50.5% ; p=0.43) (d'après LeBourgeois et al, 2012).



## **II- HERPES VIRUS HUMAIN DE TYPE 6 (HHV-6).**

Le sixième herpesvirus humain a été découvert en 1986 à partir de prélèvements de sujets (dont certains sidéens) présentant un syndrome lympho-prolifératif (souche GS) (Salahuddin et al, 1986). Ce nouveau pathogène, lymphotrope et strictement humain, qui n'était pas reconnu par les sondes nucléiques des cinq premiers *Herpesviridae*, mais qui en possédait les caractéristiques morphologiques, fut d'abord dénommé HBLV pour human B lymphotropic virus, parce qu'isolé au niveau des lymphocytes B. On découvrira un peu plus tard que la cible principale de ce virus est le lymphocyte T CD4+, ce qui conduira, compte-tenu aussi de ses caractéristiques, à renommer le virus tel qu'il est connu aujourd'hui (Ablashi et al, 1987 ; Lusso et al, 1987).

### **II-1 : Caractéristiques virales.** (Fauquet et al, 2005 ; De Bolle et al, 2005 ; Dockrell, 2003).

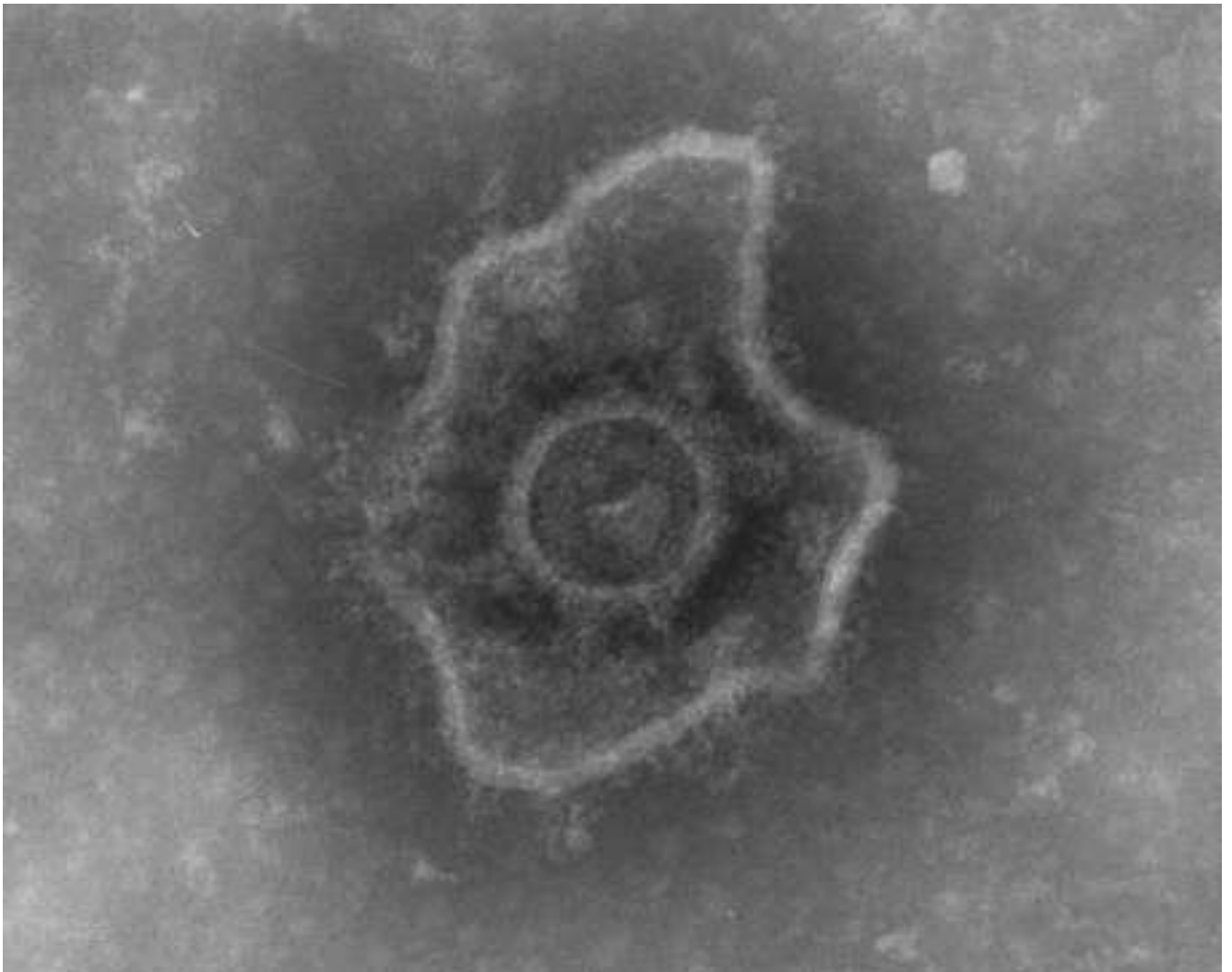
Les virus sont classés en série et en fonction de leur appartenance à un ordre, une famille, une sous-famille et un genre. Cette nomenclature internationale est établie et révisée régulièrement par le comité international de taxonomie des virus (ICTV pour International Committee on the taxonomy of viruses) et repose sur les caractéristiques constitutionnelles (génomique, capsidique, tégumentaire, enveloppe) et biologiques (durée du cycle de réplication, siège de latence) du virus lui-même mais aussi sur le type d'hôte ou le type de cellules infectées. La famille des *Herpesviridae* appartient à l'ordre des *Herpesvirales* et comprend 9 pathogènes connus à ce jour : HSV-1, HSV-2, HSV-3 ou VZV, HSV-4 ou EBV, HSV-5 ou CMV, HHV-6A et HHV-6B, HHV-7 et HHV-8. Cette famille est divisée en trois sous-familles : *Alphaherpesvirinae* (HSV-1, HSV-2, VZV), *Betaherpesvirinae* (CMV, HHV-6A et HHV-6B, HHV-7) et *Gammaherpesvirinae* (EBV, HHV-8). HHV-6A et HHV-6B et HHV-7 appartiennent au genre *Roseolovirus* de la sous-famille *Betaherpesvirinae*. Jusqu'en 2011, on distinguait en fait 2 variants pour HHV-6 qui était considéré comme une seule espèce. En

2011, l'ICTV a décidé de séparer, compte-tenu de leur profil d'infections, ces deux variants en deux espèces distinctes.

#### Structure du virus HHV-6

HHV-6 est composé, comme les autres *Herpesviridae*, de quatre éléments superposés: un acide nucléique, une capside, un tégument et une enveloppe comme indiqué sur la **Figure 6** ci-dessous. Les virions HHV-6 ont un diamètre compris entre 160 et 200 nm.

**Figure 6:** Vue en microscopie électronique du virus HHV-6.



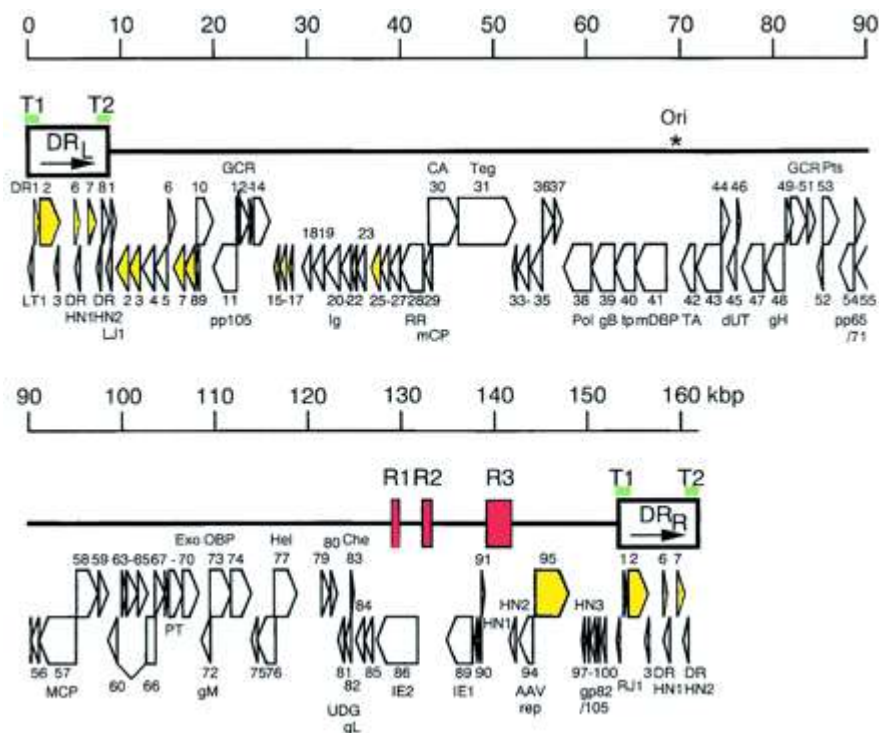
*Acide nucléique (Figure 7)*: Le génome viral correspond à un ADN double brin linéaire de grande taille (160-162 kb) comportant une longue région unique (U) de 143-145 kb interrompue par trois séquences répétitives internes désignées R1, R2 et R3 au niveau de la région dite « immediate early A » (IE-A) et flanquée aux extrémités par des séquences répétitives de 8-9 kb (région DRl et DRr pour « direct repeats » left et right) orientées dans le même sens. A l'extrémité des régions DR, on retrouve des séquences hexanucléotidiques (GGGTTA), répétées en tandem, qui sont identiques aux régions télomériques répétées des chromosomes humains. La région unique comporte 100 gènes, dénommés U1 jusqu'à U100, (dont 70 gènes homologues avec le CMV) et répartis en une région beta correspondant au bloc de gènes propres aux membres de la sous-famille des *Betaherpesvirus* et 7 régions (ou blocs), numérotés de 1 à 7, correspondant aux gènes conservés chez tous les herpesvirus. Les régions DR comportent 7 gènes chacune (DR1 jusqu'à DR7). En fonction du moment où ils sont transcrits, on distingue chez HHV-6, comme pour les autres herpesvirus, trois classes principales de gènes :

- 1) les gènes transcrits très précocement (gènes IE pour immediate early ou gènes alpha) : ces gènes sont transcrits quelques heures après le début de l'infection. Exemple : DR1, DR6, U2, U3, U86, U90, U91.
- 2) les gènes transcrits précocement (gènes E pour early ou gènes beta) : ils sont activés par les protéines très précoces et leur transcription commence dès la fin de la phase très précoce. Exemple : U38 qui code pour l'ADN polymérase du virus, U41 qui code pour la protéine majeure de liaison à l'ADN, U79 qui code pour une protéine qui permet la réplication de l'ADN viral.
- 3) les gènes tardifs (gènes L pour Late ou gènes gamma) : ils codent pour des protéines tardives comme les protéines de la capsid ou les glycoprotéines de l'enveloppe.

Exemple : U11 (protéine structurale de la capside), U39 (glycoprotéine gB),  
 U48 (glycoprotéine gH), U72 (glycoprotéine gM), U82 (glycoprotéine gL), U100  
 (glycoprotéine gQ).

Il existe une variabilité génétique de HHV-6 responsable d'un polymorphisme viral avec pour conséquence l'existence de deux espèces virales dites A et B. Le premier séquençage du génome de HHV-6A a été réalisé en 1995 (Gompels et al, 1995), celui du HHV-6B en 1999 (Isegawa et al, 1999 ; Dominguez et al, 1999). Les deux espèces partagent 90% d'homologie et varient principalement au niveau de la séquence IE-A (gènes précoces U86 à U95, sauf U94), et au niveau des gènes allant d'U97 à U100 (gènes codant pour le complexe de glycoprotéine d'enveloppe gp82-gp105). L'espèce A comporte 110 cadres ouverts de lecture (ou ORFs pour open reading frame) pour la transcription des gènes alors que l'espèce B en possède 119 dont 9 uniques et spécifiques, désignés B1 à B9. Seuls 97 gènes sont impliqués dans la transcription. HHV-6A et HHV-6B partagent des gènes propres à tous les *Beta-herpesvirinae* (CMV, HHV-7) mais aussi des gènes propres aux *Roseolovirus* (HHV-7) comme U20, U21, U23, U24, U73 ou U100. Par contre les gènes DR3, U6, U22, U83, U86 et U94 n'existent que chez les deux espèces d'HHV-6.

**Figure 7:** Structure génomique du virus HHV-6 (d'après Isegawa et al, 1999).



*Capside* (Brown et al, 2011): L'acide nucléique du virus est encapsidé (ou contenu) dans une structure protéique, appelé capsid, qui mesure 90 à 110 nm de diamètre. La structure de la capsid est en fait commune à tous les herpesvirus. Cette capsid a une forme régulière, globalement sphérique, présentant les points et axes de symétrie d'un icosaédre, comprenant 12 sommets et 20 faces égales correspondant à des triangles équilatéraux. Chaque triangle est composé de plusieurs capsomères. Au total, la capsid totalise 162 capsomères. Les unités de structure composant les capsomères correspondent à la protéine majeure de la capsid ou MCP (major capsid protein) codée par U57 (90% des protéines de la capsid). Mais la capsid comprend également une protéine dite protéine mineure de la capsid mSCP (minor capsid protein), codée par U29, et qui permet l'ancrage de l'ADN génomique, ainsi qu'une protéase virale et des protéines d'échafaudage (scaffold proteins).

*Tégument* : Il s'agit d'une structure fibrillaire protéique, appelée aussi matrice, et mal définie, comprise entre la capsid et l'enveloppe. Le tégument est constitué de protéines de l'hôte et de protéines virales dont U100P1S et U100P2S. Sa répartition est asymétrique autour de la capsid et sa taille varie en fonction de la localisation du virus chez l'hôte.

*Enveloppe* : Il s'agit d'une membrane constituée d'une bicouche lipidique (dérivée des membranes cellulaires) et de glycoprotéines virales (spicules ou spikes) qui entoure la capsid et le tégument. Ces glycoprotéines (et donc l'enveloppe qui les porte) sont indispensables à l'infectiosité du virus, c'est-à-dire l'entrée du virus dans la cellule hôte. Certaines sont bien connues comme celles codées par U39 (protéine gB), U48 (protéine gH), U72 (gM), U82 (gL) et U100 (gQ).

## II-2 : Cycle de réplication (Figure 8).

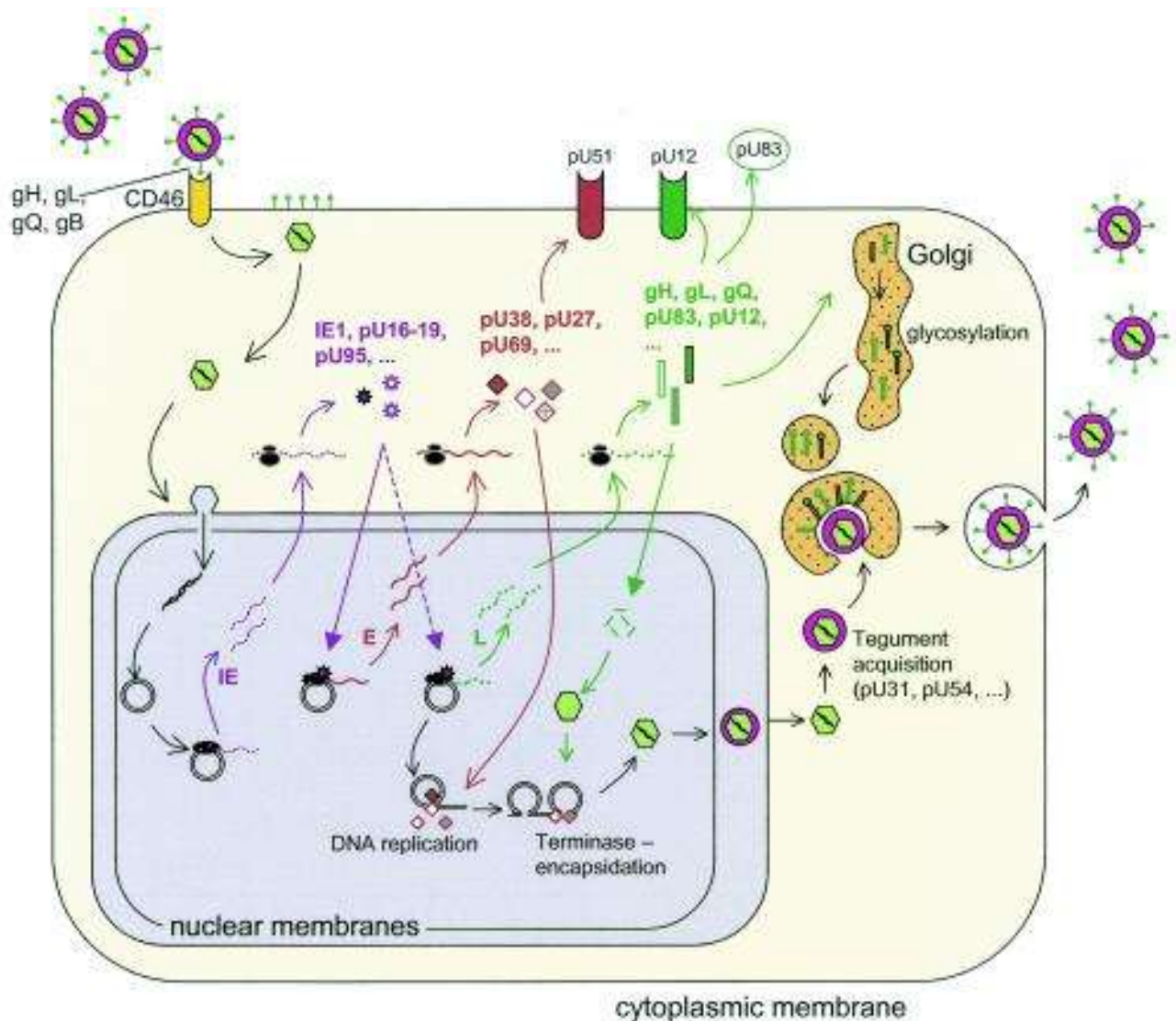
Le cycle de réplication du virus HHV-6 reproduit globalement celui des *Herpesviridae*. Ce cycle est long, d'environ 72 heures. La première étape est la fixation du virus sur les cellules. Le seul récepteur cellulaire connu pour les deux espèces HHV6 est le CD46, une protéine ubiquitaire qui régule l'activation du complément (Santoro et al, 1999). Nous en parlons plus largement dans l'introduction de la **Partie Expérimentale III** de cette thèse. HHV-6A se fixe sur la cellule cible grâce au complexe glycoprotéique gH-gL-gQ1-gQ2 (glycoprotéines H codée par U48, L codée par U82 et Q codée par U100) contenu dans son enveloppe virale (Mori et al, 2003). Un autre complexe glycoprotéique (gH-gL-gO) a été identifié pour HHV-6A dont le rôle reste indéterminé et qui ne reconnaît pas CD46 (Mori et al, 2004). HHV-6B se fixe sur les cellules aussi via le CD46 mais pas uniquement (Santoro et al, 1999 ; Mori et al, 2002). Il existe clairement au moins un autre récepteur cellulaire qui n'a pas encore été identifié. De même le complexe glycoprotéique de HHV-6B permettant sa fixation sur la cellule n'a pas encore été reconnu mais la glycoprotéine gQ1 joue un rôle certain dans cette fixation (Kawabata et al, 2011). Enfin, il a été démontré que la réorganisation de la membrane cellulaire cible en microdomaines lipidiques (« lipid raft ») était nécessaire à l'entrée du virus dans les cellules (Tang et al, 2008).

L'enveloppe virale de HHV-6 fusionne ensuite avec la membrane cellulaire. La protéine gB (codée par U39) de HHV-6A est impliquée dans cette fusion (Takeda et al, 1996). Le virus débarrassé de son enveloppe migre vers le noyau cellulaire. Dans le noyau, l'ADN viral se circularise (on l'appelle alors épisome). Il y a ensuite une phase de décapsidation avec perte des protéines de la capsidie sous l'action de différentes enzymes lysosomales qui va rendre possible la synthèse de nouveaux virus à partir de l'ADN viral. La machinerie de transcription (production d'ARN viral) puis de traduction (production des protéines virales successivement très précoces puis précoces puis tardives) se met en marche. La réplication de l'ADN sous



l'action de l'ADN polymérase (codée par U38) s'effectue selon un mécanisme de cercle roulant (Martin et al, 1991). Finalement, une nouvelle capside se forme dans le noyau puis le nouveau virion quitte le noyau et s'entoure d'une nouvelle enveloppe. L'acquisition de l'enveloppe virale définitive se fait probablement par bourgeonnement dans les vésicules de l'appareil de Golgi. L'enveloppe fusionne avec la membrane cellulaire et est excrétée par la cellule par exocytose. Ce cycle lytique définit la permissivité des cellules aux virus HHV-6A et B.

**Figure 8:** Cycle de réplication du virus HHV-6 (d'après De Bolle, 2005).



### II-3 : Tropisme cellulaire et tissulaire : Permissivité, Latence et Intégration chromosomique . (Dockrell, 2003 ; De Bolle, 2005 ; Lusso, 2006).

#### *Permissivité*

L'observation d'un cycle cellulaire lytique complet d'un virus définit la permissivité des cellules à ce virus. Les nombreuses expériences d'infections conduites *in vitro* avec HHV-6A ou B ont démontré qu'un nombre important de types cellulaires sont permissifs. Ceci est probablement lié en partie, pour HHV-6A, à l'ubiquité de son récepteur cellulaire, le CD46. La réplication cellulaire de HHV-6 entraîne un effet cytopathogène qui se caractérise par un aspect ballonné des cellules puis par une lyse cellulaire, survenant en général au bout d'une semaine *in vitro*. La réplication des deux espèces HHV-6A et 6B a lieu principalement dans les lymphocytes T exprimant la molécule CD4, comme le VIH. Les deux espèces infectent également les monocytes/macrophages, les progéniteurs hématopoïétiques et les cellules dendritiques, mais seul HHV-6A semble infecter les cellules T CD8+, les cellules NK et les cellules T gamma/delta. HHV-6A semble de plus pouvoir infecter les cellules B mais seulement en cas d'immortalisation de ces cellules avec le virus EBV.

D'autres types cellulaires peuvent être infectés par l'une ou l'autre des deux espèces : hépatocytes, cellules épithéliales, cellules endothéliales, astrocytes fœtaux, oligodendrocytes, cellules microgliales, thymocytes, fibroblastes.

Plusieurs souches d'HHV-6 isolées à partir de patients (il existe une variabilité génétique au sein même de chaque espèce A et B qui caractérise chaque souche de référence (Achour et al, 2008)) sont disponibles pour les études *in vitro*. Ces différentes souches virales, qui infectent différentes lignées cellulaires tumorales immortelles T, permettent la production du virus au laboratoire (**Tableau 2**).

**Tableau 2:** Principales souches virales d'HHV-6 utilisés pour les études in vitro.

Souches	Espèce	Lignée cellulaire T de culture	Références
GS	A	HSB-2, Molt3 H9, 6D5	Salahudin et al, 1986 Ablashi et al, 1987 Ablashi et al, 1988 Ablashi et al, 1989
U1102	A	J Jhan, HSB-2 CEM, H9, Jurkat	Downing et al, 1987 Wyatt et al, 1990 Gompels et al, 1995
Z29	B	Molt 3, MT4, J Jhan	Lopez et al, 1988 Black et al, 1989 Ablashi et al, 1991 Pellet et al, 1992 Dominguez et al, 1999
HST	B	MT4, HBP-ALL	Asada et al, 1989 Isegawa et al, 1999

HHV-6 a été par ailleurs détecté dans un grand nombre de tissus humains : cerveau, foie, amygdales, glandes salivaires, endothéliums, moelle osseuse.

### *Latence*

L'état de latence se définit par l'absence de réplication du virus mais sa persistance dans la cellule infectée (état « dormant » non productif). Le virus n'est pas éradiqué, ce qui suppose un équilibre entre l'hôte et l'agent viral. Quand cet équilibre est rompu (immunosuppression ou survenue d'une autre infection par exemple), le virus peut se réactiver. Les sites de latence identifiés pour HHV-6 sont les cellules cérébrales, les cellules épithéliales des glandes salivaires, les monocytes/macrophages et les progéniteurs hématopoïétiques (Andre-Garnier et al, 2004). Les mécanismes impliqués dans ce phénomène de latence sont mal connus mais la protéine U94 semble jouer un rôle prépondérant, dans la mesure où elle est peu exprimée pendant la phase de réplication de HHV-6 alors qu'au contraire elle est fortement exprimée pendant l'infection latente (Rapp et al, 2000). Les séquences hexanucléotidiques (GGGTTA) répétées en tandem à l'extrémité des régions DR du génome du virus, séquences identiques

aux régions télomériques répétées des chromosomes humains, pourraient jouer également un rôle dans le maintien du génome viral à l'état latent dans les cellules infectées.

#### *Intégration chromosomique.*

Une forme très particulière et unique de persistance pour les deux espèces HHV-6A et 6B est leur possible intégration au génome de chaque cellule de l'hôte, au niveau de la partie terminale télomérique des chromosomes 1, 17 et 22 (Luppi et al, 1994 ; Daibata et al, 1998 & 1999 ; Morris et al, 1999). La prévalence de cette intégration chromosomique de HHV-6 est estimée à environ 1 à 2% de la population. La signification, les mécanismes exacts et les conséquences d'une telle intégration restent peu connus (Pellett et al, 2012). Elle est suspectée devant la détection d'une forte charge virale sanguine (> 5 ou 6 log/ml de sang, voir plus loin). Il peut y avoir transmission de cette anomalie entre génération (Mori et al, 2009) mais aussi après greffe de CSH si le donneur est porteur de l'anomalie (Kamble et al, 2007). On peut également constater la disparition de l'intégration après greffe de CSH si au contraire c'est le patient lui-même qui est porteur (Hubacek et al, 2007). Cette intégration chromosomique n'a pas été associée pour le moment à des manifestations cliniques (Zerr, 2012).

#### **II-4 : Méthodes de détection du virus HHV-6.**

On distingue les méthodes de détection directes (détection qualitative ou quantitative du virus ou d'un de ses constituants) et indirectes (détection des anticorps produits en réponse à l'infection virale).

#### *Culture cellulaire et détection des antigènes viraux.*

La culture cellulaire est une technique directe qui a permis la découverte du virus à l'origine (Salahuddin et al, 1986). Elle est peu sensible et demande du temps. Les cellules

mononucléées du patient sont cultivées pendant 2 à 3 semaines en présence d'IL-2 et de cellules mononucléées d'un donneur sain ou d'un sang placentaire activées au préalable par de la phytohémagglutinine. L'apparition d'un effet cytopathique caractéristique avec une ballonnisation et une réfringence des cellules puis la lyse cellulaire observée en microscopie inverse signe l'infection active des cellules. Cette technique permet simplement d'indiquer une infection virale active chez le patient (ou le donneur sain !) mais ne dit pas quel virus en est responsable. Il faut donc identifier celui-ci par des anticorps monoclonaux dirigés contre des protéines virales spécifiques ou par détection d'ADN viral. Il existe un certain nombre d'anticorps monoclonaux qui sont dirigés contre des antigènes d'HHV-6 (glycoprotéines d'enveloppe ou protéines nucléaires). Certains anticorps détectent les deux espèces A et B sans distinction (OHV1, OHV2, OHV3, OHV9, 2D10, 2B9, 7C7, 8C8, ect) (Fao-Tomasi et al, 1992 ; Okuno et al, 1990 & 1992, Robert et al, 1998) alors que d'autres permettent de détecter uniquement l'espèce A (2D9, P6H8,ect) ou l'espèce B (C3108-103,ect) (Aubin et al, 1993 & 1994 ; Campadelli Fiume et al, 1993 ; Pellett et al, 1993 ; Arsenault et al, 2003). Ces anticorps peuvent également être utilisés pour la détection des antigènes viraux dans le sang périphérique ou dans les tissus par immunohistochimie (Robert et al, 1990 ; Fillet et al, 1996).

#### *Amplification génique*

Les techniques directes d'amplification génique sont les plus communément utilisées pour la détection du génome viral dans le plasma, le sang total ou le liquide céphalo-rachidien. Elles peuvent également être utilisées pour déterminer le niveau de permissivité des cellules isolées *ex vivo* ou cultivées *in vitro*. La plupart des méthodes utilisées actuellement sont des PCR en temps réel, qui permettent de quantifier l'ADN viral en fonction d'une gamme étalon (dilutions successives d'un standard préparé au laboratoire). Ces techniques ne sont malheureusement pas standardisées à l'heure actuelle (quelle amorce privilégier par exemple?) et leurs performances dépendent hautement de la qualité de l'extraction génomique. La méthode

couramment utilisée à Nantes a été développée à partir des données obtenues par l'équipe de la Pitié-Salpêtrière suivant la technologie TaqMan (Gautheret-Dejean et al, 2002). Cette technique quantitative permet la détection des deux espèces A et B à la fois, grâce à l'amplification d'un fragment de la région U65-U66 du génome d'HHV-6. La détermination de l'espèce HHV-6 impliquée requiert ensuite la réalisation d'autres PCR amplifiant spécifiquement l'une ou l'autre espèce ou la réalisation d'un séquençage dans une zone discriminante du génome viral. Quelques méthodes de détection des transcrits viraux d'HHV-6 ont été publiées, en particulier celle mise au point par l'équipe de virologie de Nantes, utilisant une méthode de RT PCR en une étape et permettant la détection de l'ARN messager du gène U100 d'HHV-6 (correspondant à la phase tardive du cycle) (André-Garnier et al, 2003). Récemment, une amélioration de la méthode a été apportée par son adaptation en version quantitative, à l'aide d'une RT-PCR en temps réel. Cette approche permet non seulement la quantification du transcrit du gène U100, mais également celui du gène viral U90, exprimé à la phase précoce du cycle (N'guyen VH, manuscrit en préparation).

### *Sérologies*

Il s'agit d'un diagnostic indirect du virus puisqu'il permet de détecter dans le sérum de l'individu des anticorps IgM ou IgG anti-HHV-6 qui se sont formés contre des antigènes du virus. Cette détection peut se faire par immunofluorescence (Robert et al, 1990) ou par des techniques immuno-enzymatiques de type ELISA (Luppi et al, 1998). Ces méthodes ne font pas la distinction entre espèce A ou B. Cette sérologie est peu informative dans la mesure où la détection d'anticorps IgG est la règle (puisque l'infection à HHV-6 est ubiquitaire) et la détection d'anticorps IgM ne signe pas forcément une primo-infection (Adler et al, 1993). De plus, les perfusions d'immunoglobulines intraveineuses chez les patients greffés en particulier peuvent être la source de faux positifs. Enfin, il n'existe pas de kits actuellement commercialisés en France pour le diagnostic de routine.

**II-5 : Epidémiologie, Transmission, Diagnostic et Manifestations Cliniques** (revues par Dockrell, 2003 ;Clark & Griffiths, 2003 ; De Bolle et al, 2005, Agut, 2011).

*Epidémiologie*

L'infection à HHV-6 est ubiquitaire. Plus de 95% de la population adulte montre des anticorps anti-HHV6 (sans distinction entre espèce A ou B). HHV-6 est acquis en général dans les deux premières années de vie et l'incubation est d'environ 1 à 2 semaines. Certaines données font penser que l'on serait d'abord infecté par HHV-6B, responsable de la quasi-majorité des manifestations cliniques associées à HHV-6, puis par HHV-6A de manière asymptomatique. On peut également détecter plusieurs souches d'HHV-6 de l'espèce A ou B chez une même personne, ce qui traduit qu'une réinfection par HHV-6 est possible au sein d'un même individu.

*Transmission*

HHV-6 se transmet par contact étroit, en particulier par la salive secrétée par les glandes salivaires qui sont un site privilégié de persistance et d'excrétion du virus. Il est notable de constater que seule l'espèce HHV-6B est détectée dans la salive. Le virus peut aussi se transmettre après greffe de CSH ou transfusions. Une transmission intra-utérine semble possible également. La transmission par rapports sexuels est discutée. Nous ne revenons pas sur la transmission d'un HHV-6 intégré aux chromosomes des cellules (voir plus haut).

*Diagnostic*

La conférence européenne de prise en charge des infections chez les patients leucémiques a proposé en 2008 des définitions concernant les différents types d'infection à HHV-6 chez l'homme (Ljungman et al, 2008).

Les définitions sont les suivantes:

-La primo-infection correspond à la détection directe du virus ou d'anticorps anti-HHV6 chez un patient connu séronégatif auparavant.

-La réactivation à HHV-6 correspond à la détection du virus chez un patient connu séropositif auparavant.

-La maladie à HHV-6 correspond à la détection du virus par un test approprié, à la fois sensible et spécifique, sur une biopsie ou un prélèvement liquidien (lavage broncho-alvéolaire ou liquide céphalo-rachidien (LCR)) correspondant à l'organe malade responsable de la symptomatologie clinique.

Ces définitions restent générales et peuvent s'appliquer à n'importe quel virus. Elles posent un certain nombre de problèmes, en particulier chez l'immunodéprimé où peut se poser la question de débiter un traitement anti-HHV-6, dans la mesure où:

1) la pathogénicité du virus HHV-6, déduite des nombreuses études qui lui ont été consacrées, reste majoritairement faible voire non conséquente. En effet, à l'inverse du CMV et de l'EBV, l'expérience montre que la détection d'une infection active à HHV-6 chez l'immunodéprimé se traduit en général par l'absence de complications cliniques graves immédiates ou à distance, ce qui laisse supposer une faible pathogénicité du virus. Ce qui pose également le problème de la définition de la maladie à HHV-6 car là encore, la détection du virus HHV-6 dans tel ou tel organe est souvent non symptomatique (Clark & Griffiths, 2003).

2) il reste difficile de distinguer entre un état de latence du virus et une infection active lors des réactivations. L'infection active semble problématique à définir et pour plusieurs raisons : la sérologie n'est d'aucune aide (la quasi majorité des adultes ont rencontré le virus dans l'enfance et développé des anticorps), la culture cellulaire est longue et l'effet cytopathique qui signe l'infection active ne permet pas d'identifier le virus en particulier responsable de cette infection, la PCR permet de détecter l'ADN du virus mais ne permet pas de trancher



formellement entre une infection active ou un virus à l'état latent dans la cellule ; de même la RT-PCR permet de détecter de l'ARN viral mais là encore, si la détection de transcrits tardifs est plutôt en faveur d'une infection active, des transcrits viraux peuvent être détectés aussi à l'état de latence. Il en va de même pour les autres techniques de détection.

Comment distinguer donc entre latence et infection active? A l'exemple du CMV ou de l'EBV, la communauté internationale s'entend actuellement pour définir une infection active à HHV-6 par une certaine valeur de la virémie (ou charge virale) détectée dans le sang total. Cette charge virale sanguine correspond à une quantité d'ADN viral détectée par PCR en temps réel qui est donc la technique de référence de détection d'HHV-6. Si le seuil quantitatif permettant de distinguer entre virus à l'état latent et virus à l'état répliatif n'est pas formellement identifié, on estime majoritairement aujourd'hui que la détection de plus de 1000 copies (3 log) du génome d'HHV-6 par ml de sang total (équivalent à 1000 copies pour 1 million de cellules mononucléées en cas de numération normale) signe une infection active à HHV-6. La cinétique d'augmentation de la charge virale ADN peut être également un indicateur d'infection active, de même comme évoqué plus haut la détection de transcrits ARN tardifs. La multiplication virale est quasiment toujours le fait de l'espèce HHV-6B.

3) en cas de maladie supposée, d'autres causes associées sont souvent retrouvées ;

4) la présence d'un virus HHV-6 intégré aux chromosomes peut être source d'erreur. Celui-ci est en général évoqué devant des charges virales ADN très élevées >5 log/ml de sang total. La recherche spécifique d'une intégration (par exemple, en recherchant le génome viral dans les follicules pileux ou dans les ongles) n'est pas réalisée en routine.

### *Manifestations cliniques*

#### *1) lors de la Primo-infection*

La primo-infection est dans la plupart des cas asymptomatique (Zerr et al, 2005) mais peut représenter jusqu'à 20% des fièvres observées chez l'enfant de moins d'un an. La primo-

infection est aussi responsable de « l'exanthème subit » appelé encore roséole infantile ou sixième maladie, plus fréquente au Japon, et dont l'association avec HHV-6B a été décrite pour la première fois par Yamanashi *et al* en 1988. Cette maladie se traduit par 40°C de température pendant trois à sept jours environ puis apparaît un rash cutané qui touche principalement le tronc, le cou et la face. L'évolution est parfaitement bénigne.

D'autres symptômes peuvent être observés comme des malaises, des arthralgies, des douleurs auriculaires liées à l'inflammation du tympan, des troubles gastro-intestinaux, hépatiques ou respiratoires, une thrombopénie ou un syndrome d'hémophagocytose. Des manifestations cérébrales peuvent aussi se produire comme une crise convulsive, une méningoencéphalite, une encéphalopathie. La primo-infection chez l'adulte reste exceptionnellement documentée et se traduit par de la fièvre, un syndrome mononucléosique ou parfois une hépatite grave fulminante.

## 2) *lors des réactivations.*

Après la primo-infection, le virus reste dans l'organisme à l'état de latence et peut se réactiver à l'occasion d'un état d'immunosuppression ou lors d'une autre infection virale. Il peut exister également des ré-infections par d'autres souches virales à HHV-6 chez un même individu déjà infecté. Ces réactivations/ré-infections sont, comme lors de la primo-infection, pour la plupart asymptomatiques. Des manifestations cliniques associées à HHV-6 surviennent rarement chez l'immunocompétent et sont l'apanage des patients immunodéprimés (transplantés d'organes solides ou de CSH et patients HIV principalement). Elles sont quasiment toutes associées à HHV-6B. Les cas d'atteintes cérébrales (en particulier l'encéphalite limbique) et le retard à la prise de greffe de CSH associés à HHV-6 sont les mieux documentés. HHV-6 semble en effet avoir un tropisme important pour le système nerveux central. Ce neurotropisme est supérieur pour HHV-6A et des cas de complications neurologiques ont été décrits en association avec cette espèce (Hall *et al*, 1998). Néanmoins,

HHV-6 peut être détecté dans du tissu cérébral normal, ce qui pose bien évidemment la question de facteurs favorisants ou déclenchants la maladie à HHV-6 dans ce contexte ou la question du rôle indirect du virus à provoquer cette complication neurologique. L'encéphalite limbique à HHV-6, qui est définie par l'association de signes neurologiques (troubles de conscience, confusion, perte de mémoire, convulsions), la détection du virus dans le LCR, la présence d'anomalies à l'IRM cérébrale (en particulier lobe temporaux) ou à l'électroencéphalogramme, est en fait une des deux maladies à HHV-6 qui fait consensus.

La deuxième est la myélossuppression induite par le virus en post-allogreffe. HHV-6 est connu depuis longtemps pour entraîner une myélosuppression à la fois *in vitro* (Knox et al, 1992 ; Burd et al, 1993) mais aussi *in vivo* (Carrigan et al, 1994 ; Drobisky et al ; 1993). Mais là encore, le fait de détecter la présence du virus dans la moelle de sujets sains, et sans aucune conséquence, pose à nouveau le problème de la réelle pathogénicité du virus (Gautheret-Dejean et al, 2000). D'autres manifestations ont été décrites en post-allogreffe en association avec HHV-6 que nous développons dans la **Partie III** de ce **Rappel Bibliographique**.

Pour toutes les autres manifestations cliniques, on parle plutôt d'association que de maladie à HHV-6. La littérature retrouve ainsi une association d'HHV-6 avec le syndrome de fatigue chronique (Buchwald et al, 1990), la maladie de Kikuchi-Fujimoto (lymphadénite histiocytaire nécrosante) (Hoffmann et al, 1991), la maladie de Rosai Dorfman (histiocytose sinusienne (Levine et al, 1992), la sclérose en plaques (Challoner et al, 1995) et le syndrome d'hypersensibilité médicamenteuse (Tohyama et al, 1998). HHV-6 est retrouvé associé à certains cancers : lymphomes hodgkiniens et non hodgkiniens, leucémie aiguë lymphoblastique, carcinome de la cavité buccale ou de la sphère ORL (Yadav et al, 1997 ; Ogata et al, 2009). Enfin, HHV-6 est très souvent détecté également chez les patients porteurs du VIH et pourrait favoriser la progression de la maladie (Kositanont et al, 1999).

## **II-6 : Traitements de l'infection/maladie à HHV-6 (De Bolle et al, 2005 ; Agut, 2011).**

### *Faut-il traiter et quand?*

Il n'y a pas de consensus international à l'heure actuelle sur le fait de traiter ou non une infection à HHV-6. Ceci inclue les notions de traitements prophylactique, préemptif ou curatif. Cette indécision est liée principalement à la faible pathogénicité du virus et à la toxicité des traitements disponibles. Les essais de traitements prophylactiques (Tokimasa et al, 2002 ; Rapaport et al, 2002 ; Ogata et al, 2012) ou pré-emptifs (Ogata et al, 2008 ; Ishiyama et al, 2011) 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 et al, 2004) et la Conférence Européenne sur la prise en charge des infections survenant chez les patients leucémiques (Ljungman et al, 2008).

Pour le reste (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 finalement 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 lieu de détection du virus, l'absence d'autres pathogènes détectés pouvant expliquer la symptomatologie (en particulier le CMV), l'établissement antérieur d'une association entre le virus et la manifestation clinique observée et finalement une charge virale relativement élevée (>1000 copies/ml) en l'absence de documentation d'HHV-6 intégré au génome ainsi que la cinétique de cette charge virale au cours du temps.

### Traitements disponibles (**Figure 9**)

La première option thérapeutique consiste en l'administration d'immunoglobulines polyvalentes humaines associée à la baisse des immunosuppresseurs. Aucune molécule n'a d'AMM pour le traitement de l'infection ou de la maladie à HHV-6. Il n'existe pas non plus de vaccin contre cet herpesvirus. Néanmoins les antiviraux actifs contre le CMV ont montré également une activité anti-HHV-6A ou B *in vitro* et *in vivo* (Reymen et al, 1995 ; De Clercq et al ; 2001&2003 ; Yoshida et al, 2002 ; Zerr et al, 2002). Ils ont tous une activité dirigée contre l'ADN polymérase virale (codée par U38) pour laquelle ils ont une affinité plus importante que celle présente chez l'hôte. On distingue ainsi :

- 1) deux analogues nucléosidiques actifs dans leur forme triphosphate. La première phosphorylation est assurée par le virus lui-même grâce à une phosphotransférase codée par U69 (qui est un enzyme équivalent à la protéine codée par UL97 chez le CMV). Les autres phosphorylations sont assurées par l'hôte. Les deux représentants de cette classe sont l'acyclovir (zovirax®) et sa pro-drogue orale le valaciclovir (zelitrex®) et le ganciclovir (cymevan®) et sa pro-drogue orale le valganciclovir (rovalcyte®). La sensibilité d'HHV-6 à l'acyclovir ou au valaciclovir est très limitée et ces deux drogues sont inutilisables en pratique clinique pour traiter une infection à HHV-6. Le ganciclovir est finalement la seule drogue efficace de cette classe. La biodisponibilité du rovalcyte n'est que de 60% environ (Jung & Dorr, 1999).
- 2) un analogue nucléotidique, le cidofovir (Vistide®) dont la forme active est également la forme triphosphate. Néanmoins, du fait de la présence chez ce dernier d'un groupe phosphate, la molécule n'a besoin que de deux autres phosphorylations supplémentaires pour être active. Ces deux phosphorylations sont assurées par l'hôte et non le virus comme précédemment.

3) Finalement un analogue de pyrophosphate, l'acide phosphonoformique (PFA, Foscarnet®), qui n'a pas besoin d'être phosphorylé pour être actif.

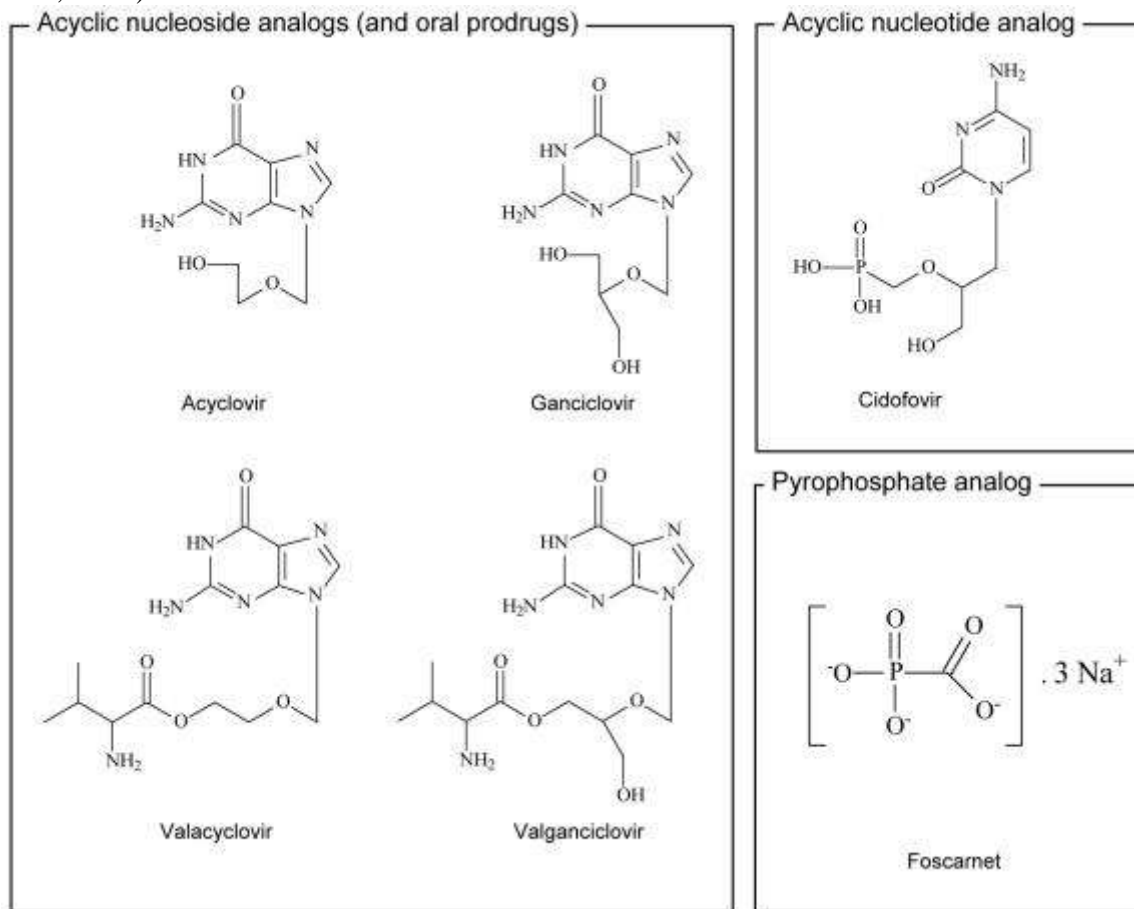
Le cidofovir et le PFA semblent être les drogues les plus efficaces contre HHV-6 (en tout cas in vitro (De Clercq et al, 2001), pas d'étude comparative en clinique à ce jour). Même si aucun cas de résistance clinique aux drogues n'a été décrit pour HHV-6 actuellement, on a décrit par contre des mutations au niveau du gène U69 (Safronetz et al, 2003). Un mécanisme général de résistance du virus aux drogues est représenté également par des mutations au niveau de l'ADN polymérase virale (Bonnafeous et al, 2008).

En pratique, l'administration du vistide® et du foscarnet® est limitée par leur toxicité rénale importante. Le ganciclovir est ainsi souvent choisi en première intention chez les patients, à l'exception des patients en aplasie post-greffe. En effet le principal effet secondaire du ganciclovir est la toxicité hématopoïétique avec cytopénies des trois lignées. Par ailleurs, le foscarnet ou le ganciclovir doivent être préférés en cas d'atteinte cérébrale, car le passage de la barrière neuro-méningée par le cidofovir reste discuté. Il n'y a pas par contre là encore de consensus sur les doses ou la durée du traitement. Celle-ci est guidée par la résolution des signes cliniques et la décroissance voire la négativation de la charge virale.

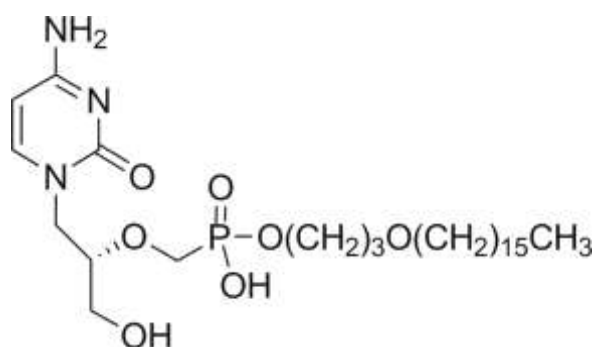
Pour terminer, un conjugué esther-lipidique du cidofovir, appelé CMX001, devrait prochainement être disponible. Il présente beaucoup d'avantages comme un large spectre contre les virus à ADN, une faible toxicité (en particulier rénale), une administration orale et un passage de la barrière neuro-méningée (Painter et al, 2012).

On l'aura compris, il reste beaucoup à faire pour déterminer le rôle pathogène véritable des virus HHV-6 et l'intérêt de différents traitements prophylactiques, pré-emptifs ou curatifs chez les sujets immunodéprimés présentant une infection/maladie à HHV-6.

**Figure 9:** Principales molécules actives contre HHV-6 (d'après De Bolle et al, 2005 et Painter et al, 2012).



Structure du CMX001.



### **III- HHV-6 et Allogreffe de CSH.**

L'état d'immunosuppression est le facteur favorisant la réactivation HHV-6, qui agit donc comme n'importe quel germe pathogène opportuniste. L'infection à HHV-6 est donc fréquemment documentée après greffe de CSH, greffe d'organes solides ou chez les patients VIH+. Néanmoins, la symptomatologie associée avec une infection HHV6 est quasi inexistante après greffe d'organe solide (Lautenschlager & Razonable, 2012) ou infections par le VIH (De Bolle et al, 2005). La quasi-majorité de la symptomatologie (y compris la plus grave, à savoir l'encéphalite limbique) et une plus grande incidence sont ainsi décrites après greffe de CSH. Il faut distinguer ici l'autogreffe et l'allogreffe. Si l'incidence de l'infection à HHV-6 semble comparable (Imbert-Marcille et al, 2000) ou supérieure (Yoshikawa et al, 2002) après allogreffe de CSH, les signes cliniques associés à HHV-6 concerne majoritairement les patients allogreffés. L'allogreffe de CSH constitue donc le contexte indiscutable dans lequel doivent se concentrer les efforts de recherche.

Il faut constater en premier lieu que de très nombreuses publications sont consacrées aux relations entre infections à HHV-6 et allogreffe de CSH (revues dans Betts et al, 2011). Une virémie HHV-6 est détectée dans environ 40 à 60% des cas après ce type de greffe. Ces variations reflètent les différentes méthodes de détection utilisées pour mettre en évidence le virus. Compte-tenu de la haute séroprévalence HHV-6 dans la population générale, on estime qu'il s'agit d'une réactivation chez le patient ou d'une réinfection transmise par le donneur. Des cas rares de transmission (virus intégré y compris) par des greffons placentaires sont décrits (Weinberg et al, 2005 ; De Pagter et al, 2010). On considère donc qu'après greffe de sang placentaire, l'infection à HHV-6 découle très majoritairement d'une réactivation chez le patient.

L'infection à HHV-6 survient précocement dans le premier mois suivant l'allogreffe, avant la survenue d'infections à CMV et EBV, (Maeda et al, 1999), et peut persister plusieurs



semaines voire plusieurs mois après la greffe. L'infection à HHV-6 post-allogreffe reste en général peu symptomatique mais un certain nombre de manifestations cliniques associées à HHV-6 (espèce B) sont rapportées : encéphalite limbique (qui entraîne jusqu'à 40% de mortalité) (Ljungman & Singh, 2006), myélosuppression avec pour conséquence le retard à la prise de greffe ou le rejet de greffe, fièvre, pneumopathies, hépatites, gastrites, microangiopathies thrombotiques, rash cutané, réaction du greffon contre l'hôte grave ou réactivation CMV. L'influence de l'infection à HHV-6 sur la mortalité post-allogreffe est discutée mais deux études récentes en pédiatrie ont montré un impact défavorable sur la survie de ces jeunes patients qui seraient donc les plus fragiles vis-à-vis de l'infection (De Pagter et al, 2008 ; Zerr et al, 2012b).

De nombreux facteurs de risque associés à la réactivation HHV-6 sont décrits après allogreffe mais restent incertains (revus dans Bretts et al, 2011) : le jeune âge, le statut avancé de la maladie hématologique, le mismatch sexuel ou HLA, la prise de corticoïdes, un donneur non familial, un taux diminué d'anticorps anti-HHV6 pre-greffe. L'utilisation d'un greffon placentaire représente également un facteur de risque particulier dans la mesure où il a été rapporté par plusieurs équipes (Sashihara et al, 2002 ; Tomonari et al, 2005 ; Yamane et al, 2007). Nous avons confirmé ces résultats dans nos travaux (voir **Partie Expérimentale I**). Cette association a depuis été confortée par plusieurs études (Mori et al, 2010 ; Bretts et al, 2011 ; Zerr et al, 2011 ; Ishiyama et al, 2011 ; Pichereau et al, 2012 ; Dulery et al, 2012) et confirmée par une méta-analyse très récente (incidence de la réactivation HHV-6 après greffe placentaire : globalement 72% vs 37.4% pour les autres types de greffe,  $p < 0.0001$ ) (Scheurer et al, 2012). Cette méta-analyse a mis en évidence également que la greffe de sang placentaire était associée à un risque accru d'encéphalite limbique due à HHV-6 (8.3% vs 0.5%,  $p < 0.0001$ ). On peut même évoquer le fait que la greffe de sang placentaire est le terrain particulier où peut se développer une encéphalite à HHV-6. Cette donnée primordiale doit

bien évidemment faire envisager un suivi précis de la réactivation HHV-6 après greffe de sang placentaire. Reste à comprendre pourquoi une telle réactivation survient dans ce contexte particulier. Cette question a fait l'objet des autres travaux présentés dans cette thèse (voir **Parties expérimentales II, III et IV**).

# **PARTIE** **EXPERIMENTALE**

## **Partie I: Infections à HHV-6, CMV et EBV après allogreffe de cellules souches hématopoiétiques (CSH) chez l'adulte: comparaison entre greffe de cellules souches périphériques (CSP) non aparentées et greffe de sang placentaire.**

*Résumé : Nous avons comparé ici rétrospectivement l'incidence des infections à CMV, EBV et HHV-6 après allogreffe de sang placentaire (SP, n=15 patients) et allogreffe de cellules souches périphériques réalisée à partir d'un donneur non apparenté (CSP, n=40 patients). La charge virale (ADN) pour chaque virus a été étudiée par PCR en temps réel avant greffe puis chaque mois jusqu'à 9 mois post-greffe chez chaque patient (n=459 prélèvements). Nous avons également étudié la reconstitution immunitaire à 3, 6 et 9 mois post-greffe. Nous montrons que l'incidence des infections à HHV-6 est significativement supérieure dans le groupe SP (80% vs 42%,  $p < 0.0001$ ) avec une charge virale également supérieure dans ce groupe ( $p < 0.0001$ ). En analyse multivariée, l'utilisation d'un conditionnement myéloablatif et d'un greffon placentaire sont les deux facteurs indépendants associés avec une incidence accrue d'infection à HHV-6 post-greffe ( $p = 0.04$  et  $p = 0.02$ , respectivement). L'incidence des infections à CMV a été retrouvée comparable entre les deux groupes alors que l'incidence des infections à EBV est plus importante dans le groupe CSP en analyse univariée uniquement. L'infection à HHV-6 se traduit par un retard à la récupération en neutrophiles et en plaquettes dans les deux groupes. Les patients dans le groupe SP ont un taux de cellules NK significativement supérieur à 3 mois post-greffe. Cette étude montre la forte corrélation entre allogreffe de sang placentaire et réactivation HHV-6 post-greffe chez l'adulte.*

### **INTRODUCTION :**

Depuis quelques années, la fréquence des allogreffes réalisées à partir du sang placentaire chez les patients adultes avec hémopathies malignes ne cesse d'augmenter. Ceci concerne aussi bien les greffes à conditionnements standards dites myeloablatives (Laughlin et al, 2004 ; Rocha et al, 2004 ; Parody et al, 2006 ; Takahashi et al, 2007) que les greffes à conditionnement atténué (Brunstein et al, 2007). Un des problèmes majeurs de la greffe de sang placentaire, à côté du faible nombre de cellules contenues dans le greffon, est représenté par une incidence accrue d'infections opportunistes, résultat d'une reconstitution hématopoiétique et immunitaire plus tardive qu'avec les autres types de greffon (Laughlin et al, 2004 ; Rocha et al, 2004 ; Parody et al, 2006 ; Takahashi et al, 2007 ; Hamza et al, 2004).

Ainsi, les infections bactériennes sont en général plus sévères et responsables d'une mortalité importante précoce (Parody et al, 2006 ; Saavedra et al, 2002 ; Narimatsu et al, 2005). Concernant les infections virales, les données de la littérature sont peu nombreuses. Certains auteurs décrivent une incidence comparable d'infection à CMV après greffe de sang placentaire ou greffe de CSP ou de moelle (Parody et al, 2006 ; Hamza et al, 2004). Il semble en être de même avec l'EBV (Barker et al, 2001). D'autres études, menées sur un faible nombre de patients ont par contre fait état d'une incidence accrue d'infections HHV-6 après greffe de sang placentaire, aussi bien chez les enfants (Sashihara et al, 2002) que chez les adultes (Tomonari et al, 2005 ; Yamane et al, 2007).

Nous avons voulu, dans cette première partie, comparer rétrospectivement l'incidence des infections à CMV, EBV et HHV-6 chez des sujets ayant (tous) reçu un greffon non apparenté, correspondant soit à un sang placentaire, soit à des CSP provenant d'un donneur non familial.

## **PATIENS et METHODES :**

### Patients

Cinquante-cinq patients adultes du service d'Hématologie du CHU de Nantes ayant reçu une allogreffe non apparentée entre Janvier 2006 et Novembre 2007 ont été inclus dans cette étude, après obtention de leur consentement signé. Nous avons étudié et comparé rétrospectivement chez ces patients l'incidence des trois *Herpesviridae* CMV, EBV et HHV-6 et la reconstitution immunitaire post-greffe. Deux groupes ont été distingués: celui des patients recevant une greffe de CSP non apparenté (n=40) et celui des sujets recevant une greffe de sang placentaire (n=15). Cette étude a été approuvée par le comité d'évaluation des études cliniques et biologiques du CHU de Nantes. Les caractéristiques des patients sont décrites dans le **Tableau 3**. A l'exception des types de greffon, de l'utilisation de thymoglobuline plus fréquente avant greffe de sang placentaire et du nombre de cellules

infusées plus faible avec ce même type de greffe, on ne retrouvait pas de différences significatives entre les deux groupes. Une prophylaxie des infections à herpes-simplex virus par valaciclovir (6 grammes par jour) était systématiquement prescrite à chaque patient pour une période d'au moins trois mois. Le ganciclovir ou le foscavir étaient utilisés pré-emptivement en cas de détection de 2 PCR CMV positives successives et  $>3$  log/mL ou chez les patients présentant d'emblée une maladie à CMV. Le rituximab (anticorps thérapeutique anti-CD20) était utilisé à la dose de  $375 \text{ mg/m}^2$ /semaine pré-emptivement, en cas de détection de 2 PCR EBV positives successives  $>3$  log/mL, chez les patients présentant une lymphoprolifération EBV post-greffe, ou chez certains patients présentant une GVH chronique extensive corticorésistante.

#### Méthodes de détection virale et suivi post-greffe

Les charges virales CMV, EBV et HHV-6 ont été déterminées dans le sang des patients avant greffe, puis si possible une fois par mois jusqu'à 9 mois post-greffe. Pour cette étude, 459 prélèvements de sang total prélevé sur EDTA (groupe CSP n=335 et groupe cordons n= 124) ont été évalués, avec une médiane de 10 prélèvements (écart: 3-11) analysés par patient. Chez les patients présentant une infection virale (voir plus loin définitions), des prélèvements supplémentaires étaient analysés afin d'initier un éventuel traitement pré-emptif ou curatif. La recherche d'ADN viral de type HHV-6 a également été réalisée dans tous les greffons placentaires avant greffe.

**Tableau 3** : Caractéristiques des patients.

	Groupe Cordons N=15	Groupe CSP non apparenté N=40	P
Genre : Femme	9 (60%)	17 (42.5%)	NS
Homme	6 (40%)	23 (57.5%)	
Age Médian (écart) à la greffe	49 ans (26-62)	52 ans (20-62)	NS
Maladies :			NS
MDS/LAM	7 (46%)	13 (32.5%)	
LAL	4 (26%)	3 (7.5%)	
Lymphome Non Hodgkinien	3 (20%)	13 (32.5%)	
Maladie de Hodgkin	0	4	
Myélome Multiple	0	2	
LLC	1	2	
Myélofibrose Primitive	0	3	
Statut à la greffe :			NS
Rémission Complète 1,	7 (46%)	14 (35%)	
Rémission Complète 2 ou 3	2 (14%)	8 (20%)	
Maladie active	6 (40%)	18 (45%)	
Statut CMV à la greffe :			NS
CMV négatif (patient et donneur)	10	16	
CMV positif (patient ou donneur)	5	24	
Type de Conditionnement :			NS
Myéloablatif	7 (46%)	14 (35%)	
Non Myéloablatif (atténué)	8 (54%)	26 (65%)	
Prophylaxie de la GVHD :			NS
CsA + Méthotrexate	7 (46%)	11 (27.5%)	
CsA + MMF	8 (54%)	27 (67.5%)	
CsA seule	0	2 (5%)	
Sérum anti-lymphocytaire administré: oui	1 (6%)	25 (62.5%)	0.0002
Nombre de cellules injectées :			<0.0001
Cellules nucléées totales : moyenne (médiane), 10 <sup>8</sup> /Kg du receveur	0.36 ± 0.06 (0.39)	12.47 ± 13.44 (9.35)	
Cellules CD34+: moyenne (médiane), 10 <sup>6</sup> /Kg du receveur	0.15 ± 0.11 (0.13)	8.22 ± 6.40 (7.22)	

Abréviations: CSP: cellules souches périphériques; MDS: Myélodysplasie; LAM: leucémie aiguë myéloblastique; LAL: leucémie aiguë lymphoblastique; LLC: leucémie lymphoïde chronique; GVHD: graft-versus-host disease ou réaction du greffon contre l'hôte; CsA: cyclosporine A; MMF: mycophénolate mofétyl; NS: non significatif.

Brièvement, la totalité des acides nucléiques sont extraits du sang total (200µl environ) des patients ou du greffon placentaire avant greffe avec une trousse d'extraction de l'ADN de type MagNAPure LC (Roche Molecular Biochemichals, Mannheim, Germany) et selon les recommandations du fournisseur. L'ADN est ensuite stocké dans un volume final de 100µL à -20°C en attendant l'analyse de quantification par PCR.

Les trois techniques de PCR en temps réel ont été développées au laboratoire de Virologie du CHU de Nantes (Gautheret-Dejean et al, 2002 ; Bressollette-Bodin et al, 2009). Les gènes étudiés sont US6 pour le CMV, BNRF1 pour l'EBV et U65-U66 pour HHV-6. A partir de 5µL d'extrait d'ADN, on fait en sorte d'amplifier les gènes ci-dessus par PCR et on quantifie le nombre de copies du gène viral par ml de sang. La limite de détection pour les trois types de PCR virales est comprise entre 5 à 10 copies d'ADN viral par réaction. Les prélèvements avec une charge virale >2 log/mL de sang (ou >100 copies/ml de sang) ont été considérés comme positifs. La PCR HHV-6 permet également de différencier les espèces A et B. Une PCR qualitative nichée, avec un seuil de détection inférieur à 5 copies par réaction a été également appliquée pour la détection de HHV-6 (gène amplifié U100) dans les greffons placentaires, selon la méthode décrite également dans le laboratoire de Virologie du CHU de Nantes (Andre-Garnier et al, 2003).

### Définitions

Une infection a été définie soit par une charge virale >1000 copies (3 log)/ml de sang total de l'ADN viral considéré, soit par 2 PCR positives successives entre 100 et 1000 copies (2 à 3 log)/ml de sang total de l'ADN viral considéré. Une maladie à CMV, EBV ou HHV-6 a été définie par des symptômes suggestifs associés à la détection de l'herpesvirus considéré (isolement viral, histologie, immunohistochimie) dans l'organe associé aux symptômes cliniques. La présence d'un virus HHV-6 intégré au sein du génome d'un patient ou du



donneur était suspectée lorsque la charge virale d'ADN HHV-6 était retrouvée  $>6$  log/ml de sang avant la greffe (origine: le patient lui-même) ou précocement après la greffe (origine: le donneur) (Hubacek et al, 2007 ; Kamble et al, 2007).

Les récupérations en neutrophiles et en plaquettes étaient définies par un taux  $>500/\text{mm}^3$  trois jours consécutifs dans le premier cas, et par un taux  $>20000/\text{mm}^3$  sans support transfusionnel dans le second cas. Les GVH aiguë et chronique étaient quotées selon les critères standards de l'équipe de Seattle (Glucksberg et al, 1974 ; Shulman et al, 1980).

### Reconstitution Immunitaire

Les taux sanguins (par  $\text{mm}^3$ ) de lymphocytes T (CD3+, CD4+ et CD8+), B (CD19+) et NK (CD3-/CD56+) ont été analysés à 3, 6 et 9 mois post-greffe dans le service d'Immunologie du CHU de Nantes par cytométrie de flux selon la technique standard. La quantification du taux de gammaglobulines a également été réalisée à partir du sérum des patients en Biochimie par une technique standard d'électrophorèse (en g/L).

### Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées par Mme Lucie Planche, statisticienne au CHU de Nantes. Les analyses comparatives univariées ont été réalisées grâce aux tests du Chi-2 ou le test exact de Fisher pour comparaison des proportions, ou grâce au test de Wilcoxon pour comparaison des données quantitatives. Les analyses comparatives multivariées ont été conduites par analyse de régression logistique, afin de soustraire les facteurs ayant des valeurs de  $p > 0.05$ . Les analyses ont été réalisées avec le logiciel SAS 9.1 (SAS Institute Inc., SAS Campus Drive, Cary, NC, USA). Une valeur de  $p < 0.05$  a été considérée comme statistiquement significative.

## **RESULTATS :**

### *Evènements cliniques et comparaison des 2 groupes en fonction du type de greffon*

Le devenir des patients est résumé dans le **Tableau 4** ci-dessous.

Le taux de prise de greffe est moindre après greffe de sang placentaire. De même, on constate un retard à la récupération en neutrophiles et en plaquettes avec ce type de greffe.

L'incidence de GVH aiguë ou chronique est comparable ainsi que l'incidence des rechutes.

On constate cependant une mortalité accrue après greffe de sang placentaire, liée à des complications consécutives à la greffe (TRM) plus fréquentes.

**Tableau 4:** Comparaison des principaux évènements post-greffes entre les deux groupes considérés dans l'étude (greffe de CSP non apparentée vs greffe de sang placentaire).\*

	Groupe Cordons N=15	Groupe CSP non apparenté N=40	P
Taux de Prise de Greffe	10 (66%)	39 (97.5%)	0.001
Nombre de jours pour récupération des neutrophiles : médiane (moyenne)	31 ± 16 (31)	17 ± 6 (16)	0.0044
Nombre de jours pour récupération des plaquettes: médiane (moyenne)	86 ± 50 (72)	24 ± 45 (13)	0.0014
GVHD aiguë grade II-IV: oui	5 (33%)	18 (45%)	NS
GVHD chronique: oui	4 (26.5%)	14 (35%)	NS
Rechutes	3 (20%)	6 (15%)	NS
Décès	8 (54%)	10 (25%)	0.049
Causes de décès			
Rechute	2	2	
Atteinte multiviscérale	2		
Infection	2 <sup>a</sup>	1 <sup>b</sup>	
GVHD chronique	1	2	
Lymphome associé à l'EBV	1		
Maladie Veino-occlusive		1	
Syndrome de détresse respiratoire aiguë		1	
Autres		3	

Abréviations: CSP: cellules souches périphériques; GVHD: graft-versus-host disease ou maladie du greffon contre l'hôte; <sup>a</sup> 1 infection à toxoplasma gondii, 1 infection à adénovirus; <sup>b</sup>: maladie à cytomégalovirus.

\* Les survies n'ont pas été analysées ici car le suivi des patients n'est que de 9 mois post-allogreffe.

### Détection de l'ADN viral du CMV, de l'EBV et de HHV-6

En considérant l'ensemble de la cohorte (n=55), les PCR CMV, EBV et HHV-6 ont été retrouvées au moins une fois positive chez 29 (53%), 29 (53%) et 22 (40%) patients, respectivement. Considérant les trois herpesvirus, 19 (34.5%), 16 (29%) et 9 (16%) patients, respectivement, présentèrent soit une infection d'un seul type viral, soit de deux types ou soit des trois types considérés. Aucun lien de cause à effet n'a été retrouvé entre les trois types d'infections virales. Considérant la totalité des prélèvements collectés pour l'étude (n=459), les pourcentages de prélèvements positifs pour le CMV, l'EBV et HHV-6 étaient respectivement de 14.1%, 16.3% et 26.8%. Seule l'espèce B a été mise en évidence lors de la détection d'un prélèvement positif à HHV-6. La majorité de ces prélèvements positifs à HHV-6 (n=102/123, 83%) étaient associés à une charge virale >1000 copies/ml de sang. A l'inverse, la majorité des prélèvements positifs pour le CMV (n=39/65, 60%) ou l'EBV (n=55/75, 73%) montraient une charge virale <1000 copies/ml de sang.

### Distribution des herpesvirus

*Infections à HHV-6* : Tous les sangs placentaires ont été retrouvés HHV-6 négatifs par PCR nichée avant greffe. Les infections à HHV-6 étaient significativement plus fréquentes après greffe de sang placentaire (n=12/15, 80% des patients vs 42% (n=17/40) après greffe de CSP, OR=4.41 ; 95% CI : 1.32-22.21, p=0.01). Le pourcentage de prélèvements positifs pour HHV-6 et la charge virale HHV6 étaient retrouvés également significativement supérieurs après greffe de sang placentaire : 59% (n=73/124) vs 15% (n=50/335), OR : 8.16, 95% CI : 5.11-13.05), p<0.0001 ; et médiane : 4.25 log/ml de sang vs 3.48 log/ml, p<0.0001, respectivement. En analyse univariée, les facteurs associés avec une incidence accrue d'infection à HHV-6 étaient les suivants : un sang placentaire, un conditionnement myéloablatif (OR=3.57 ; 95% CI : 1.11-11.48, p=0.02) ; le fait de recevoir du méthotrexate en

post-greffe (OR=5.13 ; 95%CI : 1.41-18.66, p=0.009) et un conditionnement comportant une irradiation corporelle totale (OR=4.47 ; CI95% : 1.23-16.28, p=0.01). Par contre l'utilisation de mycophenolate mofétyl (MMF) (OR=0.31 ; 95%CI : 0.1-1.03, p=0.05) ou d'ATG (OR=0.2 ; 95%CI : 0.05-0.72, p=0.004) étaient retrouvées associées à un moindre risque de développer une infection à HHV-6 en post-greffe. L'analyse multivariée a montré que seuls deux facteurs indépendants étaient associés à un risque accru de développer une infection à HHV-6 en post-greffe : une greffe de sang placentaire (OR=5.45 ; 95%CI : 1.24-22.99, p=0.02) et le fait de recevoir un conditionnement myéloablatif (OR=3.52 ; 95%CI : 1.03-12.05, p=0.04).

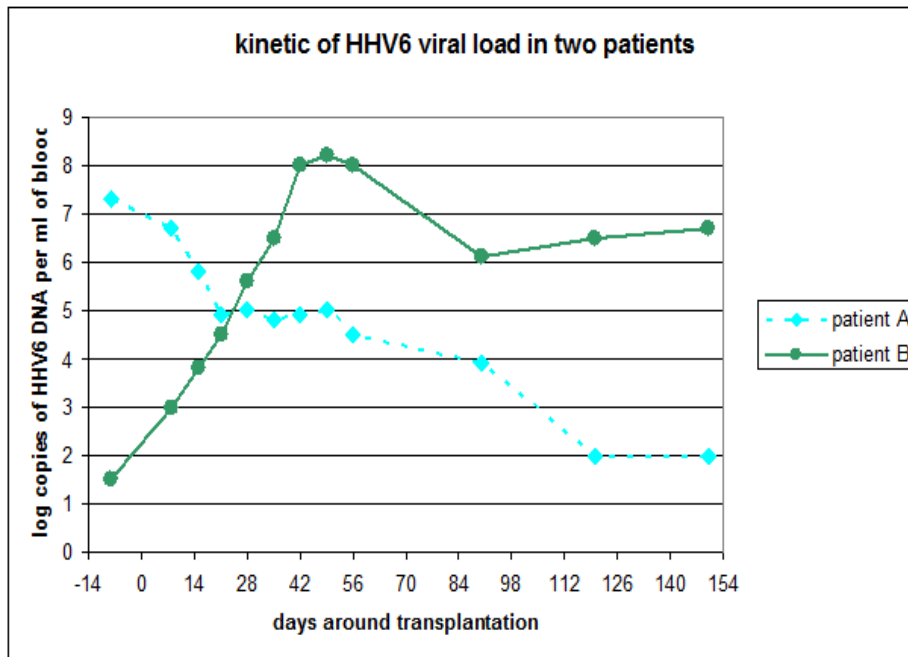
*Infections à CMV* : En considérant les patients à risque (donneur et/ou receveur CMV+, n=29), aucun facteur n'a été retrouvé associé à la survenue d'une infection à CMV en post-greffe, y compris le type de greffon (groupe cordon : incidence 60% vs groupe CSP : incidence 79%, p>0.05).

*Infections à EBV* : En analyse univariée, le seul facteur associé avec un risque accru d'infection à EBV en post-greffe était l'utilisation d'ATG dans le conditionnement (67% vs 33%, OR=3.09 ; 95%CI : 0.99-10.91, p=0.04). L'utilisation d'un sang placentaire était associée quant-à-elle avec un risque diminué de développer cette infection après greffe (27% vs 62%, OR=0.22 ; 95%CI : 0.06-0.81, p=0.01). Aucun de ces deux facteurs n'a été ensuite retrouvé comme influençant le risque d'infections à EBV en post-greffe en analyse multivariée.

#### *Cinétique des infections à herpesvirus*

Deux patients ont été diagnostiqués avec un probable virus HHV-6 intégré au génome (charge virale >6 log/ml de sang) comme le montre la **Figure 10** ci-dessous. Ces deux patients ont donc été exclus de l'analyse de l'étude.

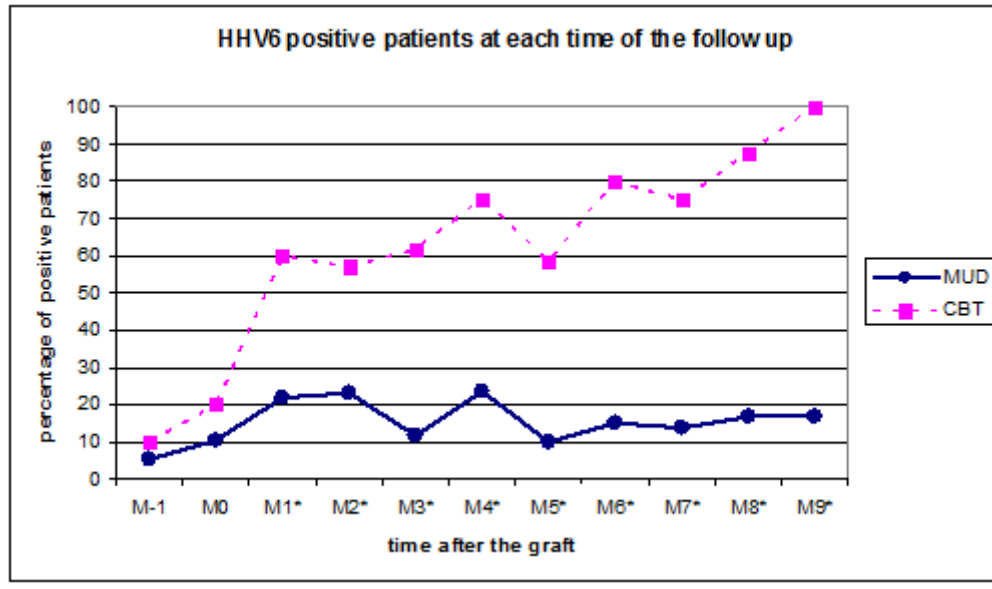
**Figure 10:** Cinétique de la charge virale HHV-6 post-greffe chez les deux patients inclus dans l'étude et présentant un probable virus HHV-6 intégré au génome avant la greffe (patient A) et après la greffe (patient B).



Le patient A (groupe cordons) perd progressivement son propre HHV-6 intégré après la prise de greffe avec les cellules du donneur non intégrées, tandis que le patient B (groupe CSP) acquiert un virus HHV-6 intégré dont l'origine est directement le donneur, avec une charge virale dépassant les 6 log/ml de sang se maintenant à des taux élevés tout au long du suivi sans aucune conséquence clinique.

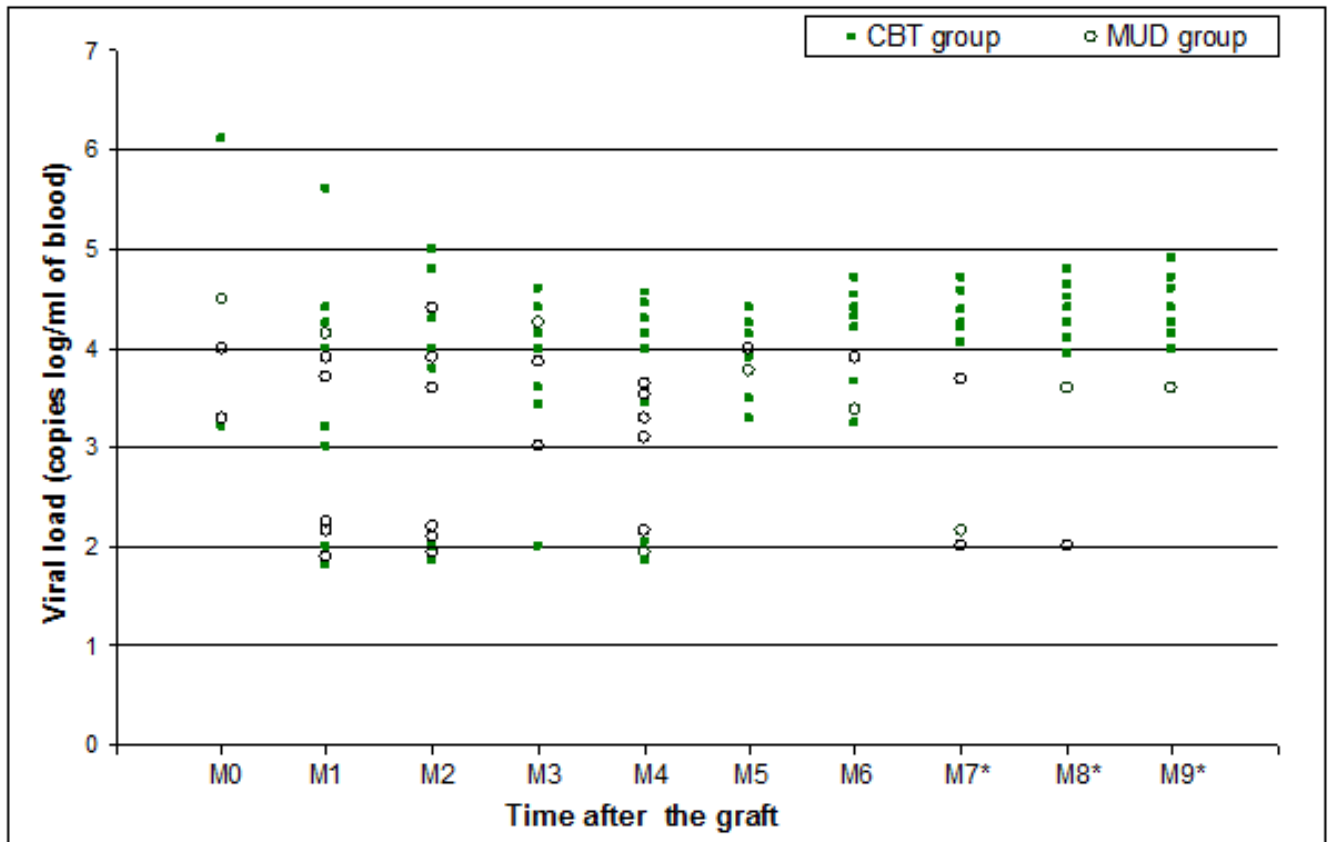
**Infections à HHV-6 (Figure 11):** La médiane de survenue des infections à HHV-6 après greffe de sang placentaire était de 36 jours (écart : 16-74) et de 58 jours (écart : 24-100) après greffe de CSP ( $p > 0.05$ ). Dans le groupe cordons, le nombre de patients qui sont devenus positifs n'a cessé d'augmenter tout au long du suivi pour atteindre 100% des patients considérés à 9 mois post-greffe. De plus, tous les patients développant une infection à HHV-6 en post-greffe dans ce groupe sont restés positifs durant tout leur suivi alors que 59% des patients positifs dans le groupe CSP sont redevenus négatifs ( $p < 0.009$ ).

**Figure 11:** Pourcentages de patients présentant une infection à HHV-6 en post-greffe dans le groupe cordons (CBT, effectif de 15 patients au mois 0, à 7 patients au mois +9) vs le groupe CSP (MUD, effectif de 39 patients au mois 0, à 18 patients au mois +9). La différence est significative (\*) à partir du 2eme mois jusqu'à la fin du suivi à 9 mois post-greffe, avec plus de patients infectés par HHV-6 dans le groupe cordons.



L'étude de la charge virale HHV-6 a montré qu'elle ne cesse en fait d'augmenter dans le groupe cordons tout au long du suivi, en étant significativement plus importante à 7, 8 et 9 mois post-greffe (Voir **Figure 12** ci-dessous).

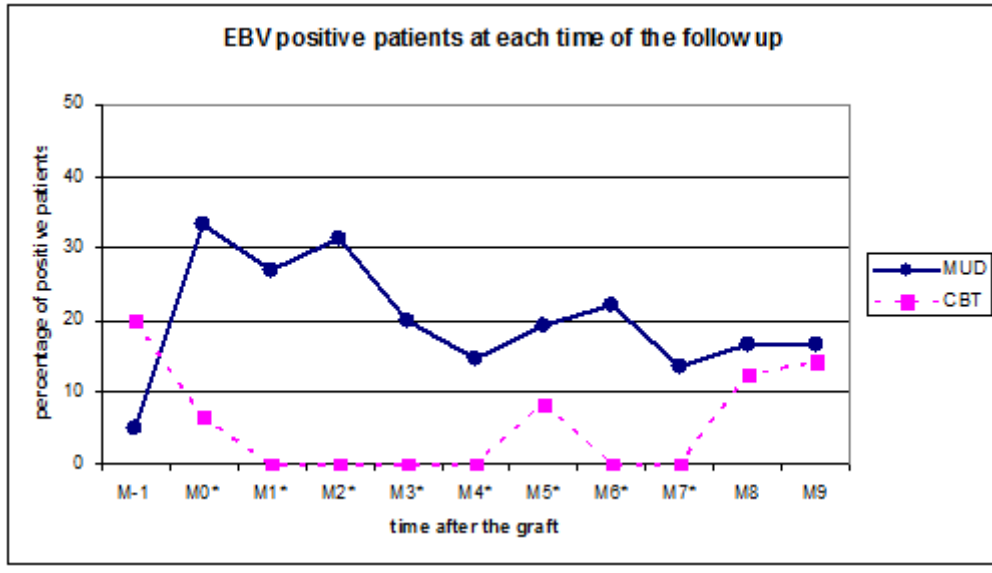
**Figure 12:** Comparaison de la charge virale HHV-6 à chaque point du suivi mensuel entre le groupe cordons (CBT) et le groupe CSP (MUD).



\*Différences significatives pour la comparaison des médianes entre le groupe cordons et le groupe CSP à 7, 8 et 9 mois post-greffe.

*Infections à EBV (Figure 13):* La médiane de survenue des infections à EBV après greffe était de 25 jours (écart: 12-180) à la fois dans le groupe cordons et dans le groupe CSP. Quatre patients qui étaient retrouvés positifs pour l'EBV avant la greffe sont devenus négatifs après celle-ci. Quatre patients sont restés positifs jusqu'à la fin de leur suivi, 1 dans le groupe CSP et 3 dans le groupe cordons. La charge virale médiane en EBV n'a pas été retrouvée significativement différente entre les deux groupes aux différents temps post-greffe étudiés.

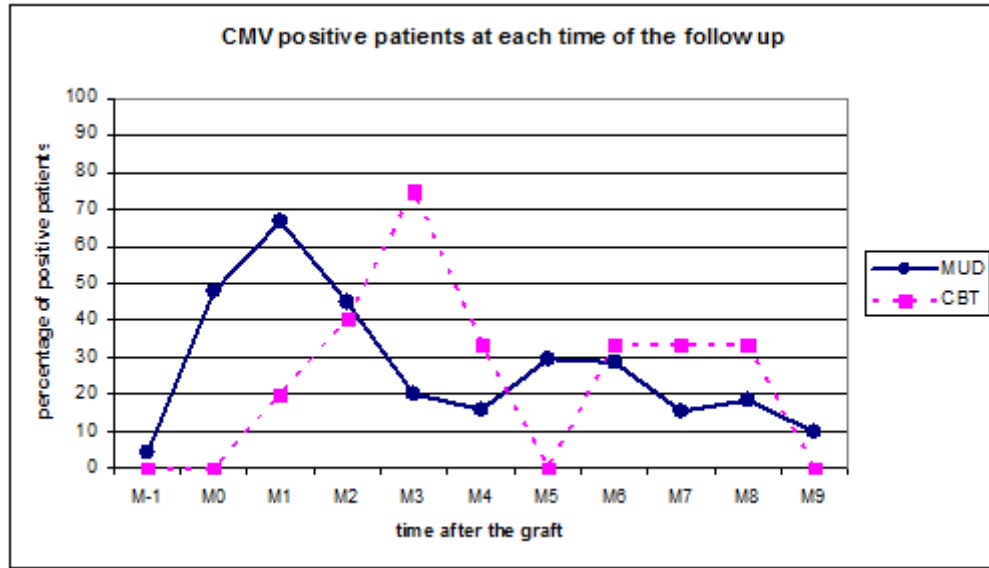
**Figure 13:** Pourcentages de patients présentant une infection à EBV en post-greffe dans le groupe cordons (CBT, effectif de 15 patients au mois 0, à 7 patients au mois+9) vs le groupe CSP (MUD, effectif de 39 patients au mois 0, à 18 patients au mois +9). La différence est significative (\*) entre les deux groupes à partir de la greffe et jusqu'au 7eme mois post-greffe avec plus de patients infectés par l'EBV dans le groupe CSP.



*Infections à CMV (Figure 14):* La médiane de survenue des infections à CMV après greffe était de 36 jours (écart: 14-78) à la fois dans le groupe cordons et dans le groupe CSP. Un seul patient était retrouvé positif avant la greffe. De même, seulement un patient dans le groupe CSP a été retrouvé encore positif à la fin de son suivi par PCR. La charge virale médiane en CMV n'a pas été retrouvée significativement différente entre les deux groupes aux différents temps post-greffe considérés.



**Figure 14:** Pourcentages de patients à risque présentant une infection à CMV post-greffe dans le groupe cordons (CBT, effectif de 5 patients au mois 0, à 3 patients au mois +9) vs le groupe CSP (MUD, de 24 patients au mois 0, à 10 patients au mois +9). Il n'y a pas de différence significative tout au long du suivi entre les deux groupes.



Conséquences cliniques des infections à herpesvirus post-greffe:

Considérant l'ensemble de la cohorte (n=55), les récupérations en neutrophiles et en plaquettes après la greffe étaient significativement retardées chez les patients réactivant HHV-6 pendant la période d'aplasie post-greffe (médiane : 37.5 jours vs 16.5 jours, p=0.03 et 98.5 jours vs 12.5 jours, p=0.0001, respectivement). Pour les patients avec prise de greffe dans le groupe cordons (n=10), les récupérations en neutrophiles et en plaquettes étaient aussi retardées chez les patients réactivant précocement HHV-6 (médiane : 40 jours (n=4) vs 24 jours (n=6), p=0.05 ; et 115 jours vs 44 jours, p=0.09). Pour les patients avec prise de greffe dans le groupe CSP (n=39), l'infection à HHV-6 (n=17) est survenue dans tous les cas après la récupération en neutrophiles, sauf chez 2 patients. Cependant, la récupération plaquettaire chez les patients développant une infection HHV-6 précoce dans ce même groupe était également retardée significativement (médiane 87 jours (n=4) vs 13 jours (n=13), p=0.003).

Aucune manifestation clinique significative associée à HHV-6 n'a été observée dans cette étude, à l'exception d'un patient du groupe CSP chez qui une encéphalite à HHV-6 a été suspectée. L'infection à HHV-6 n'a pas été retrouvée associée à un risque accru de non prise, de GVH aiguë ou de décès après greffe.

Le rituximab a été administré chez 10 patients pendant la période de suivi, essentiellement dans le groupe CSP (n=9 ; indications : infection à EBV n=7 ; GVH chronique n=2 ; groupe cordon n=1, indication : lymphome EBV induit).

Un traitement pré-emptif anti-CMV a été administré chez 7 patients (CSP n=6 ; cordons n=1).

Un seul patient a développé une maladie à CMV (colite + pneumopathie) due à une souche très résistante.

#### Reconstitution Immunitaire:

La comparaison de la reconstitution immunitaire entre les deux groupes est rapportée dans le **Tableau 5** ci-dessous. Nous avons retrouvé un taux de lymphocytes T CD8+ plus important à +3 et +6 mois dans le groupe CSP et des taux plus importants de cellules NK à +3 mois, de lymphocytes B à +3 +6 et +9 mois et de gammaglobulines à +9 mois dans le groupe cordons.

Le nombre d'infections à herpesvirus (1 seul type, 2 types ou 3 types différents) n'a pas été retrouvé comme facteur influençant la reconstitution immunitaire post-greffe, à l'exception de la reconstitution T CD8+ qui a été retrouvée significativement plus importante à +3 mois parmi les patients ayant présenté au moins une infection à un des herpesvirus considérés (médiane :  $250 \cdot 10^9/L$  vs  $86 \cdot 10^9/L$ ,  $p=0.03$ ). En analyse univariée, considérant la cohorte dans son ensemble (n=55), nous avons retrouvé : 1) que l'infection à EBV était associée significativement avec un taux de cellules NK plus bas à +3 mois (médiane :  $117 \cdot 10^9/L$  vs  $212 \cdot 10^9/L$ ,  $p=0.04$ ) et un taux de lymphocytes T CD4+ plus bas à +9 mois (médiane :  $118 \cdot 10^9/L$  vs  $274 \cdot 10^9/L$ ,  $p=0.04$ ) ; 2) que l'infection à HHV-6 était associée avec un taux plus important de

NK à +3 mois (médiane : 324 10<sup>9</sup>/L vs 175.5 10<sup>9</sup>/L, p=0.01) et un taux plus bas de lymphocytes T CD8+ à +6 mois (médiane : 147.5 10<sup>9</sup>/L vs 477 10<sup>9</sup>/L, p=0.02). L'analyse multivariée quant-à-elle a montré que seules les greffes de cordons étaient associées de manière indépendante avec un taux de cellules NK plus important à +3 mois (OR : 10.29; 95%CI : 1.06-99.78, p=0.04).

**Tableau 5:** Comparaison de la cinétique de reconstitution immunitaire post-greffe.

	<b>Groupe Cordons N patients</b>	<b>Groupe Donneur non apparenté N patients</b>	<b>P</b>
<b>Nombre total de lymphocytes: 10<sup>9</sup>/L</b>			
Mois +3	1598 ± 1394 [1265], N=12	900 ± 723 [790] N=34	NS
Mois +6	1910 ± 1847 [1243], N=10	1390 ± 1152 [1035], N=32	NS
Mois +9	1959 ± 1032 [1710], N=7	1515 ± 1364 [1115], N=25	NS
<b>Nombre de lymphocytes CD4+: 10<sup>9</sup>/L</b>			
Mois +3	198 ± 171 [183], N=10	169 ± 165 [100], N=32	NS
Mois +6	705 ± 1340 [255], N=9	249 ± 191 [175], N=21	NS
Mois +9	258 ± 62 [289], N=5	283 ± 169 [220], N=16	NS
<b>Nombre de lymphocytes CD8+: 10<sup>9</sup>/L</b>			
Mois +3	295 ± 481 [86], N=10	461 ± 587 [252], N=32	0.05
Mois +6	221 ± 294 [72], N=9	960 ± 1122 [472], N=21	0.01
Mois +9	276 ± 305 [194], N=5	899 ± 1277 [497], N=16	NS
<b>Nombre de lymphocytes NK: 10<sup>9</sup>/L</b>			
Mois +3	602 ± 455 [422], N=10	196 ± 138 [165], N=32	0.0006
Mois +6	474 ± 532 [313], N=9	256 ± 168 [203], N=21	NS
Mois +9	393 ± 250 [344], N=4	248 ± 181 [186], N=16	NS
<b>Nombre de lymphocytes B: 10<sup>9</sup>/L</b>			
Mois +3	421 ± 544 [90], N=10	54 ± 137 [4], N=32	0.03
Mois +6	566 ± 588 [373], N=9	158 ± 469 [7], N=21	0.003
Mois +9	1108 ± 450 [1171], N=4	150 ± 220 [22], N=16	0.01
<b>Taux de gamma-globuline : g/L</b>			
Mois +3	8.4 ± 3.2 [7.9], N=12	7.3 ± 3.6 [6.4], N=33	NS
Mois +6	8.9 ± 4.3 [8], N=11	8.3 ± 3.8 [8.2], N=30	NS
Mois +9	10.7 ± 4.6 [11], N=7	7 ± 2.6 [6.3], N=23	0.04

Abréviations: NS: non significatif.

## **DISCUSSION et PERSPECTIVES:**

Le but de cette étude a donc été de comparer simultanément l'incidence des infections à herpesvirus de type CMV, EBV et HHV-6 d'une part, et la reconstitution immunitaire d'autre part, après greffe de sang de sang placentaire et greffe de CSP non apparentée. Notre étude se distingue des études précédentes d'abord par son monitoring des patients relativement long jusqu'à 9 mois post-greffe. De plus, jusqu'à ce jour, le suivi concomitant des trois infections à herpesvirus considérées après greffe de sang placentaire n'a été réalisée que dans le domaine de la transplantation pédiatrique (Tanaka et al, 2000). Il faut également signaler que la reconstitution immunitaire post-greffe de sang placentaire a été peu étudiée dans le passé (Hamza et al ; 2004).

Pour l'EBV et le CMV, notre étude confirme de précédents résultats, notamment le risque accru d'infection à EBV après utilisation de sérum antilymphocytaire (ATG) dans le conditionnement à la greffe (Brunstein et al, 2006) et l'absence d'influence du type de greffon sur l'incidence des infections à CMV post-allogreffe (Walker et al, 2007).

Nos résultats montrent une association significative entre infection/réactivation à HHV-6 et greffe de sang placentaire après analyse non seulement univariée mais aussi multivariée. Puisque la primo-infection due à l'espèce B du virus HHV-6 touche quasiment toute la population dans les premières années de vie (De Bolle et al, 2005), il n'est pas étonnant que cette espèce ait été retrouvée dans notre étude et que les PCR HHV-6 se soient révélées négatives lors de l'étude des greffons placentaires. Il s'agit ici de résultats qui confirment des données précédentes (Breese Hall et al, 2008 ; Ljungman et al, 2006). On peut donc suspecter qu'il s'agit, aussi bien chez les patients CSP que chez les patients cordons, d'une réactivation endogène du virus HHV-6, révélée par l'immunosuppression consécutive à la greffe qui conduit à une primo-infection des cellules d'origine donneur, CSP ou de sang placentaire.

Il faut noter aussi la détection de deux cas typiques de virus HHV-6 intégré au génome (1 patient et 1 donneur soit 2/110 cas=1.8%), ce qui semble en concordance avec la prévalence de 1% à 2%, rapportée dans la littérature (Pellet et al, 2012).

La fréquence des réactivations HHV-6 observée ici après greffe de CSP est comparable à celles déjà rapportées par d'autres études (De Bolle et al, 2000 ; Ljungman et al, 2000; Boutolleau et al, 2003). Après greffe de sang placentaire, on note très clairement une fréquence accrue des réactivations HHV-6 avec des charges virales plus élevées. Cette réactivation démarre précocement et se pérennise après la greffe (jusqu'à au moins 9 mois post-greffe). Cette situation a déjà été décrite en particulier chez les enfants mais avec un suivi post-greffe beaucoup plus court (Sashihara et al, 2002; Tomonari et al, 2005 ; Yamane et al, 2007). Les facteurs de risques pour développer une infection à HHV-6 post-allogreffe varient d'une étude à l'autre. Ainsi, l'utilisation d'un greffon médullaire (vs CSP) est retrouvée associée à l'infection HHV6 dans l'étude de Maeda et al (1999) mais pas dans l'étude de Ljungman et al (2000). Contrairement aussi à ce que nous avons observé ici, l'intensité du conditionnement n'influence pas la réactivation HHV-6 après greffe dans l'étude de Yamane et al (2007). Le facteur de risque le plus consensuel est l'utilisation d'un donneur non apparenté ou mis-match (Sashihara et al, 2002; Yamane et al, 2007; Ljungman et al, 2000), probablement en raison d'un déficit immunitaire plus prolongé et/ou d'une incidence de GVH aiguë plus importante observés avec ce type de donneur. Dans notre série, les deux groupes ont reçu une greffe à partir de donneurs non apparentés et l'incidence de GVH aiguë a été retrouvée similaire. Néanmoins, notre étude montre que l'utilisation d'un greffon de sang placentaire accroît encore le risque de réactiver une infection à HHV-6 après allogreffe.

La principale conséquence clinique de l'infection à HHV-6 observée dans notre étude est le retard à la prise de greffe avec un retard à la récupération à la fois en neutrophiles et en

plaquettes, surtout chez les patients réactivant précocement le virus. Ce phénomène est bien connu et avait déjà été rapporté par nous ou d'autres équipes (Ljungman et al, 2000 ; Imbert-Marcille et al, 2000, Boutolleau et al, 2003). Le retard à la prise de greffe ou l'absence de prise de greffe est une complication fréquente après greffe de sang placentaire (Laughlin et al, 2004 ; Rocha et al, 2004 ; Hamza et al, 2004 ; Parody et al, 2006 ; Takahashi et al, 2007). L'implication de HHV-6 dans le retard observé à la prise de greffe pose ainsi la question d'une prophylaxie anti-HHV-6 pour les greffes de sang placentaire. Si des anticorps anti-CD46 (récepteur membranaire du virus) pourraient être envisagés (Smith et al, 2003), la place des agents antiviraux actifs contre HHV-6, comme le gancyclovir ou le foscavir (Yoshikawa et al, 2004) reste indéterminée.

Il reste nécessaire de comprendre pourquoi il existe un tel phénomène d'augmentation de la fréquence des réactivations HHV-6 après greffes de sang placentaire. Les caractéristiques majeures des sangs de cordons sont au moins au nombre de trois : une quantité de cellules limitée, la présence de cellules T immatures naïves avec une capacité moindre à produire des cytokines et une réponse cytolytique adéquate, enfin un taux très bas, voire inexistant, de contamination par des virus (Bezhad-Behbahani et al, 2005; Brown et al, 2008 ; Szabolcs et al, 2003). L'absence dans le cordon de cellules T dirigées spécifiquement contre HHV-6 pourrait expliquer en partie un mauvais contrôle de sa réplication. Cependant, l'absence de cellules T anti-EBV ou anti-CMV est également la marque des sangs placentaires alors que ces deux infections virales ne sont pas plus fréquentes. C'est particulièrement surprenant dans le cas du CMV car il s'agit d'un virus qui appartient à la même sous-famille des *Beta-herpesvirus* que HHV-6. De plus, HHV-6 a été décrit comme un co-facteur de la survenue d'une maladie à CMV (DesJardin et al, 2001) et il partage avec le CMV de nombreuses cibles cellulaires, comme les monocytes ou les progéniteurs hématopoïétiques (Lusso et al, 2006 ; Crough et al, 2009). En conséquence, un ou des facteur(s) non identifié(s) dans le sang de

cordon ou des évènements particuliers survenant lors de la reconstitution immunitaire pourraient affecter spécifiquement et sélectivement la réplication d'HHV-6. Parmi les hypothèses envisageables, il est possible que la composition cellulaire des différents types de greffons puisse influencer cette réactivation. Ceci a motivé les travaux entrepris à l'issue de cette première étude. Ils ont visé à déterminer la composition cellulaire de différentes sources sanguines et de greffons. Les résultats sont présentés dans la **Partie expérimentale II** de cette thèse. Une autre voie d'exploration est représentée par l'étude de l'expression du seul récepteur membranaire connu de HHV-6, la molécule CD46 (voir **Rappels Bibliographiques et Partie III expérimentale**), à la surface des cellules contenues dans les différentes sources de greffons. Dans l'unique étude publiée à ce jour (Thulke et al, 2006), il a été montré une plus grande expression du CD46 sur les cellules souches hématopoïétiques dans le sang placentaire par rapport aux CSP. Ceci pourrait expliquer une plus grande susceptibilité des cellules vis-à-vis de HHV6 après greffe de sang placentaire. Cette hypothèse est renforcée par le fait que le CD46 est aussi le récepteur membranaire de l'adénovirus, dont l'incidence des infections post-allogreffe est plus importante également après greffe de sang placentaire (Robin et al, 2007). Nous avons donc entrepris de comparer l'expression du CD46 au sein de différentes sources sanguines et de greffons, ce qui fait l'objet de la **Partie expérimentale III** de cette thèse. La fréquence plus élevée des réactivations HHV-6 après greffe de sang placentaire pourrait également être le fait du profil particulier de reconstitution immunitaire observé après ce type de transplantation. Notre étude, menée sur un nombre limité de patients, montre que durant les six premiers mois, en comparaison de la greffe de CSP, la récupération en lymphocytes B et en cellules NK est significativement meilleure après greffe de sang placentaire alors que la récupération en lymphocytes T CD8+ est significativement inférieure. La possibilité qu'un ou plusieurs types cellulaires permissifs à l'HHV-6 puissent être une source du virus doit être évaluée. Nous confirmons aussi un « rebond » à six mois du taux de

lymphocytes B (Brown et al, 2008), qui peut être expliqué par le fait que les lymphocytes B seraient en excès dans les greffons placentaires (Crough et al, 2009). Nous montrons également la très rapide récupération en cellules NK après greffe de sang placentaire (Szabolcs et al, 2007 ; Brown et al, 2008 ; Beziat et al, 2009). Ce phénomène est important dans la mesure où les cellules NK influencent le devenir des patients en termes de complications, de GVH ou de rechutes après l'allogreffe (Beziat et al, 2009). Les NK et les lymphocytes T CD8+ sont des cibles cellulaires potentielles de l'espèce A mais pas de l'espèce B, celle qui est quasiment toujours retrouvée chez les patients réactivant HHV-6 (Lusso, 2006). La bonne récupération en cellules NK pourrait s'expliquer par le fait qu'elles ne sont pas permissives au virus B (et donc non détruites par lui) mais un autre phénomène doit expliquer la mauvaise récupération en lymphocytes T CD8+ puisque là aussi ces cellules ne sont pas permissives à l'espèce B.

En conclusion, notre étude montre que l'incidence des infections à HHV-6 en post-allogreffe est dépendante du type de greffon utilisé. Une relation spécifique existe entre infection à HHV-6 et greffe de sang placentaire dont l'explication reste incertaine. Les travaux expérimentaux développés dans les **Parties expérimentales II et III** de cette thèse visent à tester l'hypothèse que la composition cellulaire et/ou l'expression du récepteur viral, le CD46, peuvent contribuer à la réactivation de l'HHV-6 après greffe de sang placentaire. Nous menons également actuellement une étude prospective visant à comparer entre greffe de sang placentaire et greffe de CSP la survenue des infections à CMV, EBV, HHV-6 et adénovirus. Les premières analyses confirment l'accroissement très significatif des infections HHV-6 après greffe de sang placentaire.

Le travail relatif à cette première partie a été publié en 2010 dans Bone Marrow Transplantation (voir **Annexe** en fin de volume).



## **Partie II** : Comparaison quantitative (valeurs absolues et pourcentages) des composants cellulaires de différentes sources sanguines et de greffons.

*Résumé : L'incidence accrue d'infections à HHV-6 après greffe de sang placentaire pourrait venir de la composition cellulaire du greffon. Nous avons comparé dans cette deuxième partie de manière exhaustive en cytométrie en flux la composition cellulaire (valeurs absolues et pourcentages) de trois sources sanguines entre elles (sang périphérique (SP); SP stimulé par GCSF, et sang placentaire, n=10 échantillons pour chaque) et de trois sources de greffon entre elles également (moelle non manipulée n=5 ; greffon de CSP après leukaphérèse (CSP, n=10) et greffon de sang placentaire décongelé (n=7)). Le nombre absolu médian de chaque sous-groupe cellulaire étudié (monocytes, lymphocytes T, B, NK et sous-groupes, cellules T régulatrices, cellules dendritiques monocytoïdes et plasmacytoïdes, cellules souches) a été retrouvé significativement supérieur dans le SP stimulé par GCSF et le greffon CSP, à l'exception des cellules dendritiques monocytoïdes dans le sang placentaire et le greffon médullaire. Les résultats les plus impressionnants étaient représentés par des quantités médianes de cellules T et B mémoires mais aussi de cellules dendritiques plasmacytoïdes 375, 318 et 247 fois plus élevées, respectivement, contenues dans le greffon CSP vs le greffon placentaire. Les proportions de cellules T naïves, T CD4+/CD8-, B transitionnelles, de lymphocytes B CD5+ et naïfs étaient retrouvées significativement supérieures dans les prélèvements placentaires (sang ou greffon) alors que les proportions de cellules dendritiques monocytoïdes et plasmacytoïdes étaient significativement inférieures dans ce même type de prélèvements. Notre étude montre des différences très significatives en ce qui concerne la composition cellulaire quantitative des différents greffons disponibles aujourd'hui, pouvant expliquer en partie les différences de devenir observées après greffe de CSP vs greffe de sang placentaire.*

### **INTRODUCTION**

Dans la première partie, nous avons mis en évidence un accroissement très significatif des infections à HHV-6 chez les adultes après allogreffe de sang placentaire en comparaison avec celles (majoritaires aujourd'hui) utilisant des cellules souches périphériques (CSP). Pour tenter d'expliquer ce phénomène, nous avons cherché à mettre en évidence des différences significatives au niveau de la composition cellulaire de différents types de greffons. Par extension, cette évaluation a été menée sur trois sources sanguines différentes et sur les trois types de greffons actuellement disponibles pour la réalisation d'une allogreffe.

L'influence de la source du greffon sur le devenir des patients adultes après allogreffe est maintenant bien démontrée. De nombreuses études ont ainsi comparé les conséquences d'une

greffe utilisant un greffon médullaire versus un greffon de CSP. La récupération en neutrophiles et en plaquettes est significativement plus rapide après greffe de CSP en relation avec une quantité de cellules souches CD34+ plus importante contenue dans le greffon. Néanmoins, l'utilisation d'un greffon de type CSP est associé à une incidence de GVH chronique significativement augmentée et certaines études ont mis en évidence un avantage de survie avec cette même source de greffon (Korbling et al, 2001 ; Stem Cell Trialists' Collaborative Group, 2005). Deux larges études rétrospectives ont comparé le devenir des patients adultes en fonction de l'utilisation d'un greffon placentaire versus un greffon médullaire, après conditionnement myéloablatif. Quand on utilise des donneurs de moelle HLA compatibles 10/10ème non familiaux, on observe une récupération en neutrophiles et en plaquettes plus rapide après greffe médullaire alors que l'incidence de GVH chronique extensive semble plus faible après greffe placentaire (Rocha et al, 2004 ; Laughlin et al, 2004). Par contre, quand on utilise des donneurs médullaires non parfaitement matchés, on observe une incidence de GVH aiguë plus importante en comparaison de l'utilisation de greffons placentaires (Laughlin et al, 2004). L'influence des trois sources de greffon a aussi été comparée dans une même étude rétrospective pédiatrique, montrant une même survie globale et une même survie sans évènements après greffe médullaire, de CSP ou de sang placentaire (Schönberger et al, 2004). Deux autres études rétrospectives sont publiées comparant greffe de sang placentaire versus greffe de moelle + CSP (Parody et al, 2006 ; Takahashi et al, 2007). Finalement, deux larges études ont récemment comparé greffe de CSP vs greffe de sang placentaire après un conditionnement non myélo-ablatif (ou RIC). Dans l'étude de Majhail *et al*, utilisant des donneurs CSP familiaux, en analyse multivariée, la source du greffon ne montrait pas d'impact sur la mortalité liée à la greffe (TRM) ou la survie des patients, mais les deux populations n'étaient pas tout-à-fait comparables en termes de maladies sous-jacentes (Majhail et al, 2008). Dans l'étude plus récente de Chen *et al* (2012),

utilisant des donneurs CSP non apparentés, les survies globale et sans maladie étaient comparables mais la TRM était augmentée après greffe de sang placentaire alors que l'incidence de GVH chronique était moindre après ce type de greffe en comparaison des greffes de type CSP. Nous avons également très récemment conduit une étude comparative au sein du service d'hématologie du CHU de Nantes entre greffes CSP (n=52) et greffes de sang placentaire (n=39) après conditionnement RIC, confirmant également l'absence de différence en terme de survie entre les deux groupes et l'incidence accrue de TRM après greffe de sang placentaire (LeBourgeois et al, 2012).

La source du greffon est également connue pour influencer directement la survenue de complications infectieuses et/ou la reconstitution immunitaire post-transplantation. Par exemple, le nombre de décès lié aux infections dans les 100 jours qui suivent une allogreffe est significativement supérieur après greffe de sang placentaire (Laughlin et al, 2004 ; Parody et al, 2006). Comme déjà démontré, l'infection à HHV-6 est significativement augmentée après ce type de greffe (Chevallier et al, 2010). La reconstitution immunitaire est plus rapide après greffe de CSP vs greffe de moelle (Ottinger et al, 1996).

L'origine des différences décrites ci-dessus, à la fois cliniques et biologiques, est en partie à rechercher dans la source cellulaire des greffons et leurs compositions. Là encore de nombreuses études biologiques ont comparé les différences de composition cellulaire entre greffon de type CSP et greffon médullaire, exprimées en nombre absolu de cellules immunocompétentes (lymphocytes T, B, NK) (Mills et al, 1996 ; Ottinger et al, 1996, To et al, 1997 ; Singhal et al, 2000 ; Favre et al, 2003). En ce qui concerne la comparaison entre la composition d'un greffon placentaire versus greffon de CSP ou médullaire, seuls deux articles sont disponibles et publiés par une même équipe allemande (Theilgaard-Mönch et al, 2001&2003). Ces deux études se sont focalisées sur l'étude des cellules souches et des cellules immunocompétentes du greffon, sans prendre en compte par exemple les cellules

dendritiques ou les cellules T régulatrices, cellules qui peuvent aussi influencer le devenir des patients après allogreffe (Cardenas et al, 2011).

## **MATERIELS et METHODES :**

### *Collection des prélèvements sanguins et des greffons*

Les différents échantillons sanguins ont été recueillis entre Avril à Octobre 2011 dans le service d'Hématologie ou à l'EFS de Nantes à partir de 25 donneurs volontaires (comportant 14 hommes et 11 femmes) après consentement signé. Il s'agissait de donneurs de cellules souches périphériques (CSP) familiaux (n=17) ou non familiaux (n=8) avec un âge médian de 41 ans (écart : 20-67). Les différents prélèvements qui ont ainsi été recueillis chez les donneurs étaient les suivants : sang périphérique (SP) n=10 échantillons, SP après stimulation par G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) n=10 échantillons (SP-GCSF); greffon de CSP obtenus après leukaphérèse (LP) n=10 échantillons (greffon CSP) ; greffon médullaire non manipulé n=5 échantillons. Les échantillons SP-GCSF étaient recueillis avant LP et après 4 jours de stimulation par G-CSF à la dose de 10 µg/Kg/jour en sous-cutané (Neupogen, Amgen, France), comme il est habituel de le pratiquer chez les donneurs de CSP. Les donneurs étaient ensuite pris en charge à l'EFS de Nantes pour la LP. Celle-ci est réalisée avec un séparateur cellulaire de type Cobe Spectra (Cobe BCT, Lakewood, Colorado, USA). Les greffons médullaires ont été collectés au bloc opératoire du CHU de Nantes sous anesthésie générale après ponction au niveau des crêtes iliaques postérieures. La collection des sangs placentaires (ou sang de cordon, SC) (n=10) a été réalisée dans le service d'obstétrique du CHU de Nantes par le Dr Julie Esbelin au moment de la délivrance chez 10 femmes enceintes qui avaient préalablement donné leur consentement écrit pour ce recueil. L'obtention de 7 greffons placentaires, destinés à la destruction, a été possible grâce à l'EFS de Nantes, en raison du décès des patients avant une allogreffe programmée. Les sources sanguines (SP, SP-GCSF, SC) ont été collectées (1 à 7 ml) et analysées dans les 24 heures

suivant le prélèvement. Les échantillons de greffons (moelle, CSP, cordon) ont été collectés à partir de la poche du greffon (1 ml environ) et analysés immédiatement. Le volume final du greffon a été communiqué par l'EFS directement. Tous les prélèvements ont été numérotés avant analyse en cytométrie de flux avec l'automate du laboratoire d'hématologie/biologie du CHU de Nantes. Au total, 52 échantillons ont été récupérés et analysés pour cette étude (prélèvements sanguins n=30 ; greffons n=22). Cette étude a été approuvée par le comité d'évaluation des études cliniques et biologiques du CHU de Nantes. Les caractéristiques des différents donneurs en fonction de la source cellulaire est donnée dans le

**Tableau 6** ci-dessous.

**Tableau 6:** Caractéristiques des différents donneurs.

<b>Sources sanguines</b>	<b>SP [n=10]</b>	<b>SP-GCSF [n=10]</b>	<b>SC [n=10]</b>
Age médian (écart)	50 ans (29-67)	54 ans (33-67)	0
Genre : Homme	6 (60%)	7 (70%)	5 (50%)
Donneur: familial	7 (70%)	8 (80%)	NA
<b>Greffons</b>	<b>Moelle [n=5]</b>	<b>CSP [n=10]</b>	<b>Cordon [n=7]</b>
Age médian (écart)	40 ans (20-50)	54 ans (33-67)	0
Genre: Homme	4 (80%)	6 (60%)	3 (43%)
Donneur: familial	4 (80%)	6 (60%)	NA

Abréviations: SP : sang périphérique ; SP-GCSF : SP stimulé par G-CSF ; SC : sang de cordon ; CSP : greffon de cellules souches périphériques ; NA: non applicable.

### *Cytométrie en flux*

La composition cellulaire des différents prélèvements a été évaluée par cytométrie en flux avec l'équipe de Mme Nelly Robillard au laboratoire d'Hématologie/Biologie du CHU de Nantes grâce à un appareil de type FACS CANTO II (Beckton Dickinson (BD) Biosciences, San Jose, CA, USA). 10 à 50 µl de chaque échantillon ont été incubés pendant 10 minutes à température ambiante dans le noir avec différents anticorps monoclonaux (AcMo) couplés à 6 différents fluorochromes : FITC, PE, APC, PerCP, PECy7 et V500 selon les 9 combinaisons décrites dans le **Tableau 7**.

**Tableau 7:** Combinaisons des différents anticorps monoclonaux utilisés pour l'étude de la composition cellulaire des trois sources sanguines et des trois sources de greffons considérés.

Panel 6 couleurs	FITC-	PE-	APC-	PerCP-	PECy7-	V500-
(tube 1) Lymphocytes Cellules T, B, NK et sous-populations	IgG1 (679.1Mc7)	CD56 (NCAM16.2)	CD19 (J3-119)	CD3 (SK7)	CD16 (3G8)	CD45 (H130)
(tube 2) Cellules T TCR alpha/beta (a/b) et gamma/delta (g/d) et sous-populations	TCRa/b (WT31)	TCRg/d (11F2)	CD4 (SK3)	CD3 (SK7)	IgG1 (679.1Mc7)	CD8 (RPA-T8)
(tube 3) Cellules T naïves et mémoires Cellules T et CD46 expression Sous-populations T CD4/CD8	CD46 (E4.3)	CD45RO (UCHL-1)	CD4 (SK3)	CD3 (SK7)	CD45RA (L48)	CD8 (RPA-T8)
(tube 4) Cellules NK, sous-populations et CD46 expression Cellules NKT et CD46 expression	CD46 (E4.3)	CD56 (NCAM16.2)	CD305 (=Nkp46) (9E2/Nkp46)	CD3 (SK7)	CD16 (3G8)	CD45 (H130)
(tube 5) Monocytes et CD46 expression Cellules T régulatrices et CD46 expression	CD46 (E4.3)	CD127 (hIL-7R-M21)	CD4 (SK3)	CD14 (MΦP9)	CD25 (2A3)	CD45 (H130)
(tube 6) Cellules Pré-B, B transitionnelles et lymphocytes B totaux, Lymphocytes B naïfs et mémoires, CD5+ et CD46 expression	CD46 (E4.3)	CD10 (ALB1)	CD5 (L17F12)	CD19 (SJ25C1)	CD27 (1A4CD27)	CD45 (H130)
(tube7) Cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) Cellules souches	Lin*	CD34 (8G12)	CD303 (=BDCA-2) (AC144)	HLA-DR (L243)	CD123 (7G3)	CD45 (H130)
(tube 8) Cellules dendritiques monocytoïdes (mDCs)	Lin*	CD11c (S-HCL-3)		HLA-DR (L243)	CD123 (7G3)	CD45 (H130)
(tube 9) Cellules souches, pDCs et CD46 expression	CD46 (E4.3)	CD34 (8G12)	CD303 =(BDCA-2) (AC144)	HLA-DR (L243)	CD123 (7G3)	CD45 (H130)

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

L'ensemble des AcMo provenaient de BD à l'exception du contrôle IgG1-FITC, le CD10-PE, le CD19-APC et le CD27-PECy7 que nous nous sommes procurés chez Beckman-Coulter (Villepinte, France) et le CD303-APC (BDCA2) acheté chez Myltenyi Biotec Inc (Auburn, CA, USA).

Les érythrocytes sont ensuite lysés avec une solution de lyse (FACS lysis solution, BD) et les tubes sont lavés une fois avec une solution de PBS (phosphate-buffered saline) + 1% de sérum de veau (Sigma, St-Louis, MO, USA). Finalement, les cellules sont fixées avec une solution de PBS+0.5% de paraformaldéhyde (Sigma) et analysés directement avec l'appareil FACS CANTO II. On enregistre au moins 40000 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.

Le nombre absolu des différentes populations cellulaires a été calculé en multipliant le nombre total de cellules nucléées (obtenu après numération des prélèvements) avec le pourcentage total de chaque sous-population considérée, déterminé par l'analyse en cytométrie de flux. Les pourcentages ont été exprimés par rapport à la population cellulaire nucléée totale, à l'exception des cellules T, B et NK totales, exprimées en pourcentage par rapport aux lymphocytes totaux, et les sous-populations T, B et NK, exprimées en pourcentage par rapport à la population T (à l'exception des cellules T régulatrices), B ou NK totale, respectivement.

#### *Définitions des différentes populations cellulaires*

Les populations cellulaires considérées pour cette étude étaient les suivantes : lymphocytes totaux, monocytes, lymphocytes T, B et NK et sous-populations, cellules dendritiques monocytoïdes (mDCs) et plasmacytoïdes (pDCs), et cellules souches. Les lymphocytes sont sélectionnés sur des critères de taille et de granulométrie cellulaire (FSC : forward scatter et

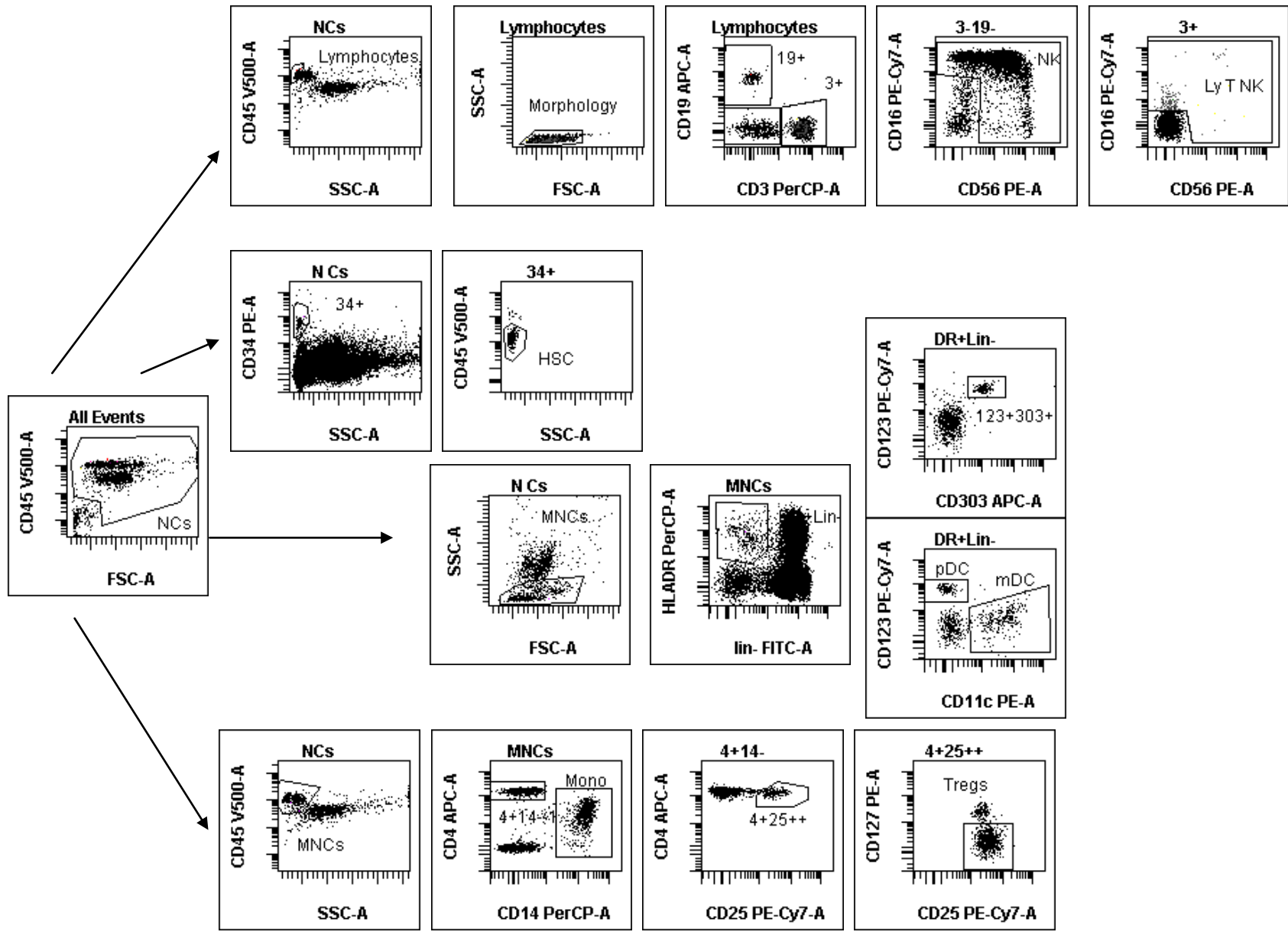
SSC : side scatter). Les lymphocytes totaux sont aussi définis par la somme des lymphocytes T, B et NK. Les monocytes sont définis comme les cellules CD45+/CD14+. Les lymphocytes T sont définis comme les cellules CD45+/CD3+. Les sous-populations lymphocytaires T sont ensuite définis en fonction de l'expression du CD4 et du CD8 (+/-, +/+, -/+, -/-), des TcR alpha/beta et gamma/delta, du CD45RO (T mémoires) et CD45RA (T naïfs). Les cellules NKT sont définies comme les cellules CD45+/CD3+/CD16+ et/ou CD56+. Les cellules T régulatrices (Tregs) sont définies comme les cellules CD4+CD25+high/CD127low/- (Liu et al, 2006).

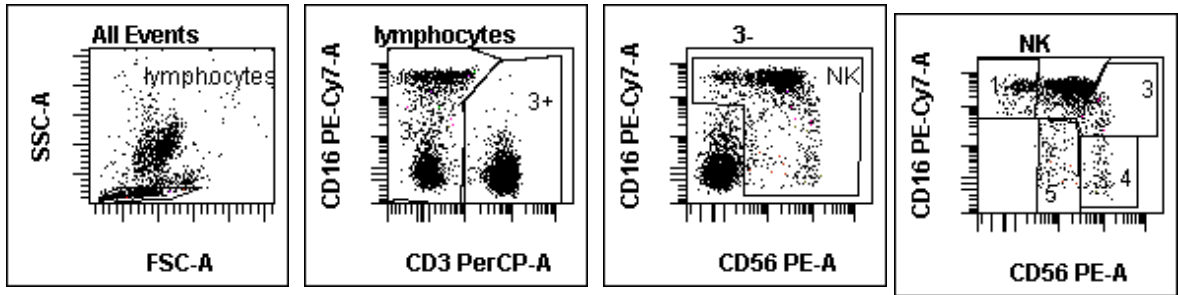
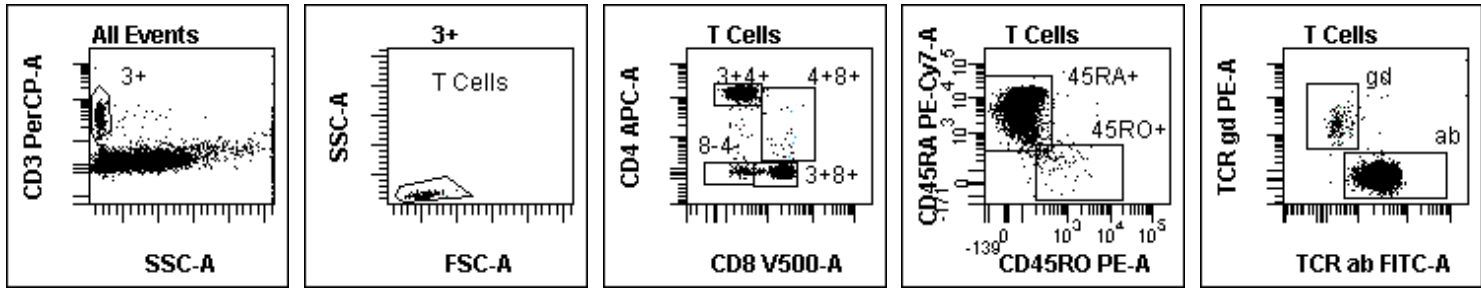
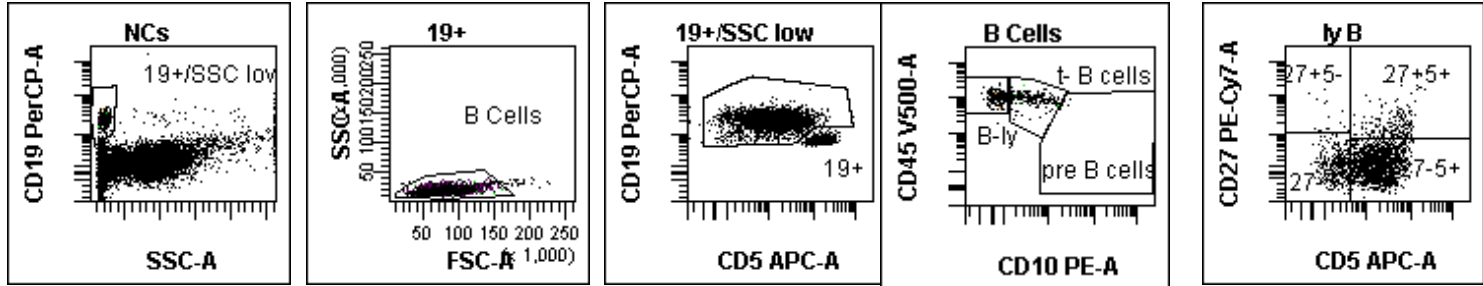
Les cellules B totales sont définies comme les cellules CD45(+/-)/CD19(+)/SSC(low). Les lymphocytes B et les cellules B transitionnelles sont définies comme les cellules respectivement CD45(high)/CD19+/CD10- et CD45(high)/CD19+/CD10+. Les cellules pré-B sont définies comme les cellules CD45(dim-)/CD19+/CD10+. Les sous-populations lymphocytaires B ont ensuite été considérées selon l'expression du CD5 et du CD27 (CD27- : lymphocytes B naïfs ou matures ; CD27+ : lymphocytes B mémoires). (McKenna et al, 2001; Tangye et al, 2007; Marie-Cardine et al, 2008). Les cellules NK sont définies comme les cellules CD45+/CD3-/CD16+ et/ou CD56+. Les sous-populations NK ont ensuite été considérées en fonction de l'expression du Nkp46, et de l'expression CD16/CD56 (CD16+/CD56- ; CD16+/CD56<sup>dim</sup> ; CD16<sup>dim</sup>/CD56<sup>bright</sup>, CD16-/CD56<sup>bright</sup> et CD16-/CD56<sup>dim</sup>) (Poli et al, 2009). Les cellules souches sont définies comme les cellules CD45+/CD34+. Les cellules dendritiques sont définies comme les cellules CD45+/lin-/DR+ puis les mDCs sont définies comme les DCs CD11c+/IL-3Ralpha(CD123)low/- et les pDCs comme les DCs CD303(BDCA-2)+/IL-3Ralpha(CD123)+ (Dzionek et al, 2000 ; MacDonald et al, 2002). La description cytométrique des différentes populations cellulaires est donnée dans la **Figure 15** ci-dessous.



**Figure 15:** Analyse en cytométrie de flux des différents composants cellulaires des prélèvements sanguins ou de greffons considérés. L'analyse représentée ici est celle d'un greffon placentaire décongelé selon les pratiques en vigueur avant injection au donneur.

Abréviations: NCs: cellules nucléées; Ly: lymphocytes; HSC: cellules souches hématopoïétiques; MNCs: cellules mononucléées; mDC: cellules dendritiques monocytoïdes; pDCs: cellules dendritiques plasmacytoïdes; Mono: monocytes; Tregs: cellules T régulatrices; gd: cellules T gamma/delta; ab: cellules T alpha/beta; t B cells: cellules B transitionnelles.





### *Analyses statistiques.*

Les comparaisons des valeurs absolues et des pourcentages des différentes populations cellulaires considérées ont été réalisées entre les trois sources sanguines, les trois sources de greffons et entre la source sanguine et le greffon correspondant pour les CSP et les cordons grâce aux deux tests non-paramétriques de Kruskal-Wallis et Wilcoxon. Une valeur de  $p < 0.05$  a été considérée comme statistiquement significative. Les analyses ont été réalisées par Lucie Planche du PIMESP (DRC du CHU de Nantes, service de Biostatistiques) avec le logiciel SAS 9.1 (SAS Institute Inc., SAS Campus Drive, Cary, NC, USA).

## **RESULTATS :**

### ***Comparaison des sources sanguines.***

La comparaison de la composition cellulaire des trois sources sanguines (SP, SP après stimulation par G-CSF et SC) est rapportée dans les **Tableaux 8, 9, 10**.

### *Cellules nucléées totales, monocytes et lymphocytes totaux.*

Comme attendu, un nombre absolu médian de cellules nucléées, de monocytes et de lymphocytes totaux est retrouvé significativement plus important dans le SP stimulé par G-CSF. La même proportion de monocytes est retrouvée parmi les trois sources sanguines alors que la proportion de lymphocytes totaux est significativement plus basse dans le SP stimulé par G-CSF.

### *Cellules T et sous-groupes.*

Le nombre absolu médian de lymphocytes T est significativement supérieur dans le SP stimulé par G-CSF alors que la même proportion de lymphocytes T (rapportée aux lymphocytes totaux) est retrouvée parmi les trois sources sanguines. Les proportions

médianes de cellules T naïves, CD4+/CD8-, CD4+/CD8+ sont significativement plus élevées dans le sang placentaire alors que la proportion de cellules NKT est significativement moins élevée. Le nombre absolu médian et la proportion médiane de cellules Tregs sont significativement plus bas dans le SP mais comparables entre le SP stimulé par G-CSF et le sang placentaire.

#### *Cellules B et sous-groupes.*

Le nombre absolu médian de cellules B est significativement supérieur dans le SP stimulé par G-CSF. La proportion de lymphocytes B (rapportée aux lymphocytes totaux) est comparable entre les trois sources sanguines. La proportion médiane de cellules B transitionnelles, de lymphocytes B CD5+ et naïfs est significativement supérieure dans le sang placentaire. Les cellules pré-B ne sont retrouvées dans aucune source sanguine.

#### *Cellules NK et sous-groupes.*

Le nombre absolu médian de cellules NK est significativement plus bas dans le SP alors que leur proportion (rapportée aux lymphocytes totaux) est comparable entre les trois sources sanguines. De même, la proportion médiane des sous-groupes cellulaires NK est comparable entre les trois sources sanguines, à l'exception des cellules CD46<sup>dim</sup>/CD16<sup>bright</sup> dont la proportion médiane est significativement supérieure dans le SP.

#### *Cellules dendritiques.*

Le nombre absolu médian et le pourcentage médian de mDCs sont significativement supérieurs dans le sang placentaire. Le nombre absolu médian de pDCs est significativement inférieur dans le SP stimulé par G-CSF et comparable entre le SP et le sang placentaire. Le nombre absolu médian et la proportion médiane de mDCs par rapport aux pDCs sont

retrouvés significativement supérieurs dans le sang placentaire uniquement (p=0.002 et p=0.002 ; SP : p=0.07 et p=0.09 ; SP stimulé par G-CSF : p=0.12 et p=0.13).

### *Cellules souches.*

Par définition, les cellules CD34+ ne sont pas retrouvées dans le SP. Le nombre médian absolu de cellules souches est significativement plus élevé dans le SP stimulé par G-CSF comparé au sang placentaire mais la même proportion médiane de ces mêmes cellules est observée entre ces deux sources.

**Tableau 8:** Comparaison des nombres absolus médians des principaux composants cellulaires des trois sources sanguines considérées.

Sources	Médiane (écart)			Valeur de P
	SP [n=10]	GCSF-SP [n=10]	SC [n=10]	
Cellules Nucléées	5525/ $\mu$ L (4380-10370)	51205/ $\mu$ L (37110-70770)	8495/ $\mu$ L (5280-16810)	<0.0001
Monocytes	500/ $\mu$ L (210-770)	2995/ $\mu$ L (1270-6080)	800/ $\mu$ L (280-2290)	<0.0001
Lymphocytes	1502.5/ $\mu$ L (690-2460)	4289/ $\mu$ L (1690-7300)	2742.5/ $\mu$ L (1354-5228)	0.0005
Cellules T	1116.5/ $\mu$ L (345-1943)	3059/ $\mu$ L (997-4480)	2007.5/ $\mu$ L (948-3660)	0.002
Cellules B	149/ $\mu$ L (16.5-217)	493.5/ $\mu$ L (313-984)	130.5/ $\mu$ L (49.5-345)	<0.0001*
Cellules NK	237/ $\mu$ L (111-555)	736.5/ $\mu$ L (456-1123)	604.5/ $\mu$ L (142-1687)	0.001**
mDCs	10/ $\mu$ L (4-30.5)	22/ $\mu$ L (12-194)	34.75/ $\mu$ L (18.5-91)	0.0002
pDCs	7.5/ $\mu$ L (5-10)	31.5/ $\mu$ L (16-64)	9.5/ $\mu$ L (3-21)	<0.0001*
Cellules Souches	0	61/ $\mu$ L (30-143)	18.4/ $\mu$ L (0.8-59)	0.002
Cellules Tregs	31.25/ $\mu$ L (13.5-46)	67.5/ $\mu$ L (5-163)	77/ $\mu$ L (32-161)	0.0007**
Cellules NKT	125.25/ $\mu$ L (26-447)	291/ $\mu$ L (44-869)	42.25/ $\mu$ L (5-275)	0.005

Abréviations: SP: sang périphérique; GCSF-SP: SP stimulé par G-CSF; SC: sang de cordon; mDCs: cellules dendritiques monocytoïdes; pDCs: cellules dendritiques plasmacytoïdes.

\* P > 0.05 lorsque comparaison SP vs SC.

\*\* P > 0.05 lorsque comparaison GCSF-SP vs SC.

1 **Tableau 9:** Comparaison des proportions médianes des principaux composants cellulaires des  
 2 trois sources sanguines et des trois sources de greffons considérés.  
 3

Sources sanguines	Médiane (écart)			Valeur de P
	SP [n=10]	GCSF-SP [n=10]	SC [n=10]	
Monocytes/CN	7.25% (3.7-11.6)	5.75% (3-12)	9.05% (5.1-13.6)	NS
Lymphocytes/CN	30.7% (12.3-39.6)	8.5% (4-14)	31% (15.1-54.5)	<0.0001*
Cellules T /lym	78.5% (50-88)	64.95% (43.5-76)	66% (51-86)	NS
Cellules B/lym	8.75% (2-16)	17.2% (9.8-26.5)	10.5% (5-25)	0.03*
Cellules NK/lym	12.75% (8-37.5)	17.85% (8.5-30)	23.5% (9-35)	NS
mDCs/CN	0.18% (0.09-0.64)	0.05% (0.02-0.46)	0.42% (0.32-1.05)	0.0001
pDCs/CN	0.13% (0.09-0.19)	0.07% (0.04-0.09)	0.11% (0.03-0.21)	0.002*
Cellules souches/NC	0% par définition	0.12% (0.06-0.3)	0.2% (0.01-0.48)	NS
Cellules Tregs/NC	0.54% (0.21-1.05)	0.17% (0.01-0.3)	0.92% (0.36-1.25)	<0.0001
Type de greffon	Moelle [n=5]	CSP [n=10]	Cordon décongelé [n=7]	
Monocytes/CN	3% (1-6)	33.7% (15.8-49.6) <sup>≈</sup>	11.3% (4.4-16.3)	0.0002
Lymphocytes/CN	13% (8-18)	35.15% (15.5-59.7) <sup>≈</sup>	25.3% (19.3-49.2)	0.004 <sup>§</sup>
Cellules T /lym	72% (57.4-77.3)	61.5% (43.9-73.6)	66% (49.8-81.6)	NS
Cellules B/lym	17% (12-26)	20.5% (12.1-28.3)	11.3% (9-28.5)	NS
Cellules NK/lym	11% (10-16.6)	18.05% (11-32.7)	22.7% (5.5-34.7)	NS
mDCs/CN	0.55% (0.44-1.31)	0.26% (0.14-0.85) <sup>≈</sup>	0.2% (0.06-0.63)	0.04 <sup>§</sup>
pDCs/CN	0.19% (0.11-0.33)	0.31% (0.13-0.76) <sup>≈</sup>	0.07% (0.05-0.14)	0.001
Cellules souches/CN	0.72% (0.47-0.89)	0.48% (0.25-1.05) <sup>≈</sup>	0.31% (0.17-0.54)	0.01
Cellules Tregs/CN	0.23% (0.13-0.39)	0.88% (0.57-1.09) <sup>≈</sup>	0.71% (0.45-1.28)	0.003 <sup>§</sup>

4  
 5 Abréviations: CN: cellules nucléées; lym: lymphocytes; SP: sang périphérique; GCSF-SP: SP stimulé par G-  
 6 CSF; SC: sang de cordon; mDCs: cellules dendritiques monocytoïdes; pDCs: cellules dendritiques  
 7 plasmacytoïdes; CSP: greffon de cellules souches périphériques; NS: non significatif.

8 \* P > 0.05 lorsque comparaison SP vs SC.

9 <sup>≈</sup> P < 0.05 lorsque comparaison GSCF-SP vs CSP.

10 <sup>§</sup> P > 0.05 lorsque comparaison CSP vs greffon placentaire.  
 11  
 12  
 13  
 14  
 15  
 16  
 17  
 18  
 19

1 **Tableau 10:** Comparaison des proportions médianes des sous-types cellulaires T, B et NK des  
 2 trois sources sanguines et des trois types de greffons considérés.  
 3

Sources sanguines	Médiane (écart)			Valeur de P
	SP [n=10]	GCSF-SP [n=10]	SC [n=10]	
Sous-groupes cellules T/ T				
TCR alpha/beta+	98% (77-99.5)	97.5% (95-99.5)	97.75% (94-99)	NS
Naives	47.5% (28-59)	50% (28-67)	94.5% (86-96.5)	<0.0001**
CD4+CD8-	64.5% (42-74)	65.75% (36.5-72.3)	74.25% (59-79.1)	0.007**
CD4-CD8+	29.75% (20.5-50)	29.9% (21.5-56.2)	22.05% (14.2-35)	0.04 **
CD4-CD8-	4.6% (1.8-19)	4% (1.5-6.5)	2% (1.1-4.4)	0.004**
CD4+CD8+	0.95% (0.3-1.9)	0.65% (0.2-0.9)	1.55% (0.8-4.8)	0.0009
NKT	10.8% (3.4-24.5)	9.2% (2.9-30.1)	2.4% (0.5-10.4)	0.001**
Sous-groupes B/B				
Cellules pré-B	0%	0%	0%	
B Transitionnelles	12.25% (0-21)	8% (4.5-17)	43.5% (26-62)	<0.001**
Lymphocytes B	87.75% (79-100)	89% (83-95.5)	56.5% (38-74)	<0.001**
CD5+/- lym B	19.75% (4-33)	26% (8.7-32.5)	64.5% (47-82)	<0.0001
Naive/lym B	58% (30-87)	78.5% (61-91.3)	90.1% (83.9-96.3)	0.0001
Sous-groupes NK/NK				
Nkp46+	65.8% (38.2-87.3)	37.5% (24.4-83.3)	69.3% (12-93)	NS
CD56 <sup>neg</sup> /CD16 <sup>bright</sup>	14.7% (9.2-34.2)	44.75% (12.4-67.5)	29% (8-69.5)	NS
CD56 <sup>dim</sup> /CD16 <sup>bright</sup>	73.7% (50-86)	40.9% (21.9-76)	58.5% (25.9-84.5)	0.006***
CD56 <sup>bright</sup> /CD16 <sup>dim</sup>	2.25% (0.5-9.5)	1.75% (0.7-5.7)	2.05% (0.7-6.2)	NS
CD56 <sup>bright</sup> /CD16 <sup>neg</sup>	1.65% (0-10)	1.75% (0.7-18.6)	2.75% (1.4-4.5)	NS
CD56 <sup>dim</sup> /CD16 <sup>neg</sup>	3.9% (1.6-21)	10.35% (4-37.8)	5.5% (1.8-14)	NS
<b>Types de Greffon</b>	<b>Moelle [n=5]</b>	<b>CSP [n=10]</b>	<b>Cordon décongelé [n=7]</b>	
Sous-groupes cellules T/ T				
TCRalpha/beta+	97.5% (95-98.5)	98.1% (91-99.7)	98% (96-99)	NS
Naives	60% (49-63)	51% (28-65)	91% (89-96)	0.0007 §§
CD4+CD8-	51.3% (44-56.2)	61.9% (47.4-76.3)	71.9% (61.7-80.3)	0.003
CD4-CD8+	41% (37.5-51.2)	30% (19.7-40.8)	22.5% (16.8-34.7)	0.005
CD4-CD8-	5.3% (3.3-6.8)	3.35% (2-12.5)	2.7% (1.6-5.1)	0.04 §/§§
CD4+CD8+	2.5% (0.8-3.6)	0.95% (0.3-8.5)	1.2% (0.6-2.1)	NS
NKT	8.8% (7.4-17.9)	7.65% (3.3-80)	7% (2.5-10.3)	NS
Sous-groupes B/B				
Cellules pré-B	38% (12-44)	0%	0%	
B Transitionnelles	9% (6-11)	14% (6-19)	34% (31-49)	0.0005§§
Lymphocytes B	55% (45.5-77)	86% (81-94)	66% (51-69)	0.0003§§§
CD5+/- lym B	28% (18-38)	22.75% (12-48)	69% (58.5-93)	0.0008 §§
Naive/lym B	73% (61-81)	77.5% (57-90.4)	91.5% (90-95)	0.001§§
Sous-groupes NK/NK				
Nkp46+	23.5% (21.3-34.3)	32.65% (17.9-47.2)	66.9% (13.4-87.3)	NS
CD56 <sup>neg</sup> /CD16 <sup>bright</sup>	10.3% (7-24)	55.5% (15.4-61)	42.9% (19.5-52.6)	0.003 §
CD56 <sup>dim</sup> /CD16 <sup>bright</sup>	26% (15.5-35)	34.5% (19.6-72.7)	35.9% (23.6-57.5)	NS
CD56 <sup>bright</sup> /CD16 <sup>dim</sup>	2.5% (0.7-6.2)	1.5% (0.3-4.7)	2.8% (0.5-6.3)	NS
CD56 <sup>bright</sup> /CD16 <sup>neg</sup>	6% (2.2-15)	0.75% (0.1-15.3)	3.7% (1.6-4.9)	0.005 §§§
CD56 <sup>dim</sup> /CD16 <sup>neg</sup>	49% (41-65)	7.6% (1.8-34.3)	12% (5.8-17.3) ≈	0.001

4 Abréviations: lym: lymphocytes; SP: sang périphérique; GCSF-SP: SP stimulé par G-CSF; SC: sang de cordon;  
 5 CSP: greffon de cellules souches périphériques; NS: non significatif.

6  
 7 \* P> 0.05 lorsque comparaison SP vs SC, \*\* P > 0.05 lorsque comparaison SP vs GCSF-SP, \*\*\* P> 0.05 lorsque  
 8 comparaison GCSF-SP vs SC.

9 § P> 0.05 lorsque comparaison CSP vs greffon placentaire, §§ P> 0.05 lorsque comparaison greffon médullaire vs  
 10 CSP, §§§ P> 0.05 lorsque comparaison greffon médullaire vs greffon placentaire.

11 ≈ P < 0.05 lorsque comparaison SC vs greffon placentaire.  
 12  
 13



1  
2 **Comparaison des sources de greffons.**

3  
4 La composition cellulaire (valeurs absolues et proportions) des différents greffons est fournie  
5 dans les **Tableaux 9, 10, 11.**

6  
7 **Tableau 11:** Comparaison entre les trois différentes sources de greffons du nombre médian  
8 de cellules en valeur absolue.

Type de Greffon	Nombre absolu median de cellules x 10 <sup>6</sup> par Kg (écart)*			
	Moelle [n=5] (1)	CSP [n=10] (2)	Cordon décongelé [n=7] (3)	Ratios 1:2/ 3:2/3:1
Cellules nucléées	222 (170-420)	788 (440-1510)	20 (6-35)	3.5/39/11
Monocytes	5.6 (2.2-13.3)	236 (140-737)	2.04 (0.2-5.8)	42/116/3
Lymphocytes totaux	28.8 (22.8-50.5)	250 (171-531)	5 (2.4-12.5)	9/50/6
Cellules T totales	21 (16.4-28.9)	164 (81.5-338.2)	2.8 (1.9-8.7)	8/59/8
CD45RO+	7.8 (6-14.7)	82.5 (38.2-165.7)	0.2 (0.1-0.9)	10/375/35
CD45RA+	12.7 (10.4-14.2)	86.1 (31.1-183.5)	2.6 (1.8-7.7)	7/34/5
CD4+CD8-	9.2 (8.4-15.4)	103.7 (49.3-242.4)	1.9 (1.2-6.6)	11/54/5
CD4-CD8+	9.1 (6.7-10.8)	54.1 (19.7-106)	0.7 (0.3-1.7)	6/73/12
CD4-CD8-	1.3 (0.7-1.5)	5.4 (2.1-41)	0.07 (0.03-0.2)	4/77/19
CD4+CD8+	0.4 (0.2-1)	1.6 (0.2-9.3)	0.03 (0.01-0.1)	4/54/14
TCR a/b+	20 (16.1-28)	162.4 (80.7-332.4)	2.7 (1.9-8.5)	8/59/7.5
TCR g/d+	0.7 (0.3-1)	3.2 (0.6-29.5)	0.07 (0.03-0.1)	4.5/45/10
NKT cells	2.1 (1.4-4.4)	16 (2.8-55.2)	0.25 (0.1-0.4)	7.5/64/8.5
Tregs	0.5 (0.2-1.1)	6.2 (4-13)	0.14 (0.05-0.3)	12/44/3.5
Cellules B totales	4.6 (3.8-13.1)	48.75 (31.6-107.7)	0.81 (0.2-1.7)	11/60/6
Cellules Pré-B	1.63 (0.4-5.7)	0	0	
Cellules B transitionnelles	0.42 (0.2-1.3)	6.64 (1.8-8.0)	0.27 (0.08-0.6)	16/25/1.5
Lymphocytes B	2.69 (2.2-5.9)	40.97 (26.2-100.1)	0.54 (0.17-1.1)	15/76/5
CD5+	0.9 (0.4-2.1)	11.8 (3.9-19.6)	0.34 (0.13-0.99)	13/34/2.5
naïfs	1.9 (1.5-5)	32.4 (17.3-94.2)	0.49 (0.18-1.15)	17/66/4
mémoires	0.9 (0.4-2)	9.55 (4.4-21.5)	0.03 (0.01-0.11)	11/318/30
Cellules NK totales	3.4 (2.3-8.4)	61.75 (19.8-98.7)	1.1 (0.0-2.7)	18/55/3
mDCs	2.3 (0.9-2.4)	2.03 (1.2-5.2)	0.05 (0.01-0.12)	0.9/41/46
pDCs	0.5 (0.2-0.6)	2.47 (1.5-6.7)	0.01 (0.00-0.05)	5/247/46
Cellules souches	1.4 (0.8-3.7)	3.89 (1.1-9.4)	0.06 (0.01-0.19)	2.5/65/24
<b>Volume médian des greffons (écart)</b>				
Type de greffon	Moelle [n=5]	CSP [n=10]	Cordon décongelé [n=7]	P
	756 ml (393-959)	223 ml (203-323)	30 ml (25-100)	0.0001

10  
11 Abréviations: CSP: greffon de cellules souches périphériques; mDCs: cellules dendritiques  
12 monocytoïdes; pDCs: cellules dendritiques plasmacytoïdes; Tregs: cellules T régulatrices.  
13 <sup>2,3</sup> P > 0.05 quand comparaison CSP et cordon décongelé, <sup>1,2</sup> P > 0.05 quand comparaison moelle vs  
14 CSP, <sup>1,3</sup> P value > 0.05 quand comparaison moelle vs cordon décongelé.  
15 \*P<0.001 pour toutes les comparaisons moelle vs CSP vs cordon décongelé.

### *Volume des greffons.*

Le volume médian du greffon injecté varie significativement entre les trois types de greffon : CSP : 223 ml (écart : 203-323) ; moelle : 756 ml (écart : 393-959) ; greffon placentaire : 30 ml (écart : 25-100).

### *Cellules nucléées totales, lymphocytes totaux et Monocytes.*

Comme attendu, le nombre absolu médian de cellules nucléées est significativement plus important dans le greffon de CSP ( $505.5 \cdot 10^8$ , écart : 265-836) comparé au greffon médullaire ( $125 \cdot 10^8$ , écart : 71.5-177) ou au greffon placentaire ( $12.8 \cdot 10^8$ , écart : 3.6-20.1) ( $p < 0.0001$ ). En conséquence, le nombre absolu médian de chaque sous-groupe cellulaire (excepté les mDCs) a été retrouvé plus élevé dans le greffon de CSP.

Le nombre absolu médian de monocytes est 116 et 42 fois plus élevé dans le greffon CSP comparé au greffon médullaire et placentaire, respectivement. De même, la proportion médiane de monocytes présente dans le greffon de CSP est plus élevée.

Le nombre absolu médian de lymphocytes totaux est retrouvé 50 et 9 fois plus élevé dans le greffon de CSP comparé aux greffons médullaire et placentaire, respectivement. La proportion médiane de lymphocytes totaux est plus faible dans la moelle mais comparable entre le greffon CSP et le greffon placentaire.

### *Cellules T et sous-groupes.*

Les nombres absolus médians de lymphocytes T totaux et des sous-groupes de lymphocytes T sont retrouvés significativement inférieurs dans le greffon placentaire. Les proportions de lymphocytes T totaux, de lymphocytes T alpha/beta+, gamma/delta+, CD4+CD8+ et de lymphocytes NKT sont comparables entre chaque source de greffons. La proportion de lymphocytes T naifs est significativement supérieure dans le greffon placentaire ainsi que

celle des lymphocytes T CD4+CD8-. A l'inverse, les proportions de lymphocytes T mémoires, CD4-CD8+ et CD4-CD8- sont significativement diminuées dans le greffon placentaire.

#### *Cellules B et sous-groupes.*

Le nombre absolu médian de cellules B totales mais aussi de l'ensemble des sous-groupes de cellules B considérées est significativement inférieur dans le greffon placentaire. Les cellules pré-B ne sont retrouvées que dans le greffon médullaire. La proportion de cellules B totales (par rapport aux lymphocytes totaux) est comparable entre chaque source de greffons. Les proportions de cellules B transitionnelles, de lymphocytes B CD5+ et lymphocytes B naifs sont retrouvées significativement supérieures dans le greffon placentaire. La proportion de lymphocytes B totaux est significativement supérieure dans le greffon de CSP.

#### *Cellules NK et sous-groupes.*

Le nombre absolu médian de cellules NK totales est significativement inférieur dans le greffon placentaire alors qu'il n'y a pas de différence lorsqu'on compare les données en pourcentage par rapport aux lymphocytes totaux. La proportion de cellules NK CD56<sup>neg</sup>/CD16<sup>bright</sup> est significativement inférieure dans le greffon médullaire. Les proportions de cellules NK CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>neg</sup> et CD56<sup>dim</sup>/CD16<sup>neg</sup> sont par contre significativement inférieures dans le greffon CSP.

#### *Cellules dendritiques.*

Le nombre absolu médian de mDCs est 41 fois plus élevé dans le greffon CSP comparé au greffon placentaire alors qu'il est retrouvé comparable entre la moelle et le greffon CSP. La proportion médiane de mDCs est significativement supérieure dans le greffon médullaire. Les

nombres absolus médians de pDCs sont respectivement 247 et 5 fois plus important dans le greffon CSP comparé au greffon placentaire et au greffon médullaire. La proportion médiane de pDCs est significativement plus faible dans le greffon placentaire. Finalement, le nombre absolu médian et la proportion médiane de mDCs comparés aux pDCs sont significativement supérieurs dans le greffon placentaire uniquement (p=0.03 et p=0.01 ; CSP : p=0.32 et p=0.55 ; moelle : p=0.06 et p=0.06).

#### *Cellules souches.*

Comme attendu, le nombre absolu médian de cellules CD34+ est 65 et 2.5 fois plus élevé dans le greffon CSP comparé au greffon placentaire et au greffon mdullaire. La proportion médiane de cellules souches est significativement plus faible dans le greffon placentaire.

#### ***Comparaison proportionnelle des sources sanguines et de leur greffon correspondant.***

Les résultats sont rapportés dans les **Tableaux 9 et 10**.

#### *SP stimulé par G-CSF et greffon de CSP.*

La proportion médiane de toutes les sous-populations considérées pour l'étude (incluant les cellules Tregs) est augmentée après cytophérèse, à l'exception de la proportion des cellules T, B et NK (rapportée aux lymphocytes totaux) qui est retrouvée comparable entre les deux groupes.

#### *Sang de cordon et greffon placentaire.*

La proportion médiane de toutes les sous-populations cellulaires considérées pour l'étude (avant et après décongélation) est comparable entre les deux groupes, à l'exception des cellules NK CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>neg</sup> dont la proportion est retrouvée significativement plus élevée dans le greffon placentaire.

## **DISCUSSION et PERSPECTIVES:**

Nous avons comparé de façon détaillée et pour la première fois la composition cellulaire de différentes sources sanguines et de différents types de greffon. Nous avons également considéré pour cette étude les conditions réelles d'administration des greffons. A ce jour, une seule équipe à notre connaissance a rapporté la comparaison des différents types de greffons mais en incluant des sangs placentaires et non des greffons décongelés « prêt à l'emploi », et en limitant l'analyse aux sous-groupes lymphocytaires et aux cellules souches (Theilgaard-Mönch et al, 2001&2003).

Sans surprise, nous confirmons ici que la quantité de cellules immunocompétentes, comme les cellules T, B, NK et les monocytes, est significativement supérieure dans le SP stimulé par G-CSF et dans le greffon de CSP (Favre et al, 2003 ; Ottinger et al, 1996 ; Mills et al, 1996 ; To et al, 1997 ; Singhal et al, 2000). Nous confirmons également la plus grande proportion dans les prélèvements placentaires des cellules T CD4+, des cellules B transitionnelles, des lymphocytes B naifs et CD5+ (Theilgaard-Mönch et al, 2001 ; Marie-Cardine et al, 2008 ; Paloczi, 1999 ; Szabolcs et al, 2003) ainsi que des plus faibles quantités et proportions de cellules souches, de cellules T CD8+, de cellules T et B mémoires ainsi que de cellules régulatrices de l'immunité innée NKT dans ces mêmes prélèvements (Theilgaard-Mönch et al, 2001 ; Paloczi, 1999).

De manière plus intéressante, nous procurons ici de nouvelles comparaisons en ce qui concerne les cellules Tregs et les cellules dendritiques. Si nous confirmons une plus grande quantité et plus grande proportion de Tregs dans le sang placentaire comparé aux autres sources sanguines (Lopez et al, 2009), nous montrons néanmoins que la proportion de Tregs est comparable entre le greffon CSP et le greffon placentaire alors que la quantité de Tregs est 44 fois supérieure dans le greffon CSP. L'observation d'une moindre survenue de GVH après greffe placentaire est en partie liée au caractère naifs des cellules T du greffon comme exposé

dans les **Rappels Bibliographiques**. Néanmoins, la constatation d'une même proportion de Tregs contenus dans le greffon placentaire (vs le greffon CSP) pourrait également jouer un rôle à côté d'une activité fonctionnelle parfaitement mature des Tregs placentaires malgré un phénotype de type naïf (Takahata et al, 2004).

En ce qui concerne les cellules dendritiques, il semble que la proportion de mDCs vs pDCs soit plus importante dans le SP (Arpinati et al, 2000 ; Szabolcs et al, 2003 ; Ueda et al, 2003 ; Aldebert et al, 2007 ; Borrás et al, 2001) et dans la moelle (Arpinati et al, 2000), bien que la différence ne soit pas significative dans notre étude. Cette différence, significative ici uniquement dans le sang placentaire, comme déjà rapporté (Szabolcs et al, 2003 ; Ueda et al, 2003, Aldebert et al, 2007), concerne également le greffon placentaire après décongélation. Deux études anciennes (Sorg et al, 1999 ; Borrás et al, 2001) avaient retrouvé une prédominance de pDCs dans le sang placentaire mais ce résultat a pu être faussé par la non utilisation d'un marqueur spécifique des pDCs, comme BDCA-2 (Dzionek et al, 2000) ou par l'élimination des mDCs consécutive à la procédure technique (Ueda et al, 2003). La quantité et la proportion de mDCs sont plus importantes dans le sang placentaire comparé aux autres sources sanguines alors que l'inverse est retrouvé lorsque l'on considère la comparaison entre les greffons. Cette comparaison n'a en fait jamais été rapportée. On retrouve uniquement une comparaison entre SP et sang placentaire, montrant une quantité de mDCs plus importante dans le second cas (Szabolcs et al, 2003) ou une comparaison entre greffon de CSP et greffon médullaire, retrouvant une même proportion de mDCs (Arpinati et al, 2000). En ce qui concerne les pDCs, la comparaison entre SP et sang placentaire montre des résultats discordants dans la littérature avec soit une plus grande quantité et plus grande proportion dans le SP (Ueda et al, 2003 ; Hagendorens et al, 2003) ou l'inverse (Szabolcs et al, 2003). Dans notre étude, la même quantité et la même proportion de pDCs sont observées entre ces deux sources sanguines, alors que leur quantité est plus importante et leur proportion moins

élevée dans le SP stimulé par G-CSF. Plus significativement, la quantité et la proportion de pDCs dans le greffon placentaire sont considérablement diminuées en comparaison des autres sources de greffon (247 fois plus et 46 fois plus de pDCs en valeur absolue dans le greffon CSP et la moelle, respectivement). Ce déficit que l'on peut qualifier de caractéristique du greffon placentaire, associé au déficit quantitatif en cellules T et B mémoires, modifie probablement le devenir des patients après greffe de cordons. Ceci peut être objectivé par une augmentation des infections précoces après ce type de greffe (Parody et al, 2006 ; Chevallier et al, 2010). En effet, les pDCs jouent un rôle prépondérant dans la réponse aux infections virales, grâce à leurs récepteurs intracellulaires TLR7 et TLR9 et leur production massive d'interféron de type 1 (Cardenas et al, 2011). Nous étudierons les conséquences d'une infection des pDCs par HHV-6 dans la **Partie expérimentale IV**.

La quantité de pDCs transfusée au patient au moment de la greffe peut également influencer la survenue d'une GVH chronique ou la rechute, au moins lorsqu'on utilise un greffon médullaire (Walker et al, 2001). Ceci suggère que des composants cellulaires autres que les cellules souches ou les progéniteurs hématopoïétiques contenus dans les greffons jouent eux-aussi un rôle après greffe. Les cellules (hématopoïétiques, immunes, autres) qui émergent après la réalisation de la greffe sont connues pour dériver directement des cellules souches ou des progéniteurs hématopoïétiques. La prise de greffe est ainsi directement la conséquence de la migration de ces cellules dites primitives ou pluripotentes ou encore « lignée-engagée » dans la moelle du donneur. Cette migration est responsable du déclenchement d'un certain nombre de signaux qui conduisent à la reconstitution plus ou moins longue des cellules matures du sang (Theilgaard-Mönch et al, 2003 ; Liu et al, 2012). La quantité et la proportion de cellules souches et de progéniteurs varient en fonction du type de greffon, influençant directement la vitesse de reconstitution de ces cellules (Korbling et al, 2001 ; Theilgaard-Mönch et al, 2003 ; Paloczi, 1999 ; Liu et al, 2012 ; Mijovic et al, 2007).

Néanmoins, à côté des cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques, il existe également une autre partie du greffon composé de cellules dites « accessoires » ou « facilitantes » ou « non-migratrices » qui influencent également le devenir des patients (Korbling et al, 2001 ; To et al, 1997 ; Bonnet et al, 1999 ; Tanaka et al, 1999). La principale preuve de cette influence est démontrée par les conséquences de la manipulation du greffon, en particulier dans les cas où l'on a recours à une T-déplétion, qui a pour conséquence une incidence accrue de non prise ou de rechute après allogreffe (Talmadge, 2003). Plusieurs composants cellulaires ont été décrits comme des fractions accessoires dans des modèles murins uniquement. Bonnet *et al* décrivent ainsi une fraction cellulaire lin+CD34- et lin-CD34+CD38+ indispensable pour obtenir la prise de greffe (Bonnet et al, 1999). Ces cellules facilitant la prise de greffe agissent probablement en relarguant un certain nombre de cytokines pour permettre la bonne migration des cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques. D'autres fractions facilitantes sont décrites, telles que les cellules CD8+CD3+TCR-CD45+classII<sup>dim</sup> (Kaufman et al, 1994), les cellules CD8+TCR+/TCR- (Gandhi et al, 1999), les cellules T alpha/beta et gamma/delta (Huang et al, 2001) et, de façon plus surprenante, les cellules Tregs, les pre-pDCs, les cellules NK1.1+DX5+ ou CD19+ (Cardenas et al, 2011). Ces cellules accessoires peuvent aussi influencer le devenir des patients après greffe, par exemple en termes de survenue de GVH ou de chimérisme (Cardenas et al, 2011 ; Huang et al, 2001). Ainsi, nos résultats procurent une base pour étudier spécifiquement, en particulier chez l'homme, certains composants cellulaires, qui pourraient impacter le devenir post-greffe. Identifier une fraction cellulaire particulière pourrait conduire à manipuler le greffon afin, par exemple, de favoriser la prise de greffe ou de diminuer l'incidence des infections. Une des pistes pourrait être le déficit quantitatif en cellules T CD8+ ou pDCs observés dans le greffon placentaire.



Enfin, nous avons pu investiguer les effets sur la composition des greffons de la cytophérèse pour les SP stimulé par GCSF ou de la décongélation pour le sang placentaire. Dans le premier cas, la cytophérèse, comme attendu, est responsable d'un effet de concentration responsable d'un enrichissement de toutes les sous-populations étudiées (Mijovic et al, 2007). Dans le cas des prélèvements placentaires, la proportion médiane de chaque sous-population est comparable avant congélation et après décongélation, à l'exception de la fraction  $CD56^{dim}CD16^{neg}$  des cellules NK qui est retrouvée plus élevée dans le greffon placentaire. Il n'y a donc pas d'enrichissement des sous-populations cellulaires dans ce cas. Rajouté à la perte cellulaire observée après décongélation, ceci plaide pour une manipulation des greffons placentaires afin d'expandre si possible le nombre de cellules collectées mais aussi d'améliorer la prise de greffe et la migration des cellules souches vers la moelle du receveur (Petropoulou et al 2011).

En conclusion, notre étude montre des différences quantitatives importantes entre les trois types de greffons qui sont utilisés aujourd'hui pour une allogreffe. Les différences les plus notables sont le déficit en cellules T et B mémoires (connu) mais aussi en pDCs dans les greffons placentaires. Ces différences impactent sans nul doute le devenir des patients après greffe. Nous étudierons dans la **Partie expérimentale IV** les conséquences de l'infection HHV6 sur des pDCs humaines *in vitro* afin de voir si un comportement particulier se dégage de cette infection.

Le travail relatif à cette partie vient d'être accepté pour publication dans le journal Transfusion (voir **Annexe** en fin de volume).

## **Partie III** : Comparaison de l'expression cellulaire du CD46, récepteur membranaire du virus HHV-6, dans différentes sources sanguines et de greffons.

*Résumé : L'incidence accrue d'infections à HHV-6 après greffe de sang placentaire pourrait s'expliquer par une plus grande expression du récepteur membranaire du virus, le CD46, à la surface des progéniteurs hématopoïétiques d'origine placentaire. Dans cette troisième partie nous avons comparé par cytométrie en flux l'expression du CD46 entre trois sources sanguines d'un côté (sang périphérique (SP), SP stimulé par GCSF et sang placentaire, n=10 échantillons pour chaque) et trois sources de greffons d'autre part (moelle non manipulée n=5 ; greffon de CSP n=10 et greffon placentaire décongelé n=7) sur les populations cellulaires suivantes : lymphocytes totaux, monocytes, cellules NK, cellules T et B et sous-groupes, cellules dendritiques plasmacytoïdes et cellules souches. Comme attendu, toutes les populations sont retrouvées positives pour l'expression du CD46 qui est une molécule ubiquitaire. Nous avons donc considéré la MFI du CD46 pour les comparaisons. Le résultat le plus surprenant est le fait que cette MFI est de façon inattendue significativement diminuée sur presque toutes les populations cellulaires du greffon placentaire. L'expression du CD46 n'explique donc pas l'incidence accrue d'infections à HHV-6 après greffe de sang placentaire. Un autre récepteur, depuis longtemps suspecté, reste à découvrir qui pourrait expliquer ce phénomène.*

### **INTRODUCTION : La molécule CD46** (Ni Choileain & Astier, 2012).

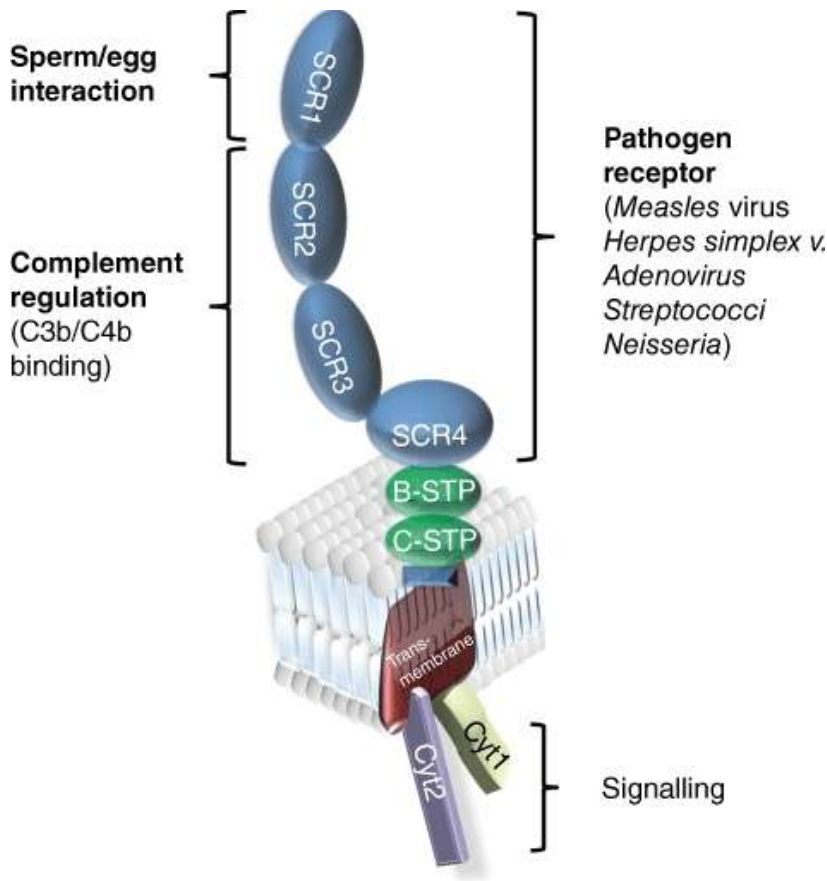
L'antigène de surface CD46 (ou MCP pour membrane cofactor protein) a été identifié comme un récepteur membranaire des deux espèces HHV-6 A et B en 1999 (Santoro et al, 1999). C'est le seul récepteur membranaire d'HHV-6 connu aujourd'hui mais on sait que certaines souches de l'espèce B utilise un autre récepteur (ou co-récepteur) pour pénétrer dans les cellules, du fait que les cellules exprimant le CD46 ne sont pas toutes permissives à HHV-6B (Santoro et al, 1999 ; Mori et al, 2002).

CD46 est une glycoprotéine de type 1 ubiquitaire présente sur toutes les cellules nucléées de l'organisme (Seya et al, 1986 ; Liszewski & Atkinson, 1992). Il appartient à la famille des régulateurs de l'activation du complément (RAC), tout comme le CD21 (récepteur membranaire de l'EBV), le CD55 (ou DAF pour decay-acceleratory factor, récepteur membranaire de plusieurs echovirus et de coxsackievirus), le CD59 (ou MIRL pour

membrane inhibitor of reactive lysis) ou le CD35 (ou CR1 pour complement receptor type 1) (Kim et al, 2006 ; Piccoli et al, 2011). Les protéines RAC sont codées par un ensemble de gènes rassemblés au niveau du chromosome 1 en 1q32 (Lublin et al, 1988). Elles semblent posséder des caractéristiques communes biologiques et structurelles, qui favorisent leur exploitation par les agents viraux en tant que récepteur cellulaire.

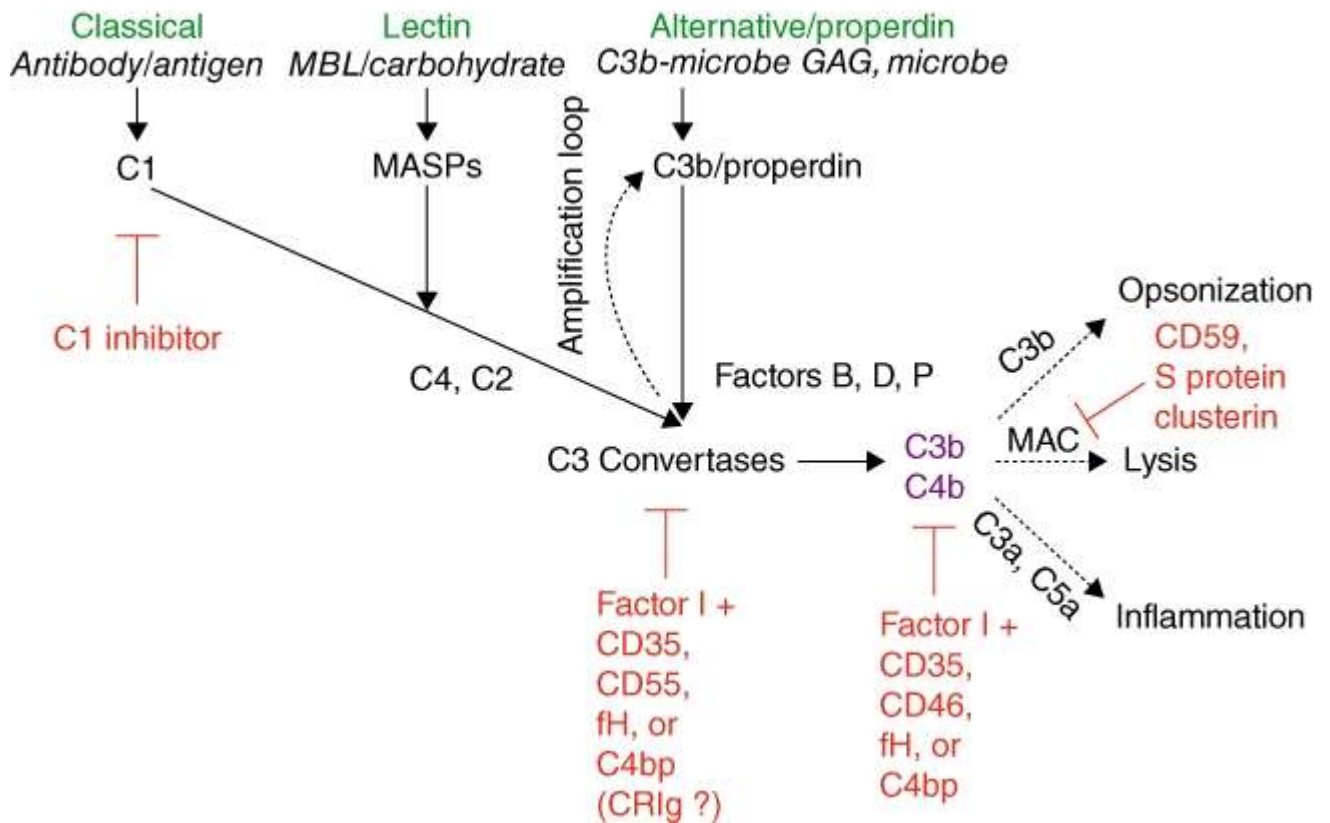
Le molécule CD46 (**Figure 16**) est composé : 1) d'un domaine extramembranaire qui comprend trois régions successives: la plus externe est composée elle-même de quatre courts domaines conservés (appelés SCR 1 à 4 pour short consensus repeats ou CCP pour complement control protein modules ou encore « sushi » domains) qui correspondent aux sites de liaison pour le complément ou les pathogènes (SCR1 est impliqué dans l'interaction entre les spermatozoïdes et l'ovule), puis on trouve une autre région appelée STP (car riche en sérine, threonine et proline) richement O-glycosylée qui est aussi un site de fixation pour les pathogènes (*Neisseria*), puis finalement une courte séquence de 12 acides aminés dont la fonction n'est pas connue ; 2) un domaine transmembranaire et 3) un domaine intracellulaire appelé tail (queue) ou Cyt (pour cytoplasme) impliqué dans la transmission du signal. Le gène du CD46 comporte 14 exons et 14 transcrits mais 4 isoformes principalement sont exprimées : C1/Cyt1 ; C2/Cyt2 ; BC1/Cyt1 et BC2/Cyt2. Certains organes peuvent exprimer préférentiellement un isoforme plutôt qu'un autre comme les testicules ou le cerveau (isoformes Cyt2) ou le rein et les glandes salivaires (isoformes BC).

**Figure 16:** Représentation de la molécule CD46 (d'après Cardone et al, 2011).



La principale fonction du CD46 est de prévenir l'activation spontanée ou l'attaque du complément contre les cellules autologues de l'organisme. Le complément est un ensemble de 35 protéines circulantes (incluant le CD46 soluble) impliquées dans l'immunité innée contre les pathogènes. Certaines de ces protéines agissent directement dans les mécanismes d'élimination des pathogènes (protéines C1, C2, ect) alors que les autres (incluant le CD46) régulent l'activité des premières pour prévenir une réaction auto-immune. Le CD46 inhibe ainsi l'activation des protéines C3b et C4b du complément en favorisant leur clivage par le facteur 1 (**Figure 17**).

**Figure 17:** Activation et régulation du Complément (d'après Cardone et al, 2011). Les trois voies d'activation du complément sont la voie dite classique, la voie des lectines et la voie alterne.



CD46 a été dénommé « l'aimant à pathogène » (Cattaneo et al, 2004). En effet, il est le récepteur membranaire d'au moins 7 pathogènes dont des virus et des bactéries: HHV-6, la souche vaccinale du virus de la rougeole, les adénovirus de groupe A et B, le streptocoque A et *Neisseria meningitidis* et *gonorrhoeae*. La fixation du pathogène sur le CD46 induit en général une inhibition de son expression à la surface de la cellule (soit par internalisation ou relargage d'une forme soluble) (Naniche et al, 1993 ; Gill et al, 2003 ; Sakurai et al, 2007 ; Lovkvist et al, 2008 ; Mahtout et al, 2009). Cette régulation négative du CD46 est observée également avec HHV-6 au niveau cellulaire (Secchiero et al, 1997 ; Santoro et al, 1999) ou tissulaire (amygdale) (Grivel et al, 2003). Elle permet aux protéines du complément

impliquées dans la lyse cellulaire (complexe MAC) de ne pas être inhibées par le CD46, permettant ainsi la lyse des cellules infectées. Ce mécanisme de défense de l'hôte peut être contourné par les cellules tumorales et certaines montrent au contraire une sur-expression du CD46 ou d'autres protéines régulatrices du complément, ce qui a pour conséquence d'inhiber l'action du complément contre elles (Geis et al, 2010). HHV-6 peut également se fixer à la forme soluble du CD46 (Fogdell-Hahn et al, 2005 ; Soldan et al, 2001). Les sites de fixation du virus sont les domaines SCR2 et SCR3 du CD46 et les sites de fixation au niveau du CD46 sont en fait différents d'un pathogène à l'autre (Greenstone et al, 2002). La encore la fixation du virus sur le CD46 soluble empêche sa fonction d'inhibition du complément qui peut donc agir pour la lyse des cellules infectées. On comprend mieux dès lors que les molécules inhibitrices du complément sont largement exprimées et sont en majorité aussi des récepteurs aux pathogènes. Leur baisse d'expression ou la capacité des pathogènes à se fixer sur leur forme soluble permet alors au complément de ne pas être inhiber et de jouer parfaitement son rôle dans l'élimination des cellules infectées (Zipfel et al, 2009).

Le CD46 joue également un rôle non négligeable dans la réponse immunitaire adaptative. Le CD46 agit en fait comme une molécule de co-stimulation pour la transmission du signal via le complexe CD3/récepteur T à l'antigène (TCR) du lymphocyte T (Astier et al, 2000). Néanmoins, ce rôle reste complexe car il a été montré qu'en fonction de l'isoforme du CD46, le profil d'activation du lymphocyte T pouvait être différent (Marie et al, 2002 ; Ni Choileain et al ; 2012). De plus, l'activation du CD46 peut conduire chez des sujets normaux à une transformation du profil Th1 en profil Tr1, correspondant à la différenciation des lymphocytes T4 en cellules T régulatrices productrices d'IL10, une protéine anti-inflammatoire. Cette différenciation est dépendante du milieu et de la concentration en IL-2 (Kemper et al, 2003 ; Cardone et al, 2010). En pathologie humaine, cette capacité de différenciation Th1 en Tr1 induite par le CD46 est défectueuse chez les patients souffrant d'une sclérose en plaques

(Astier et al, 2006), d'un asthme (Xu et al, 2010) ou d'une polyarthrite rhumatoïde (Cardone et al, 2010). On constate chez eux un déficit de production en IL-10 et donc un profil inflammatoire marqué. Pour revenir à HHV-6, un moyen pour le virus de contrecarrer l'activation du lymphocyte T après sa fixation cellulaire, est d'entraîner une baisse d'expression du complexe CD3/récepteur T pour l'antigène à la surface des lymphocytes T (Lusso et al, 1991a; Furukawa et al, 1994). Le CD46 modulerait aussi la réponse immunitaire humorale (Jabara et al, 2011).

Le CD46 étant le récepteur du virus HHV-6, nous avons donc voulu comparer son expression au niveau des différentes populations cellulaires présentes dans les différentes sources sanguines ou de greffons étudiées dans la **Partie expérimentale II**. Pour expliquer l'accroissement de la fréquence des infections à HHV-6 après greffe de sang placentaire, on pourrait logiquement s'attendre à une plus grande expression du CD46 sur une ou des populations cellulaires de ce type de greffon.

### **MATERIELS et METHODES :**

La collection des greffons a été décrite dans la **Partie expérimentale II** ainsi que la méthode d'analyse en cytométrie de flux des différentes populations cellulaires étudiées : lymphocytes totaux, monocytes, cellules NK, lymphocytes T et B et sous-groupes, cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) et cellules souches hématopoïétiques. L'expression du CD46 et l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) du CD46 a nécessité l'utilisation de l'anticorps CD46-FITC (Beckton Dickinson) et du contrôle isotypique IgG-FITC (**Figure 18**). Néanmoins comme l'anticorps lin (qui sert à la reconnaissance des cellules dendritiques) et le CD46 étaient tous les deux conjugués au FITC, l'expression du CD46 sur les pDCs a été évaluée en considérant uniquement la population DR(+)/BDCA-2(+)/CD123(+). En effet, notre étude de cytométrie a montré que la population lin(-)/DR(+)/BDCA-2(+)/CD123(+)

était équivalente, en termes de pourcentage médian, à la population DR(+)/BDCA-2(+)/CD123(+) sur toutes les différentes sources sanguines et de greffons étudiées. Les analyses statistiques ont été réalisées par Lucie Planche, statisticienne au PIMESP du CHU de Nantes en utilisant deux tests non paramétriques (test de Kruskal-Wallis et test de Wilcoxon). Les trois sources sanguines (sang périphérique (SP), SP stimulé par G-CSF et sang placentaire) ont été comparées entre elles, de même que les trois sources de greffons (moelle osseuse non manipulée, cellules souches du sang périphérique (CSP), greffon placentaire décongelé). Les sources sanguines et leurs greffons respectifs (sang versus greffon placentaires, SP stimulé par G-CSF versus CSP) ont également été comparés. Une valeur de p inférieure à 0.05 a été considérée comme statistiquement significative et toutes les analyses ont été réalisées avec l'outil SAS 9.1 (SAS Institute Inc., SAS Campus Drive, Cary, NC, USA).

## **RESULTATS :**

L'expression du CD46 est de 100% sur chaque population cellulaire analysée dans cette étude. L'ensemble des contrôles isotypiques ayant une intensité de fluorescence aux alentours de 100 pour chaque population analysée, nous avons donc pris en compte uniquement l'intensité globale de fluorescence du CD46 pour réaliser les comparaisons et non pas des ratios de fluorescence. Les résultats des MFI pour les différents types cellulaires sont présentés dans le **Tableau 12** et la **Figure 19**.

Considérant les sources sanguines, la MFI du CD46 est retrouvée identique sur les lymphocytes T et les sous-groupes CD4-/CD8+ et CD4-/CD8-, sur les cellules NKT et T régulatrices, les cellules B mémoires, les pDCs et les cellules souches CD34+. On retrouve par contre une MFI du CD46 significativement plus faible sur les cellules T CD4+/CD8- et CD4+/CD8+, les cellules B transitionnelles, les lymphocytes B totaux et B naïfs, les cellules

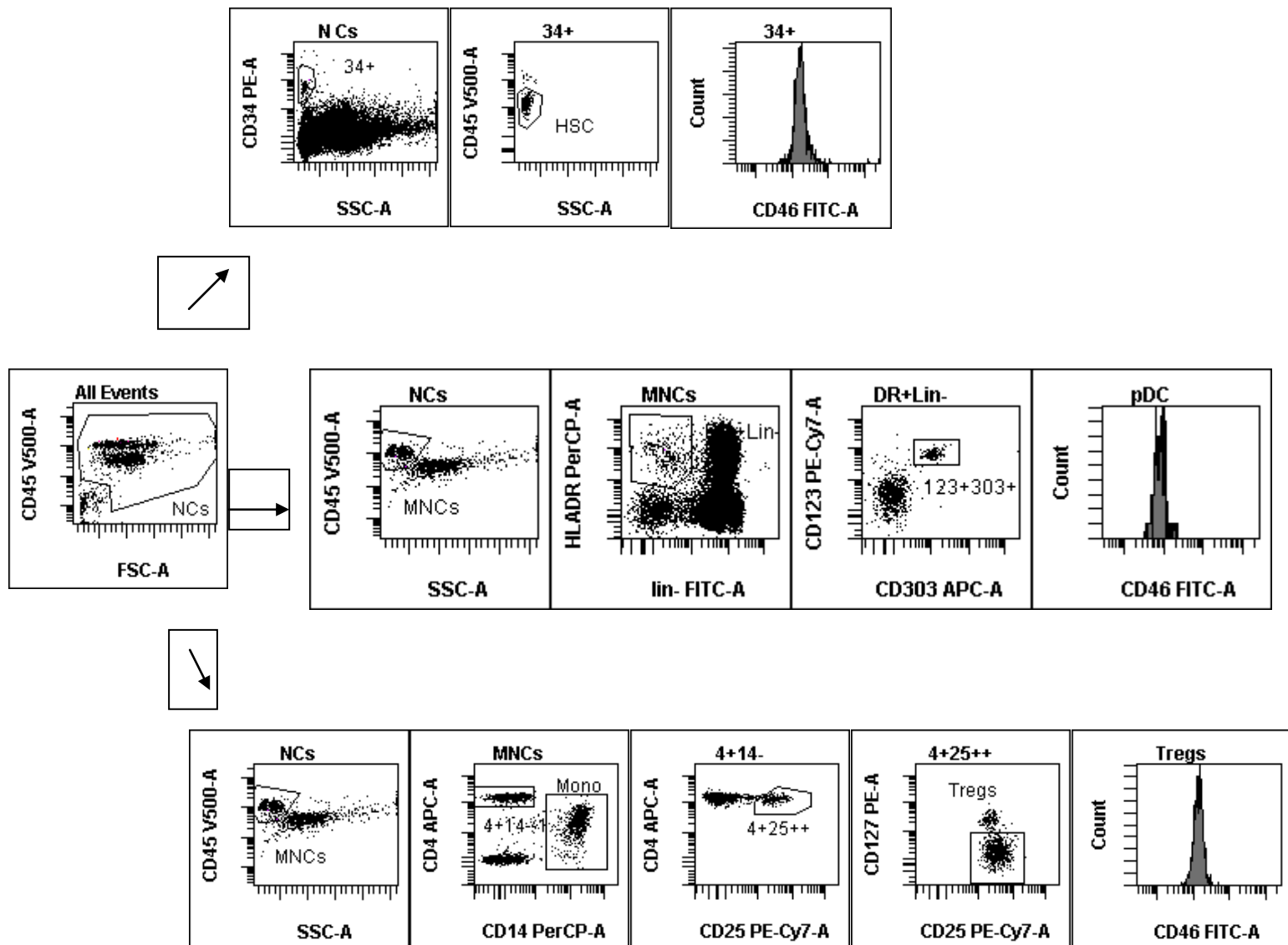


NK des sangs placentaires. La MFI du CD46 est à l'inverse significativement plus élevée sur les monocytes de sang placentaire. La valeur de MFI du CD46 la plus haute est observée sur les monocytes des sangs placentaires alors qu'elle est retrouvée la plus élevée sur les cellules T double positive CD4+/CD8+ du SP et du SP stimulé par G-CSF. Nous montrons également que l'expression du CD46 est plus importante, premièrement, sur les lymphocytes T par rapport aux lymphocytes B et NK et, deuxièmement, qu'elle est également plus élevée sur les lymphocytes T CD4+/CD8- par rapport aux lymphocytes T CD4-/CD8+, au sein de chaque source sanguine.

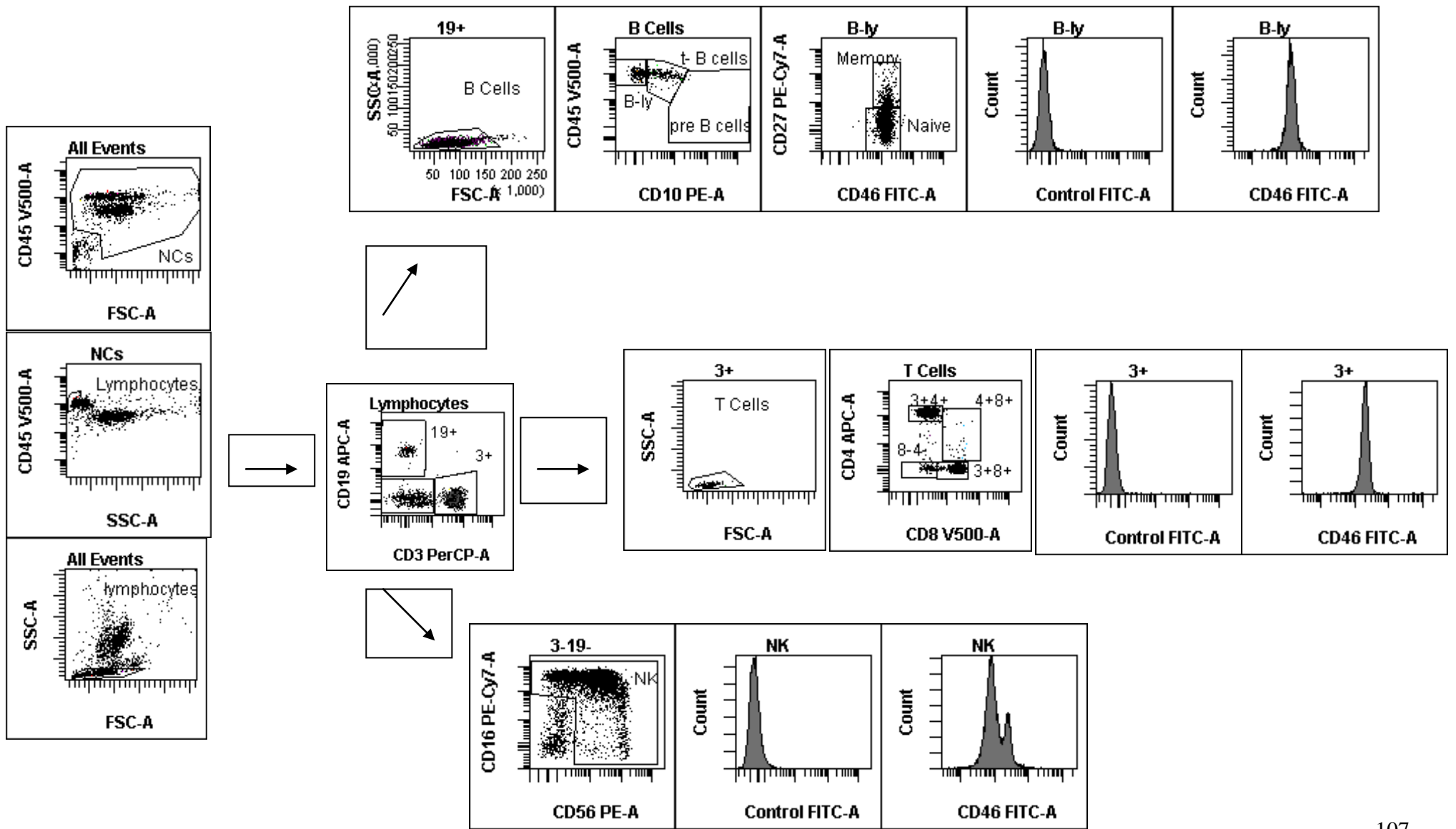
Considérant les trois sources de greffon, l'expression du CD46 est la même uniquement sur les lymphocytes T double négatif CD4-CD8- et les cellules NKT. La MFI du CD46 est par contre retrouvée significativement plus faible pour toutes les autres populations cellulaires des sangs placentaires, à l'exception des monocytes. Les plus forts niveaux d'expression concernent les monocytes pour les sangs placentaires et les moelles non manipulées, et les lymphocytes T double positifs pour les greffons de CSP. De même qu'avec les sources sanguines, nous avons pu mettre en évidence que la MFI du CD46 la plus élevée est retrouvée sur les lymphocytes T par rapport aux lymphocytes B et NK au sein des trois sources de greffon. Également, la MFI du CD46 est toujours retrouvée plus importante sur les lymphocytes T CD4+/CD8- par rapport aux lymphocytes T CD4-/CD8+ pour toutes les sources de greffon.

Lorsque l'on compare le SP stimulé par G-CSF et le greffon de CSP obtenu après cytophérèse, on constate que la MFI du CD46 n'est modifiée sur aucune des populations cellulaires étudiées, à l'exception des lymphocytes B naïfs et mémoires, les cellules NK, et les pDCs où elle est retrouvée significativement augmentée après cytophérèse. Lorsque l'on compare le sang placentaire et le greffon placentaire décongelé, la MFI du CD46 diminue significativement sur toutes les populations cellulaires du greffon.

**Figure 18:** Un exemple d'analyse FACS du CD46 sur différentes populations cellulaires.



**Abréviations :** NCs: cellules nucléées; MNCs: cellules mononucléées; Ly: lymphocytes; HSC: cellules souches; pDCs: cellules dendritiques plasmacytoïdes; Mono: monocytes; Tregs: cellules T régulatrices; t B cells: cellules B transitionnelles.



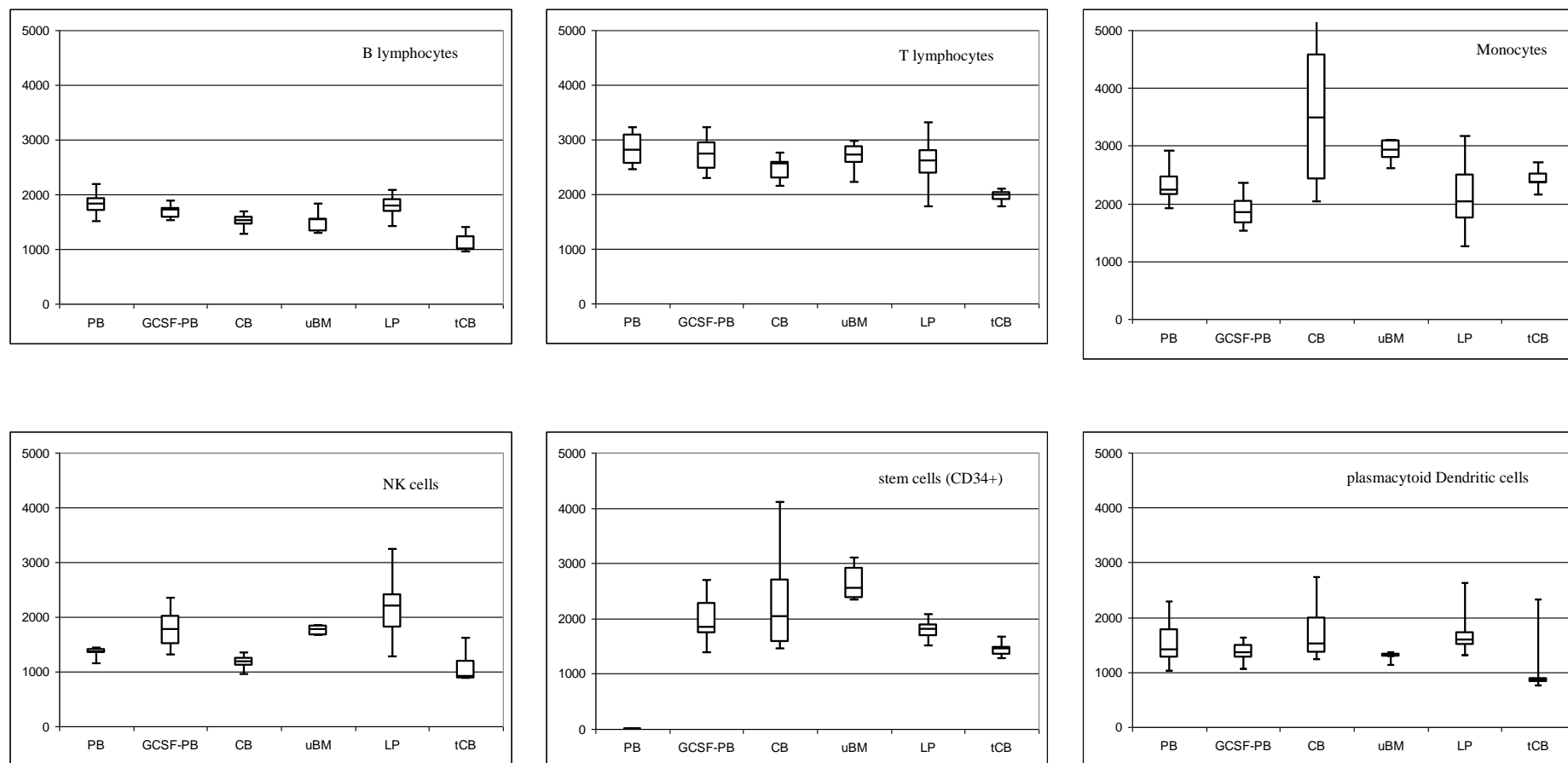
**Tableau 12:** Comparaison des MFI du CD46 (valeur absolue) au niveau des populations cellulaires de trois sources sanguines et trois sources de greffons différentes.

Sources sanguines	MFI (écart)			P
	SP [n=10] (1)	GCSF-SP [n=10] (2)	CORDON [n=10] (3)	
Monocytes	2234 (1902-2904)	1842 (1528-2350)	3486.5 (2026-6639)	0.0002
Cellules T	2796 (2450-3222)	2735 (2292-3213)	2551 (2142-2747)	NS
CD4+/CD8-	2874 (2502-3520)	2878 (1858-3249)	2585 (2138-2791)	0.01 <sup>1:2</sup>
CD4-/CD8+	2749 (2185-3300)	2537 (2065-3258)	2461 (1937-2666)	NS
CD4+/CD8+	3330 (2648-3578)	3197 (2289-3836)	2069 (1697-2670)	0.0001 <sup>1:2</sup>
CD4-/CD8-	2223 (1509-2614)	2346 (1902-3248)	2323 (1611-2771)	NS
NKT	2358 (1753-2850)	2549 (1493-3337)	2361 (1947-2956)	NS
T regs	2129 (1874-2588)	2174 (1842-2413)	1955 (1473-2359)	NS
Cellules B Trans	1725 (1378-2173)	1500 (1090-2140)	1343 (1190-1781)	0.02 <sup>2:3</sup>
Lymphocytes B	1816 (1492-2184)	1722 (1512-2272)	1514 (1141-1678)	0.01 <sup>1:2</sup>
Lym b naifs	1671 (1472-1864)	1538 (1361-1954)	1461 (1160-1742)	0.02 <sup>1:2</sup>
Lym B mémoires	1831 (1607-2279)	1782 (1617-2245)	1940 (1720-2560)	NS
Cellules NK	1360 (1144-1517)	1762 (1300-2333)	1185 (942-1500)	0.0005
pDCs	1400 (1016-2271)	1349 (1051-1614)	1504 (1219-2726)	NS
Cellules souches	0% par définition	1840 (1377-2685)	2026 (1453-4102)	NS
<b>Greffons</b>	<b>Moelle</b> [n=5] (1)	<b>CSP</b> [n=10] (2)	<b>Cordon décongelé</b> [n=7] (3)	
Monocytes	2926 (2604-3094)	2028 (1246-3153)	2371 (2149-2710)	0.02 <sup>2:3</sup>
T cells	2711 (2220-2972)	2600 (1768-3307)	1985 (1773-2081)	0.005
CD4+/CD8-	2916 (2415-3124)	2600 (1553-3323)	2037 (1782-2118)	0.005
CD4-/CD8+	2512 (2119-2836)	2517 (1923-3255)	1888 1712-2024)	0.001 <sup>1:2</sup>
CD4+/CD8+	2375 (1565-3013)	3305 (2502-5212)	1862 (1686-3115)	0.0008 <sup>1:3</sup>
CD4-/CD8-	2225 (1807-2598)	2205 (1069-3248)	1685 (1538-2315)	NS
NKT	2440 (1858-2990)	2293 (1755-3359)	2060 (1197-3324)	NS
T regs	1932 (1759-2434)	2063 (1491-2607)	1273 (1159-1561)	0.001
Cellules B Trans	1028 (932-1687)	1419 (1055-1735)	925 (808-1268)	0.006
Lymphocytes B	1420 (1283-1821)	1794 (1418-2073)	999 (955-1400)	0.0005
Lym B naifs	1472 (1198-1644)	1833 (1331-1939)	1000 (836-1377)	0.0008
Lym B mémoires	1691 (1527-2022)	2040 (1492-2522)	1324 (1170-1643)	0.004
Cellules NK	1764 (1655-2170)	2197 (1267-3224)	909 (871-1609)	0.0007
pDCs	1312 (1116-1352)	1585 (1305-2615)	861 (749-2311)	0.005
Cellules souches	2549 (2327-3099)	1795 (1507-2071)	1443 (1271-1665)	0.0002

**Abréviations:** SP:sang périphérique; GCSF-SP: SP après stimulation par GCSF; NS: non significatif, trans: transitionnelles; lym: lymphocytes; NK: natural killer; pDCs: cellules dendritiques plasmacytoïdes; Tregs: cellules T régulatrices ; MFI : intensité moyenne de fluorescence. CSP : greffon de cellules souches périphériques.

<sup>1:2</sup> : p >0.05 lorsque comparaison SP vs GCSF-SP ou moelle vs CSP; <sup>2:3</sup> : p >0.05 lorsque comparaison GCSF-SP vs sang de cordon ou CSP vs greffon placentaire. <sup>1:3</sup>: p >0.05 lorsque comparaison Moelle vs greffon placentaire.

**Figure 19:** Expression du CD46 (exprimé en MFI) au niveau des populations cellulaires de trois sources sanguines et trois sources de greffons différentes.



Abréviations : PB : peripheral blood ou sang périphérique ; GCSF-PB : sang périphérique stimulé par G-CSF ; CB : cord blood, uBM : unmanipulated bone marrow ; LP : leukapheresis product ou greffon CSP ; tCB : thawed cord blood ou greffon placentaire décongelé. La MFI est indiquée en abscisses et exprimée en unité de fluorescence.

## **DISCUSSION et PERSPECTIVES:**

Cette étude prospective a permis d'étudier l'expression du CD46 sur un grand nombre de populations cellulaires et de déterminer les différences qu'il pouvait y avoir entre plusieurs sources sanguines et de greffons. De manière tout-à-fait intéressante, il faut rappeler que nous avons considéré l'étude des greffons tels qu'ils sont transfusés chez les patients en pratique clinique.

Sans surprise, le premier résultat est la confirmation de l'expression ubiquitaire du CD46. Il est en effet exprimé dans 100% des cas par toutes les cellules étudiées ici. Il n'en reste pas moins que certaines différences en termes de MFI apparaissent distinctement au sein de cette étude. La MFI du CD46 est retrouvée significativement diminuée sur quasiment toutes les populations cellulaires du greffon placentaire en comparaison de la moelle et du greffon de CSP. De plus, on constate que cette MFI diminue systématiquement après décongélation du greffon en comparaison du sang placentaire alors qu'une telle diminution n'est pas observée entre le sang stimulé par G-CSF et le greffon de CSP après cytophérèse.

A notre connaissance, une seule étude à ce jour (Thulke et al, 2006) a mené une comparaison de l'expression du CD46 entre différentes sources cellulaires et sur un faible nombre d'échantillons. Celles-ci incluaient du SP (n=6), du sang placentaire (n=6) et un greffon de CSP (n=4) pour une comparaison qui ne reflète pas la véritable situation d'administration des greffons en pratique clinique. Par ailleurs, l'expression du CD46 était quantifiée à l'aide d'un anticorps anti-CD46 non pas de type FITC comme dans notre étude mais de type PE, en utilisant de plus une calibration de billes conjuguées à ce fluorochrome avec un ratio de PE connu par bille. Néanmoins, notre approche bien que non quantitative stricto sensu, produit des résultats assez comparables dans la mesure où la valeur de la MFI est le reflet d'une plus grande ou plus faible présence de l'antigène considéré à la surface des cellules. Nous avons pu ainsi confirmer la plus forte expression du CD46 sur les cellules souches CD34+ sur le SP

en comparaison du greffon de CSP ou encore la plus grande expression du CD46 sur les lymphocytes T CD4+ par rapport aux lymphocytes T CD8+ pour chaque source cellulaire.

Notre étude est la première à comparer l'expression du CD46 entre greffon placentaire et greffon de CSP. Nous montrons ici que l'expression du CD46 est significativement diminuée non seulement sur les cellules souches CD34+ mais sur quasiment tous les autres types cellulaires dans le sang placentaire. Sauf à envisager des différences structurelles ou d'isoformes du CD46 au sein des populations entre le greffon de CSP et le greffon placentaire, hypothèse peu probable, le CD46 ne semble donc pas être le facteur expliquant la plus grande réactivation de HHV-6 après greffe de sang placentaire. D'autres facteurs doivent jouer un rôle comme le plus grand pourcentage de lymphocytes T CD4+ observé dans les greffons placentaires (voir **Partie expérimentale III**) puisque les CD4 sont la cible principale de HHV-6 (Dockrell, 2003 ; Lusso, 2006). Néanmoins les lymphocytes CD4+ (comme les CD8+) ont été décrits potentiellement comme la cible également du CMV, dont nous avons montré que la réactivation était comparable après greffe de CSP et greffe de sang placentaire (Schrier et al, 1985 ; Crough & Khanna, 2009).

Une deuxième explication, déjà évoquée plus haut, serait l'existence d'un autre récepteur pour l'espèce HHV-6B (la seule espèce retrouvée quasiment après transplantation), qui serait exprimé de manière plus importante sur les cellules des greffons placentaires. Ce deuxième récepteur n'a pas encore été mis en évidence. Il ne s'agit pas du CD4 (Lusso et al, 1989). On peut penser que ce récepteur soit par nature ubiquitaire lui-aussi pour répondre aux différentes infections de l'organisme et qu'il soit impliqué également dans l'immunité innée ou adaptative de l'hôte. La comparaison de l'expression des protéines régulant le complément sur les différentes populations cellulaires des différents greffons représente une piste possible. Il a également été évoqué qu'un des facteurs de réactivation de HHV-6B serait l'infection à HHV-7, qui précéderait celle d'HHV-6, pour disparaître ensuite sous le contrôle de la

réplication virale d'HHV-6 (Katsafanas et al, 1996). Il serait intéressant là encore de comparer la survenue de l'infection à HHV-7 après greffe de CSP et greffe de sang placentaire pour voir si il existe ou non une fréquence accrue de cette infection après ce dernier type de greffe. On sait également qu'HHV-6 non seulement renforce l'expression du CD4 sur les lymphocytes T CD4+ (Flamand et al, 1998) mais induit aussi l'expression de cette molécule après infection sur un certain nombre de cellules comme les lymphocytes T CD8+ (Lusso et al, 1991b), les cellules NK (Lusso et al, 1993) les lymphocytes T gamma/delta CD4- (Lusso et al, 1995) ou les progéniteurs hématopoïétiques (Vignoli et al, 2000). Or, le CD4 est le récepteur membranaire de HHV-7 (Lusso et al, 1994). Le tropisme cellulaire de HHV-7 reste peu connu mais est dépendant de l'expression du CD4 (Secchiero et al, 1994 ; Black et al, 1997). On peut penser que l'induction du CD4 par HHV-6 favoriserait à nouveau l'infection à HHV-7 qui a son tour renforcerait l'infection à HHV-6.

Une troisième hypothèse est représentée par la plus faible quantité et la plus faible proportion de pDCs observées dans les greffons placentaires (voir **Partie expérimentale II**). En effet les pDCs sont les cellules impliquées directement dans la défense antivirale de l'organisme par sécrétion massive d'interféron de type 1 (Liu, 2005). Néanmoins, l'incidence des infections à CMV est comparable entre greffe de sang placentaire et greffe de CSP (voir **Partie expérimentale I**), il faut donc trouver une autre explication. La piste des pDCs pourrait rester la bonne dans la mesure où les pDCs ne sont pas permissives au CMV (Varani et al, 2007) alors qu'il semble qu'elles le soient pour HHV-6 (Takemoto et al, 2009). Nous avons voulu ainsi étudier dans une quatrième partie l'infection *in vitro* des pDCs humaines par la souche HHV-6B HST.

Le travail relatif à cette partie vient d'être accepté pour publication dans Journal of Clinical Virology (voir **Annexe** en fin de volume).



## **PARTIE IV : Essais *in vitro* d'infection de cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) humaines périphériques par la souche virale HHV-6B HST : résultats préliminaires.**

*Résumé : Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) sont spécialisées dans la production d'interféron (IFN) de type 1 et jouent donc un rôle primordial dans la réponse immunitaire antivirale. A notre connaissance aucune étude portant sur le comportement des pDCs vis-à-vis de l'HHV-6 n'a été conduite jusqu'à ce jour. L'objectif de cette quatrième et dernière partie a été d'une part d'étudier l'interaction pDCs/HHV-6 sur un plan phénotypique et fonctionnel et d'autre part de caractériser la permissivité des pDCs pour ce virus. Nous avons réalisé des essais d'infection *in vitro* de pDCs triées par sélection négative à partir de sang périphérique de 6 donneurs sains. Ces essais ont été conduits en utilisant une souche virale d'HHV-6B (souche HST), et différentes conditions ont été testées : infection par du milieu sans virus (témoin), infection par la souche HHV-6B aux concentrations de  $10^2$  et  $10^3$  copies/pDCs et infection par une souche d'HHV-6B inactivée par ultraviolets. Nous montrons que sur le plan phénotypique, l'HHV-6B induit à H72 de la culture une modulation de l'expression du CD80 et du CD86 au niveau des pDCs. En effet on constate un niveau d'expression plus faible de ces deux molécules en présence du virus, inactivé ou non. On note par contre une augmentation d'expression des molécules HLA classe I et II et du CD46 pour toutes les conditions testées. On constate également une stimulation importante dès H24 de la sécrétion d'IFN alpha par le virus, sécrétion qui est cependant moins marquée avec le virus inactivé. Les résultats de PCR ne nous permettent pas pour le moment de conclure sur la permissivité des pDCs vis-à-vis de HHV-6. Nos résultats montrent que comme le CMV, l'EBV ou HHV-8, HHV-6 peut induire des modifications phénotypiques et fonctionnelles des pDCs humaines.*

### **INTRODUCTION :**

Nous avons vu dans la **Partie expérimentale II** que les greffons placentaires étaient caractérisés par un déficit quantitatif en cellules T et B mémoires mais aussi en cellules pDCs. Ces déficits peuvent en partie expliquer l'incidence accrue d'infections notées après greffe de sang 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 l'incidence des infections à CMV, un virus proche de HHV-6, est comparable après greffe de sang placentaire et greffe de CSP (Chevallier et al, 2010). Ceci peut traduire par contre un déficit de contrôle immunologique touchant spécifiquement l'HHV-6. Une des hypothèses

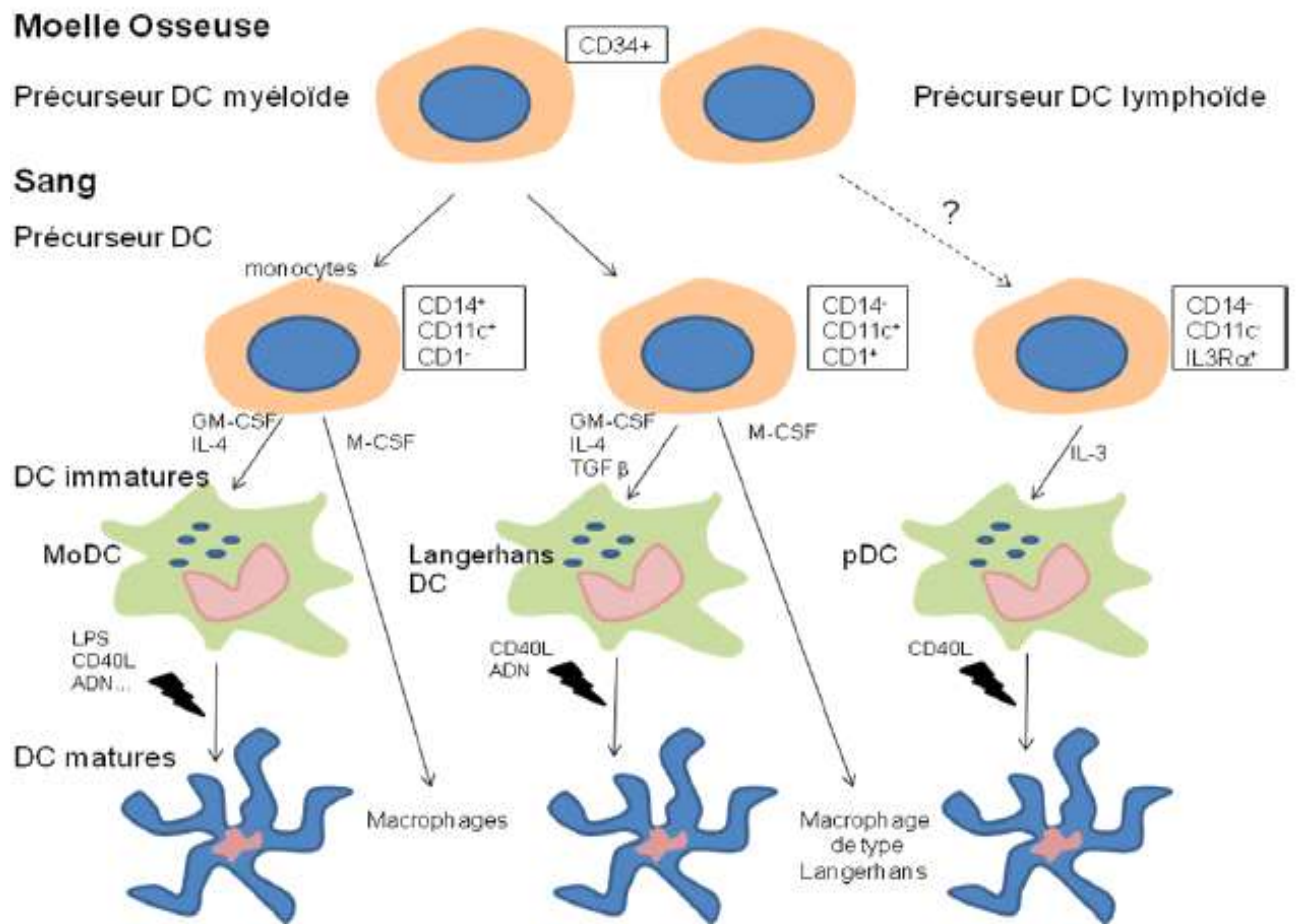
pour expliquer ce déficit spécifique est représentée par le fait que les pDCs ne sont pas permissives au CMV (Varani et al, 2007) et à l'EBV (Fiola et al, 2010) alors que cette propriété existerait pour HHV-6, avec pour conséquence le contrôle des pDCs par le virus. En fait, un seul papier évoque cette permissivité (Takemoto et al, 2009). Nous avons donc voulu tester les conséquences d'une infection HHV-6 sur des pDCs humaines *in vitro*.

*Cellules dendritiques plasmacytoïdes humaines (Liu, 2005 ; McKenna et al, 2005 ; Reizis et al, 2010).*

Les cellules dendritiques, qui ont une origine médullaire, sont des cellules professionnelles présentatrices d'antigènes (CPA) pour les lymphocytes T. Leur rôle est primordial dans la réponse immunitaire. Elles se distinguent par leur localisation dans l'organisme, leur stade de maturation et leur fonction (Banchereau & Steinman, 1998). On distingue deux types de cellules dendritiques : les cellules dendritiques monocytoïdes ou mDCs ou DC de type 1, dérivant de précurseurs myéloïdes et les cellules dendritiques plasmacytoïdes ou pDCs ou DC de type 2, dérivant de précurseurs lymphoïdes. (**Figure 20**). Les mDCs comprennent plusieurs sous-groupes : les cellules de Langherhans, les cellules dérivant des monocytes, les mDCs du derme ou des tissus interstitiels. Nous nous intéresserons ici uniquement aux pDCs en rapportant cependant les différences principales entre mDCs et pDCs.

Les pDCs ont été formellement identifiées en 1999 (Siegal et al, 1999 ; Cella et al, 1999) bien qu'elles aient été reconnues dès 1958 (Lennert & Remmele). Leur nom a changé plusieurs fois. Le terme de plasmacytoïde vient du fait que morphologiquement elles ressemblent à des plasmocytes. Il s'agit de cellules spécialisées, qui ont pour caractéristique de produire en grande quantité de l'interferon de type 1 (alpha et bêta) après une infection virale. Les pDCs représentent moins de 1% des cellules mononuclées du sang périphérique.

**Figure 20:** Ontogénie des cellules dendritiques humaines.



Il existe des différences nettes quantitatives (en valeur absolue et en pourcentage) lorsque l'on compare la composition en pDCs de différentes sources sanguines ou de greffons comme rapporté dans la **Partie expérimentale II** de cette thèse (**Tableau 13**).

**Tableau 13:** Composition en pDCs de différentes sources sanguines et de greffons (d'après Chevallier et al, 2012).

	Médianes/Cellules nucléées
<b>Sources sanguines</b>	P<0.01 (SP=SC)
Sang Périphérique (SP)	0.13% (7.5/ $\mu$ L)
SP stimulé par GCS-F	0.07% (31.5/ $\mu$ L)
Sang de Cordon (SC)	0.11% (9.5/ $\mu$ L)
<b>Greffons</b>	P<0.01
Moelle non manipulée	0.19% (0.5 $10^6$ /Kg du receveur)
CSP	0.31% (2.47 $10^6$ /Kg du receveur)
Cordon	0.07% (0.01 $10^6$ /Kg du receveur)  Ratio valeur absolue CSP/Cordon : 247

### *Origine*

Les pDCs sont produites de façon continue dans la moelle osseuse. Elles dérivent d'un progéniteur hématopoïétique commun aux deux types de précurseurs des cellules dendritiques myéloïdes et lymphoïdes. Ce progéniteur exprime des récepteurs aux cytokines comme le fms-like kinase 3 (FLT3 ou CD135) et le monocyte-colony-stimulating factor receptor (M-CSFR ou CD115) tout en exprimant faiblement le récepteur du stem cell factor (c-kit ou CD117). L'interaction entre le FLT3 ligand et son récepteur FLT3 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 FLT3-ligand chez 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 FLT3 entraîne une diminution importante du taux de pDCs. Les mDCs sont aussi dépendantes du FLT3 ligand mais à un moindre niveau. *In vitro*, le FLT3 ligand induit une expansion du

progéniteur commun aux cellules dendritiques, mais une fois les pDCs engagées dans leur différenciation, leur capacité de prolifération diminue (Naik et al, 2007), ce qui explique en partie que l'on ne puisse pas expandre les pDC *in vitro* via le FLT3 ligand. 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). Il a en effet été montré que l'absence de cette protéine dans les progéniteurs hématopoïétiques est responsable d'une absence complète en pDCs chez l'animal (Cisse et al, 2008). L'augmentation d'expression de la protéine E2-2 par les progéniteurs hématopoïétiques entraîne une différenciation accrue en pDCs. 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 également riches en protéine E2-2 et pauvre en protéine Id2. L'absence de protéine E2-2 dans les pDCs entraîne leur différenciation en mDCs, ce qui témoigne de leur plasticité éventuelle et de l'origine commune de ces deux types de cellules dendritiques (Ghosh et al, 2010).

Après leur développement dans la moelle, les pré-pDCs, qui expriment très fortement le CD123 (récepteur à l'interleukine-3), passent dans le sang périphérique, et, sous l'action de l'interleukine-3, se différencient en pDCs immatures. Elles migrent ensuite dans les zones riches en cellules T des organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions, thymus, tissu lymphoïde associé aux muqueuses). Cette migration est associée à l'expression de deux chémokines principales: CD62L et à CCR7.

*Caractéristiques phénotypiques (Dzionek et al, 2000; Mc Donald et al, 2002).*

Les cellules dendritiques sont définies sur le plan phénotypique par l'expression du CD45 (exprimé par toutes les cellules nucléées), de la molécule HLA classe II DR et l'absence d'expression de marqueurs T, B, NK et myéloïdes (population cellulaire lin<sup>-</sup>). Il existe ensuite différents marqueurs propres aux mDCs et aux pDCs qui permet de les distinguer. Les pDCs sont reconnues par leur forte expression du CD123 (qui est aussi le récepteur à l'interleukine-3) et l'expression de marqueurs spécifiques comme BDCA-2 ou BDCA-4 (**Tableau & Figure 21**). Les pDCs fraîchement recueillies expriment peu le CD80 et le CD86, molécules de co-stimulation, et les molécules HLA de classe I (A, B, C).

#### *Fonctions des pDCs*

Les pDCs humaines jouent un rôle primordial dans la réponse immunitaire antivirale en faisant le lien entre la réponse naturelle ou innée et la réponse spécifique ou adaptative après stimulation virale. La liaison du ligand (antigène viral) à son récepteur entraîne une production très importante d'interféron de type 1 (alpha et bêta) par les pDCs (100 à 1000 fois plus que les autres types cellulaires) dans les 24 heures qui suivent l'interaction virus/pDCs. Les pDCs sont alors au stade immature.

Cette production très intense, qui constitue la principale caractéristique des pDCs, est indépendante du récepteur à l'interféron alpha (IFNAR) (Barchet et al, 2002), qui est en général requis pour induire l'expression d'IRF7 (interferon regulatory factor 7), le facteur régulateur majeur de la production d'interféron par les cellules. IRF7 est de fait exprimé à l'état de base par les pDCs, ce qui faciliterait la surexpression d'IRF7 en cas de stimulation, et par conséquent la production d'interféron de type 1 (Izaguirre et al, 2003).

**Tableau 14:** Caractéristiques phénotypiques des mDCs et des pDCs humaines.

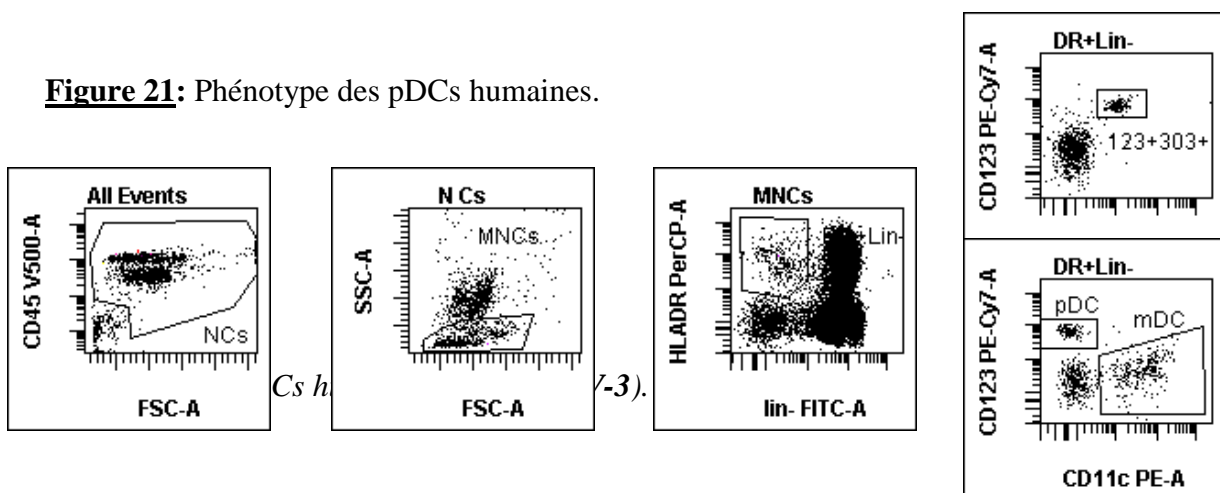
	pDCs	mDCs
Marqueurs de définition	CD45+Lin-DR+ CD123 (IL3-R) fort	CD45+Lin-/DR+ CD123bas
Marqueurs spécifiques	BDCA-2 BDCA-4 (neuropilin-1)	DEC-205 DC-SIGN (CD209)
Marqueurs myéloïdes	CD11b-/CD11c- CD13-/CD14-/CD33-	CD11b+/CD11c+ CD13+/CD14-/CD33+
Autres marqueurs	CD45RA+ ILT1-/ILT7+ CD1a, b, c, d - CD4, CD2	CD45RO+ ILT1+ CD1a, b, c, d +/-

ILT: immunoglobulin-like transcript.

BDCA: blood dendritic cell antigen.

CD: cluster de différenciation.

**Figure 21:** Phénotype des pDCs humaines.



Les récepteurs impliqués dans la reconnaissance de l'antigène par les pDCs font partie de la famille des TLR (toll-like récepteurs). Ils reconnaissent des motifs moléculaires associés aux pathogènes (bactéries, virus ou parasites) appelés des PAMPs (pathogen associated molecular pattern), conservés au cours de l'évolution. Ces motifs correspondent en fait soit à des protéines, des sucres ou des acides nucléiques. 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). La liaison du TLR à son ligand entraîne le recrutement d'une protéine dite adaptatrice qui permet de propager un signal intracellulaire via le « domaine de mort » (ou death domaine) qui va inhiber ou amplifier la transcription de gènes impliqués dans la réponse immunitaire. Les motifs pathogènes reconnus par les TLR sont : le lipopolysaccharide de la paroi des bactéries (ou LPS), les lipoprotéines, la flagelline des flagelles bactériens, certains motifs d'ADN double brin et d'ARN simple brin des virus ainsi que des motifs ADN bactériens appelés îlots CpG (C-phosphate-G), correspondant à des zones où les séquences CG (où G succède à C sur le même brin d'ADN) sont surreprésentées et non méthylées. Des oligonucléotides synthétiques de type CpG peuvent aussi activer les TLR. Les protéines adaptatrices des TLR connues sont au nombre de 4 : MyD88, TIRAP, TRIF et TRAM. Les pDCs possèdent plusieurs TLR mais deux sont exprimés majoritairement : TLR7 et TLR9. Ils sont intracellulaires et synthétisés dans le réticulum endoplasmique puis transportés dans les endosomes. Leur protéine adaptatrice est MyD88. TLR7 reconnaît l'ARN viral simple brin et TLR9 reconnaît les séquences CpG non méthylées ou l'ADN viral. Par contraste, les monocytes et les mDCs expriment largement les TLR-1, 2, 4, 5 et 6 qui reconnaissent des motifs conservés bactériens. Seules les mDCs expriment le TLR-3 qui est impliqué dans la reconnaissance des ARN viraux double brin. Ainsi il apparaît que les trois types cellulaires principaux (monocytes, mDCs et pDCs) impliqués dans



l'immunité innée reconnaissent préférentiellement, via différents profils d'expression des TLR, un pathogène (bactérien ou viral) plutôt qu'un autre (**Tableau 15 et Figure 22**).

La liaison des TLR-7 et TLR-9 à leur ligand viral, entraîne le recrutement de MyD88 au niveau du domaine de mort, induisant ainsi la production d'IRF-7 et d'IRF-3, qui entraîne elle-même la production d'interféron de type 1 par les pDCs. Les voies de signalisation NF- $\kappa$ B et PI3K/mTOR, les protéines AP-3 (adaptor protein 3) et Slc15a4 sont d'autres facteurs récemment identifiés dans la production d'interféron par les pDCs via TLR-7 et TLR-9 (Reizis et al, 2011). La sécrétion d'interféron de type 1 par les pDCs est contrôlée par différents récepteurs inhibiteurs: BDCA-2, marqueur spécifique des pDCs, qui est une glycoprotéine transmembranaire de type C-lectin et qui permet d'internaliser l'antigène pour présentation aux cellules T (Dzionek et al, 2001) ; ILT7 (immunoglobulin-like transcript 7). Certaines protéines du VIH ou du virus de l'hépatite B se lient ainsi à BDCA-2 pour inhiber la synthèse d'interféron par les pDCs, ce qui constitue un mécanisme de défense des virus contre la réponse immune de l'hôte (Martinelli et al, 2007 ; Xu et al, 2009).

Après 24 heures suivant la stimulation virale, les pDCs réduisent énormément leur production d'interféron de type 1 et deviennent réfractaires à une seconde stimulation par le même virus ou par un autre virus. Elles s'engagent dans une voie de maturation et de différenciation en cellules présentatrices d'antigènes (CPA) professionnelles avec acquisition morphologique de dendrites, expression de molécules de co-stimulation (CD80, CD86, CD40) ou de présentation de l'antigène (HLA classe 1 et 2) et produisent alors différentes cytokines telles que l'IL-1, IL6 et le TNF alpha.

La sécrétion d'IL-12 qui existe chez les pDCs murines à ce stade est discutée chez l'homme. On note aussi une diminution des TLR-7 ou TLR-9 ou des marqueurs spécifiques (BDCA-2). Cette maturation des pDCs est dépendante de la voie de signalisation TLR/MyD88/IRF7 mais aussi de la voie NF- $\kappa$ B (Villadangos & Young, 2008 ; O'Keefe et al, 2005). Elle nécessite

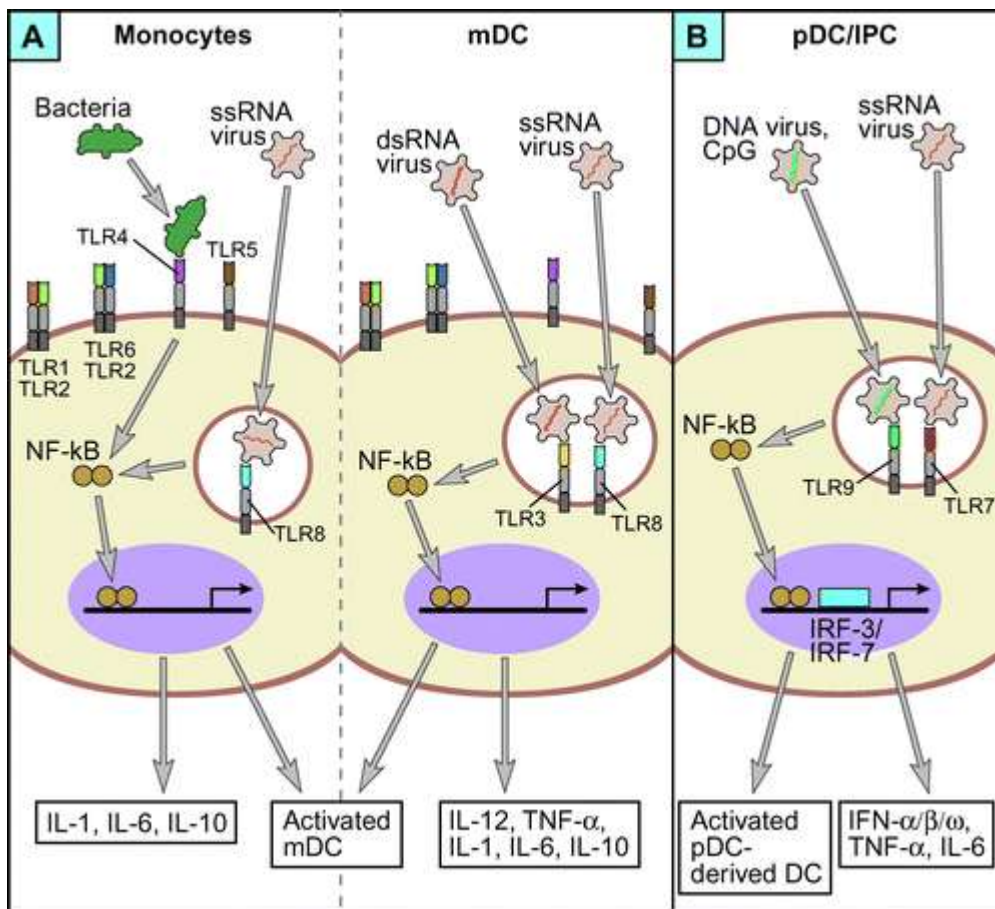
aussi l'action de l'interféron de type 1 et du TNF alpha. Cette capacité à se transformer en mDCs des pDCs est induite in vitro par l'interleukine-3 +- le CD40 ligand (Grouard et al, 1997 ; Rissoan et al, 1999).

**Tableau 15** : Ligands, récepteurs et fonctions cellulaires : comparaison entre pDCs et mDCs.

	pDCs	mDCs
Ligands (PAMPs)	ADN viral double brin ARN viral simple brin CpG bactérien ou synthétique	ARN viral simple brin ARN viral double brin Peptidoglycans Liposaccharide bactérien (LPS) Flagellin
Récepteurs cellulaires	TLR-1, TLR-6, TLR-10  TLR-7+++ , TLR-9 (CD289) +++	TLR-1, TLR-6, TLR-10+  TLR-2, TLR-4, TLR-5+  TLR-3, TLR-8 ++
Réponses aux stimuli	Production d'IF-1+++ Présentation d'antigène + : HLA-1, -2 Co-stimulation : CD80/86/40 Maturation : CD83+/- Sécrétion : IL-6, IL-1, TNF alpha+  IL-12+/- ? Phagocytose -	Production IF-1 + Présentation d'antigènes +++ Co-stimulation : CD80/86/40 Maturation : CD83++ Sécrétion : IL-1, IL-6, TNF alpha+  IL12+++ Phagocytose +

Abréviations : IF : interféron; IL : interleukine; TLR : toll like receptor; PAMPs: pathogen associated molecular patterns ou motifs moléculaires conservés au cours de l'évolution par les pathogènes et reconnus par les Toll-like receptor (TLR) humains.

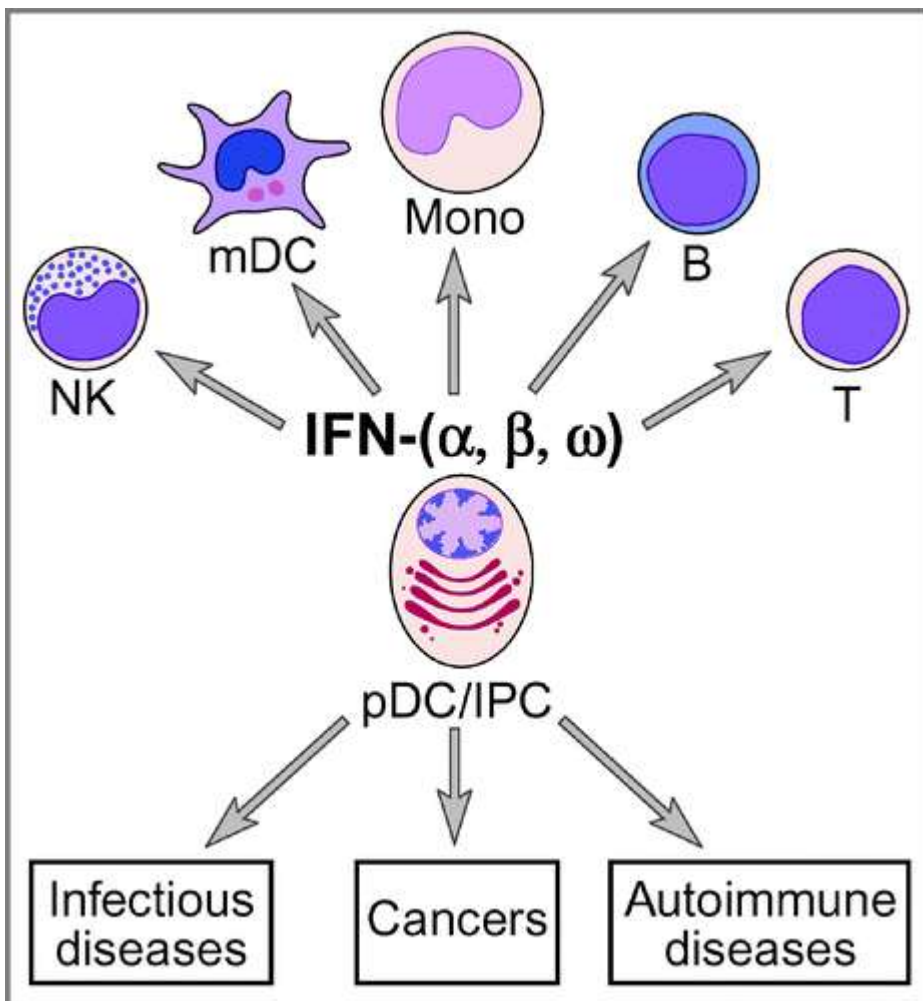
**Figure 22:** Activation des monocytes, mDCs et pDCs par différents motifs conservés de pathogènes via les TLR et réponses induites (d'après Liu, 2005).



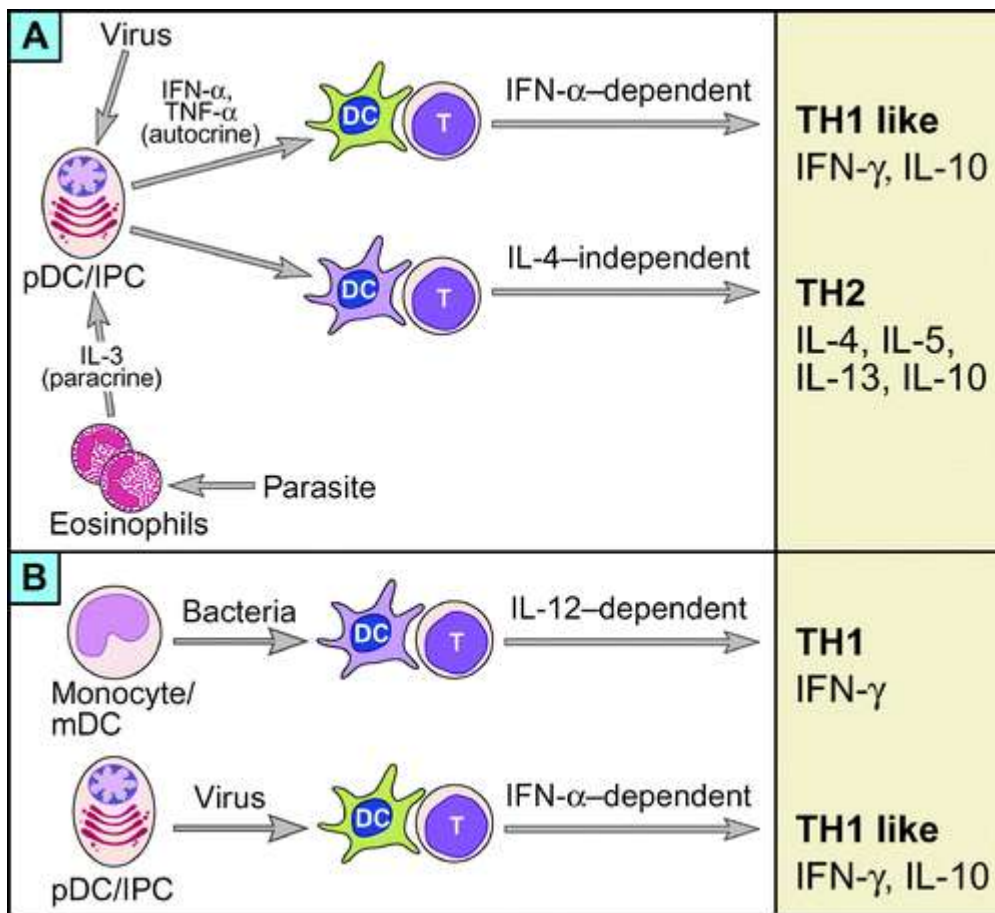
L'activation des pDCs avec production d'interféron de type 1 et leur différenciation en CPA entraînent ensuite l'activation de presque toutes les cellules immunitaires en passant par les NK, les monocytes et les lymphocytes T et B (**Figure 23**). On passe ainsi de la réponse immunitaire innée à une réponse immunitaire adaptative. La cytotoxicité des NK et des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> est augmentée, les mDCs sont activées et protégées dans leur fonction de présentation des antigènes viraux aux lymphocytes T et les lymphocytes B mémoires produisent des anticorps spécifiques. La réponse lymphocytaire T CD4<sup>+</sup> *in vitro* peut être de type Th1 (production d'interféron gamma), en particulier après stimulation virale (Kadowaki et al, 2000), ou de type Th2 (production d'IL-4, IL-5 et IL-10), en particulier après stimulation par l'interleukine-3 et le CD40 ligand (Rissoan et al, 1999) (**Figure 24**).

Les pDCs pourraient également être à l'origine de la génération de cellules T régulatrices (Tregs), via leur sécrétion d'IL-10, et pourraient donc avoir un rôle également dans le phénomène de tolérance ou l'activité immunosuppressive des Tregs. Ce phénomène pourrait expliquer l'implication des pDCs dans la survenue de maladies auto-immunes.

**Figure 23:** Cellules immunitaires régulées par les pDCs via la sécrétion d'Interféron et implication des pDCs en pathologies humaines (d'après Liu, 2005).



**Figure 24:** Profil de sécrétion cytokinique des pDCs en réponse à différents stimuli (d'après Liu, 2005).



### Survies des pDCs

La survie des pDCs in vivo est mal connue. En culture in vitro, les pDCs nécessitent la présence d'IL-3 dans le milieu et survivent jusqu'à 72 heures environ (Grouard et al, 1997).

### pDCs et pathologies humaines : autoimmunité, tumeur et tolérance.

Les pDCs sont impliquées dans le développement d'un certain nombre de maladies humaines. Ainsi, leur rôle dans la pathogénicité des maladies auto-immunes, associées fréquemment à une élévation du taux d'interféron de type 1, est bien démontré, en particulier dans le psoriasis ou le lupus, où l'on constate une accumulation de pDCs activées, produisant de l'interféron, dans les lésions cutanées associées à ces deux maladies.

Les pDCs infiltrent également un certain nombre de tumeurs tels les cancers de la tête et du cou, les cancers ovariens ou les mélanomes avec pour conséquence un taux diminué de pDCs circulantes. Dans ces modèles, on suspecte que la tumeur puisse recruter et manipuler en quelque sorte les pDCs en altérant ou en détournant leurs fonctions *in situ*, en particulier la production d'interféron de type 1. Via un certain nombre de facteurs (TGF-beta, VEGF beta, IL-10), les cellules tumorales orienteraient les pDCs vers l'induction de cellules T régulatrices, produisant de l'IL-10 et infiltrant la tumeur, avec pour conséquence un effet de tolérance de l'organisme vis-à-vis de celle-ci. Les pDCs pourraient également exprimer de l'indolamine 2,3 dioxygénase (IDO) qui est responsable d'un microenvironnement tumoral supprimeur de la réponse de l'hôte contre la tumeur (Vermi et al, 2011). Il existe également un cas particulier de tumeur hématologique qui correspond à la prolifération anormale et clonale de pDCs. Il s'agit de la leucémie à cellules dendritiques caractérisée par des nodules cutanées spécifiques, des ganglions et une infiltration médullaire. Son pronostic reste péjoratif (Chaperot et al, 2001 ; Feuillard et al, 2002).

#### *pDCs et allogreffe.*

Dans le domaine de l'hématologie, outre la leucémie à pDCs évoquée plus haut, un certain nombre d'évènements ayant trait aux pDCs sont retrouvés en greffe de CSH. La rechute post-allogreffe est plus importante quand on constate une augmentation du nombre de pDCs chez le donneur avant greffe de moelle (Waller et al, 2001). Arpinati et al (2003) a montré qu'un taux important de pDCs dans le greffon pouvait favoriser une incidence accrue de GVH chronique après greffe. Par ailleurs, il a été montré qu'un taux diminué de pDCs circulantes chez le receveur semble favoriser la survenue d'une réaction aiguë ou chronique du greffon contre l'hôte (Rajasekar et al, 2008). Ce faible taux de pDCs circulant pourrait en fait traduire le recrutement et l'augmentation du nombre des pDCs dans les organes cibles comme nous

l'avons montré récemment chez des patients développant une GVH digestive ou cutanée (Bossard et al, 2012 ; Malard et al, 2012). A l'inverse, les pDCs pourraient également être capable de supprimer la survenue d'une GVH aiguë par induction de cellules T régulatrices responsable d'une tolérance entre le receveur et le donneur (Hadeiba et al, 2008). Finalement une récupération modeste en pDCs à trois mois de l'allogreffe après conditionnement atténué est responsable d'une survie diminuée en rapport avec un taux de décès supérieur chez les patients, dû à la GVH ou aux infections dont l'incidence est augmentée (Mohty et al, 2005).

### *pDCs et Virus*

Les pDCs jouent donc un rôle primordial dans la réponse immunitaire antivirale via notamment leur capacité à produire de grande quantité d'interféron de type 1 en réponse à ce type d'infection. Tous les virus ne sont pas à même de déclencher une activation des pDCs, en particulier les virus à ARN double brin (qui sont reconnus par les mDCs via TLR-3). De plus, il faut distinguer deux notions : activation des pDCs par un virus et permissivité des pDCs à un virus. En effet, les pDCs peuvent être activées par des motifs du virus sans que celui-ci se réplique dans la cellule. La permissivité des cellules au virus peut également être abolie par l'inactivation du virus par agents chimiques ou irradiation ultraviolette. De nombreux virus sont capables d'activer les pDCs humaines : le virus de l'hépatite C, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), le virus de la grippe et les herpesvirus comme HSV-1 et le CMV. Par contre, les pDCs humaines du sang périphérique semblent être non permissives au CMV (Varani et al, 2007) ou à l'EBV (Fiola et al, 2010) mais le seraient pour HHV-8 (West et al, 2011).

Par ailleurs certains virus sont capables d'altérer les fonctions des pDCs (en se fixant à BDCA-2 par exemple ou en se répliquant dans les pDCs) pour échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. Ainsi, dans l'infection à VIH, les pDCs peuvent passer d'un état

protecteur contre l'infection virale à un rôle favorisant l'infection au fur et à mesure que celle-ci progresse (Reizis et al, 2011).

#### *pDCs et HHV-6*

Il n'y a, à notre connaissance, que trois articles rapportant les conséquences d'une culture *in vitro* de pDCs avec le virus HHV-6. Dans le premier papier, publié en 2009, Takemoto et al ont démontré que HHV-6 était à priori capable de se multiplier dans les pDCs puisque l'infection de ces cellules par la souche Z29 d'HHV-6B conduisait à la production de particules virales complètes, elles-même capables d'infecter à leur tour des lymphocytes T CD4+. La multiplication virale pourrait entraîner un contrôle des pDCs et expliquer l'augmentation de fréquence des infections à HHV6 après greffe de sang placentaire, les pDCs n'étant pas permissives au CMV et à l'EBV comme signalé plus haut (Varani et al, 2007 ; Fiola et al, 2012). Les deux autres papiers émergent d'une seule et même équipe. Celle-ci a travaillé avec des pDCs isolées à partir de sang placentaire et cultivées en présence de la même souche HHV-6B Z29 inactivée d'emblée. Ces deux études ne peuvent donc pas apporter d'éléments sur la permissivité ou non des pDCs au virus HHV-6 compte-tenu du caractère inactivé du virus. L'exposition au virus entraîne par contre à elle seule une sécrétion d'interféron alpha et lambda1 par les pDCs via TLR-9. HHV-6 entraînerait aussi une réponse T de type Th1 tout en réduisant la réponse Th2 (Nordstrom et al, 2010 & 2012)

Les résultats de ces trois papiers restent discutables : d'une part l'obtention des pDCs après tri n'est pas établie, les cellules étudiées peuvent donc être contaminées par d'autres cellules permissives pour HHV-6, d'autre part les pDCs sont cultivées sans IL3, alors qu'il est bien démontré que ces cellules meurent *in vitro* en l'absence de cette cytokine (Grouard et al, 1997), enfin l'isolement et la culture de pDCs à partir de sang placentaire restent suspects dans la mesure où cette source reste très peu riche en pDCs comme nous l'avons démontré



dans la **Partie Expérimentale II**. C'est les raisons pour lesquelles, nous avons voulu réaliser à nouveau une culture de pDCs humaines en présence d'HHV-6 afin d'étudier 1) les modifications phénotypiques et fonctionnelles induites par le virus et 2) de vérifier la permissivité des pDCs au virus.

## **MATERIELS ET METHODES.**

### *Isolement des cellules mononucléées périphériques (PBMC) de donneurs volontaires.*

Un résidu de tubulure ayant servi pour un don de plaquettes (« anneau de kit ») est récupéré à l'EFS de Nantes après la séance de prélèvement chez des donneurs volontaires, ayant donné leur consentement signé. On récupère ainsi 30 à 40 ml de sang riche en leucocytes. Le sang recueilli est ensuite dilué au 1/2 dans du RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH, Pishing, Autriche) puis centrifugé sur gradient de Ficoll (Eurobio, Paris, France) pendant 30 mn à 1500 tr/mn, sans frein. On prélève ensuite les anneaux de globules blancs dans les tubes centrifugés. Les anneaux sont poolés dans un nouveau tube qui est centrifugé (10 mn, 1500 tr/mn) une première fois (lavage n°1). Après avoir jeté le surnageant, les globules blancs sont remis en suspension dans du RPMI et une deuxième centrifugation (lavage n°2) est réalisée (10 mn, 1200 tr/mn) afin d'éliminer les plaquettes. Le culot cellulaire obtenu est alors utilisé pour réaliser le tri de pDCs.

### *Tri des pDCs par sélection négative*

Le tri des pDCs s'effectue grâce au kit STEMCELL « EasySep Human pDCs enrichment » (référence : 19062A) et l'aimant « Big Easy » silver « EasySep » STEMCELL (référence : 18001). Nous décrivons la procédure du tri ci-dessous.

Les PBMC, après comptage, sont mises en suspension dans du milieu contenant du PBS (phosphate-buffered saline) + 2% de sérum de veau foetal (SVF) + 1 mM EDTA à la

concentration de  $5 \cdot 10^7$  cellules/ml. L'anticorps bloquant anti-CD32 (Fc $\gamma$ RII) et le cocktail d'enrichissement (composé de multiples anticorps) sont ensuite ajoutés aux concentrations respectives de 30 et 50  $\mu$ L/ml de suspension cellulaire. Après mélange, les cellules sont incubées pendant 30 mn à température ambiante. Des billes magnétiques sont ensuite ajoutées à la suspension cellulaire à la concentration de 200 $\mu$ L/mL. Ces billes se lient aux différents anticorps bloquants pendant l'incubation de 10 mn à température ambiante. Après incubation, le tube est mis au contact de l'aimant, les billes et les cellules fixées aux billes sont retenues par l'aimant, les cellules non fixées correspondant aux pDCs peuvent être recueillies. A la fin du tri, les pDCs sont comptées, une fraction est récupérée pour les analyses en cytométrie de flux et le reste des cellules est mis en culture pour les essais d'infections.

#### *Production de la souche HHV-6B HST.*

La souche HHV-6B HST a été isolée en 1999 (Isegawa et al, 1999). La culture virale de cette souche a été réalisée sur la lignée cellulaire MT4, issue de cellules lymphoïdes T humaines transformées par le virus HTLV (*human T lymphotropic virus*). La multiplication virale est objectivée par l'apparition d'un effet cytopathique (ECP) et confirmée par la détection d'antigènes viraux par technique d'immunofluorescence indirecte (IFI) sur lame, à l'aide de l'anticorps monoclonal 7C7 (Argène S.A., Verniolle, France). Lorsqu'un ECP d'au moins 50% est observé, la suspension cellulaire est récupérée et lysée par la méthode de congélation/décongélation puis poolée pour subir une ultracentrifugation (28000 tr/min, 2h, +4°C). La suspension virale est alors conservée à -80°C avant titrage. Le titrage est réalisé par quantification du nombre de copies de génome d'HHV-6 par PCR ADN HHV-6. La concentration mesurée dans notre stock viral est de  $2.7 \cdot 10^{10}$  copies de génome/ml.

### *Inactivation du virus HHV-6.*

Cette inactivation est réalisée par exposition du virus aux ultraviolets (UV). La séance d'exposition est répétée plusieurs fois. On s'assure ensuite de l'inactivation du virus par l'absence de multiplication virale dans la lignée cellulaire MT4 (absence d'observation d'un ECP et absence de production d'antigènes viraux par technique d'IFI).

### *Infection des pDCs par la souche HST (HHV-6B).*

Après avoir vérifié la pureté du tri (voir analyses FACS), on réalise l'infection des pDCs avec la souche HHV-6B HST. Les pDCs sont mises en culture en plaques 96 puits (Nunc, Rochester, USA) à la concentration de  $10^6$  cellules/mL dans un milieu contenant du RPMI 1640 supplémenté avec 1% d'un mélange antibiotique comprenant de la pénicilline/streptomycine, 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (après chauffage à 56°C), 1% de L-Glutamine. L'interleukine-3 (R1D System Europ, France) est ajoutée à raison de 20 ng/ml. Les cellules sontensemencées soit avec du milieu de culture (contrôle ou mock), soit cultivées avec la souche virale HHV-6B HST activées ou inactivées par irradiation UV, à la concentration finale de  $10^8$  et/ou  $10^9$  copies d'HHV-6/mL soit 100 copies pour 1 cellule pDC (=  $10^2$  équivalent génome (eq gen)) ou 1000 copies pour 1 cellule pDC (=  $10^3$  eq gen). Les pDCs ont également été cultivées pour quelques expériences avec du CpG à la concentration de 10  $\mu$ M (ODN 2395, Cayla Invivogen, France). Il s'agit d'un contrôle positif puisque le CpG stimule naturellement les pDCs.

### *Cytométrie en flux.*

L'étude en cytométrie en flux est réalisée au laboratoire d'Hématologie/Biologie du CHU de Nantes. Après recueil, les cellules sont mises en suspension dans 50  $\mu$ l de PBS et incubées pendant 10 minutes à température ambiante dans le noir avec différents anticorps

monoclonaux (AcMo) couplés aux 6 fluorochromes suivants: FITC, PE, APC, PerCP, PECy7 et V500 selon les 4 combinaisons décrites dans le **Tableau 16**. L'ensemble des AcMo provenaient de Beckton-Dickinson (BD, Biosciences, San José, 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 l'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 40000 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 cytométrie en flux. Un échantillon de cellules avant tri est aussi récupéré pour la même analyse afin de vérifier l'absence de perte de pDCs après le tri. Puis, les cellules sont analysées pour l'expression de marqueurs d'activation (CD80/86/83), de classe 1 et 2 du HLA, et du CD46, récepteur membranaire d'HHV-6, à heure 0 (HO), à 24 heures (H24) et à 72 heures (H72) post-infection.

#### *Extraction des acides nucléiques.*

L'ADN et l'ARN des pds sont extraits à partir des culots cellulaires prélevés à H24 et H72 post-infection à l'aide de trousse commerciales (DNeasy minikit & RNeasy minikit, Qiagen S.A., Courtaboeuf, France) et selon les recommandations du fabricant. Les extraits d'ADN et d'ARN sont ensuite stockés à -80°C pour analyses ultérieures.

**Tableau 16:** Combinaisons d'anticorps monoclonaux utilisés en FACS à différents temps post-infection des pDCs humaines après stimulation par la souche virale HHV-6B HST.

Panel 5/6 couleurs	V500-	APC-	PeCy7-	PerCp- CY5-5	PE-	FITC-
HO uniquement	CD45 (H130)	BDCA-2 (AC144)	CD123 (7G3)	DR (G46.6)		Lin*
H0 H24 H72	CD45 (H130)	BDCA-2 (AC144)	CD123 (7G3)	DR (G46.6)	CD86 (2331/FUN-1)	CD80 (16-10A1)
H0 H24 H72	CD45 (H130)	BDCA-2 (AC144)	CD123 (7G3)	DR (G46.6)	CD83 (HB15e)	CD46 (E4.3)
H0 H24 H72	CD45 (H130)	BDCA-2 (AC144)	CD123 (7G3)	DR (G46.6)	IgG1	IgG1

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

HO, H24, H72 : heures 0, 24 et 72 de la culture cellulaire.

### *PCR et RT-PCR*

La quantification de l'ADN viral est réalisée par PCR suivant la technologie TaqMan. Cette méthode quantitative permet la détection des deux espèces A et B à la fois grâce à l'amplification d'un fragment de la région U65-U66 du génome d'HHV-6 (Gautheret-Dejean et al, 2002). La détection des transcrits viraux des gènes U90 (phase précède de réplication) et U100 (phase tardive de réplication) d'HHV-6B a été réalisée par une méthode de RT PCR développée au laboratoire de Virologie de Nantes (N'Guyen, VH, manuscript en préparation)

### *Dosage de l'Interféron alpha par test ELISA*

L'étude de la sécrétion d'interféron alpha par les pDCs, en fonction des différentes conditions de culture, est réalisée après avoir récupéré le surnageant cellulaire à H24 et H72 en utilisant le kit commercial Human IFN-alpha ELISA - R&D (ref : 4100-1). 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.

### *Statistiques*

On utilise des tests non paramétriques appariés ou non selon les résultats comparés (Wilcoxon ou Mann-and-Whitney tests) à l'aide du logiciel GraphPad Prism (GraftPad Software). Une valeur de  $p < 0.05$  est considérée comme statistiquement significative.

## **RESULTATS:**

Six essais d'infection *in vitro* de pDCs humaines par la souche virale HHV-6B HST ont été réalisés entre Mars et Octobre 2012.

### *Purification des pDCs*

La pureté médiane du tri est de 96.6% (**Tableau 17**). Il n'y a pas de perte constatée en cellules pDCs avant et après tri (**Figure 25**). Le pourcentage médian de pDCs par rapport aux cellules nucléées contenues dans l'anneau de kit est de 0.25% (écart : 0.1-0.86). La quantité moyenne de pDCs récupérées après tri est de 2.16 millions (écart: 0.78-4.76).

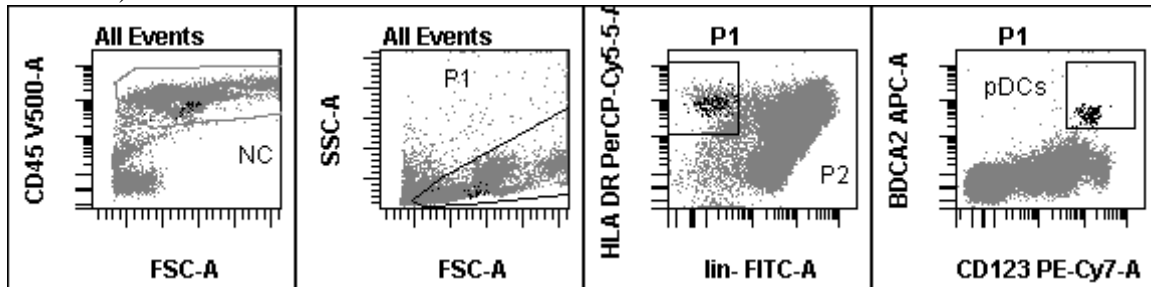
**Tableau 17:** Rendement en pDCs après tri des cellules nucléées issues de donneurs volontaires de plaquettes et récupérées à partir de la tubulure (« anneau de kit ») de prélèvement.

	Cellules Nucléées après FICOLL	Cellules après tri pDCs	Pureté	% pDCs/ Cellules Nucléées
Exp 1	480 10 <sup>6</sup>	2.16 10 <sup>6</sup>	97.4%	0.44%
Exp 2	531 10 <sup>6</sup>	4.76 10 <sup>6</sup>	96.8%	0.86%
Exp 3	738 10 <sup>6</sup>	0.78 10 <sup>6</sup>	97%	0.1%
Exp 4	675 10 <sup>6</sup>	1.35 10 <sup>6</sup>	92.6%	0.18%
Exp 5	900 10 <sup>6</sup>	2.34 10 <sup>6</sup>	98.3%	0.25%
Exp 6	750 10 <sup>6</sup>	1.6 10 <sup>6</sup>	97.7%	0.2%

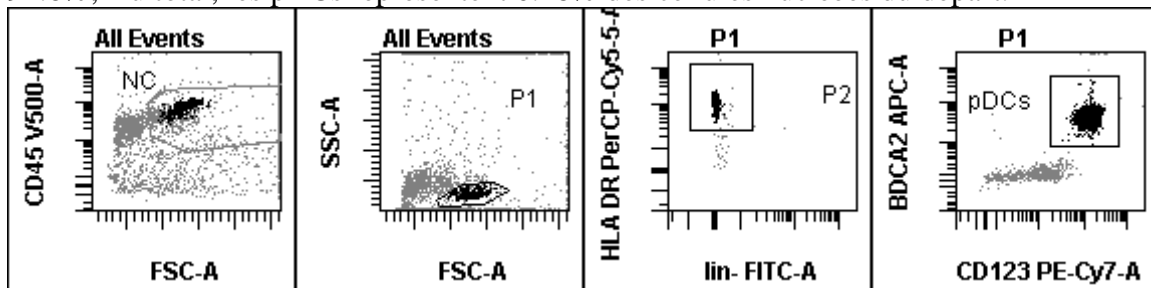
Abréviations : exp : expérience.

**Figure 25:** Un exemple d'analyse FACS à HO avant et après tri : caractérisation des pDCs (expérience 4).

**Avant tri:** les pDCs représentent ici 0.2% des cellules nucléées (675 10<sup>6</sup> cellules après FICOLL)



**Après tri:** Après tri pDCs, on compte 1.35 millions de cellules, la pureté est estimée à 92.6%; Au total, les pDCs représentent 0.18% des cellules nucléées du départ.



### *Cultures et Infections des pDCs*

Six expériences d'infections des pDCs humaines par HHV-6B HST ont été réalisées. Néanmoins, toutes les conditions de culture n'ont pu être testées en même temps. Chaque expérience comportait un témoin négatif (mock), où les cellules étaient cultivées seules jusqu'à 72h. Le **Tableau 18** résume l'ensemble des conditions testées jusqu'à présents.

Sur le plan morphologique, on observe une transformation des cellules avec l'apparition de dendrites à H24. Les cellules augmentent également de taille entre H0 et H72 et la proportion de cellules vivantes à H24 et H72 est d'environ 100% et 85-90%, respectivement, quelque soient les conditions testées. Les cellules meurent rapidement après 72 heures.

**Tableau 18:** Nombre de conditions de culture testées pendant l'étude.

Conditions testées H0 H24 H72	Nombre d'expériences totales =6
Mock (témoin négatif)	6 fois testées
HHV-6 10 <sup>2</sup> équivalent génôme	3 fois testées
HHV-6 10 <sup>3</sup> équivalent génôme	6 fois testées
HHV-6 inactivé	2 fois testées
CpG (H72 uniquement) (témoin positif)	1 fois testée

### *Expression des marqueurs de surface en fonction des conditions de culture.*

Nous avons étudié la modification d'expression de différentes molécules de surface des pDCs: molécules de costimulation (C80/CD86), une molécule de maturation (CD83), les molécules HLA de classe I (A, B, Cw) et de classe II (DRB1), le récepteur membranaire du virus HHV-6 (CD46).



CD80/86/83 (Figure 26): Le CD80 et le CD83 ne sont pas exprimés par les pDCs non stimulées, le CD86 est exprimé spontanément aux alentours de 21% (HO). On peut donc considérer les variations de pourcentage d'expression pour ces trois marqueurs en fonction des conditions de culture à H24 et H72.

A 24h (en présence d'IL-3), les pDCs présentent une augmentation de l'expression à la fois du CD80 (entre 35 et 59%), du CD86 (entre 56 et 63%) et du CD83 (entre 14 et 18%), quelque soient les conditions de culture (mock, virus à  $10^2$  et  $10^3$  eq génome, virus inactivé). Le CD80 semble être moins exprimé quand les pDCs sont cultivées à la condition  $10^3$  eq génome. Pour le reste, il n'y a pas de différence significative en fonction des conditions de cultures.

A H72, on note toujours une augmentation d'expression du CD80 et du CD86, à la fois lorsque les pDCs sont cultivées seules (mock) (68.8% et 73.8%, respectivement) ou en présence de CpG (100% dans les 2 cas). En présence du virus, on note par contre une diminution d'expression de ces deux marqueurs, plus marquée quand les pDCs sont cultivées avec le virus à  $10^3$  eq génome (45.5% d'expression pour le CD80 et le CD86) ou avec du virus inactivé (40.5% et 48.5%, respectivement). La comparaison statistique des conditions mock/ $10^3$  eq génome est significative à H72 pour le CD80 ( $p=0.05$ ) et le CD86 ( $p=0.03$ ). L'expression du CD83 est observée uniquement lorsque les pDCs sont cultivées avec le CpG (32%), sinon son expression est diminuée en présence ou non du virus (entre 1 et 5%).

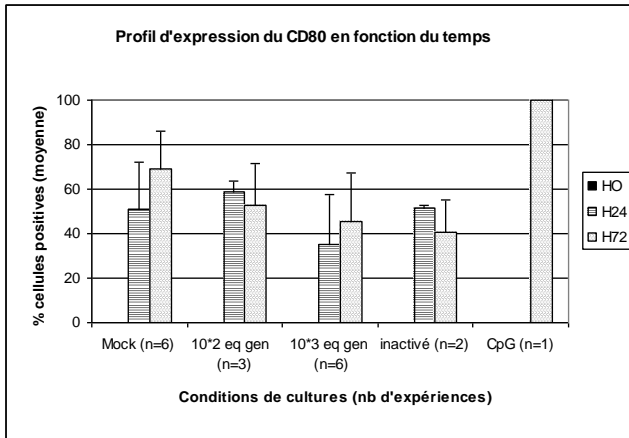
CD46/HLA classe 1/HLA classe 2 (DR) (Figure 27) : Ces trois marqueurs de surface sont exprimés sur 100% des pDCs non stimulées (HO). On a considéré donc ici les variations de MFI en fonction des conditions de cultures à H24 et H72. La MFI du CD46 augmente régulièrement entre H0, H24 et H72 pour toutes les conditions testées. Cette augmentation est plus importante lorsque les pDCs sont cultivées avec le CpG, le virus à  $10^3$  eq génome ou le virus inactivé. Les MFI du HLA classe I et classe II augmentent de façon importante entre

H0 et H24 puis celles-ci rediminuent entre H24 et H72 pour toutes les conditions testées, à l'exception de la condition  $10^3$  eq génome où la MFI reste comparable pour la classe I et augmente pour la classe II. Lorsque les pDCs sont cultivées avec le CpG, les MFI du HLA classe I et classe II augmentent considérablement entre H0 et H72.

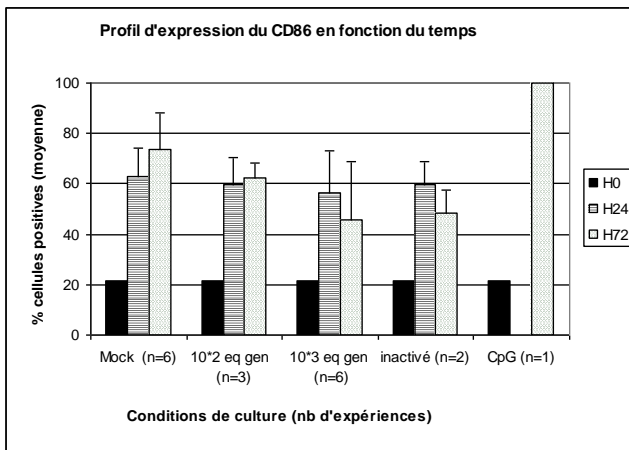
*PCR et RT-PCR : détection du virus HHV-6 dans les pDCs à H24 et H72.*

Les analyses de PCR et de RT-PCR ont été réalisées uniquement sur les trois premières expériences à partir de prélèvements congelés/décongelés. Le génome d'HHV-6 est détecté par PCR mais les résultats sont d'interprétation difficile car on retrouve une quantité d'ADN HHV-6 extracellulaire importante dès H24 qui ne permet pas de mettre en évidence une éventuelle augmentation de la charge virale et donc de savoir si le virus se multiplie dans les pDCs. La RT-PCR est quant à elle ininterprétable pour le moment en raison de la présence d'ADN résiduel dans les extraits testés et ce malgré la réalisation d'une étape de lyse par une DNase au cours de l'étape d'extraction.

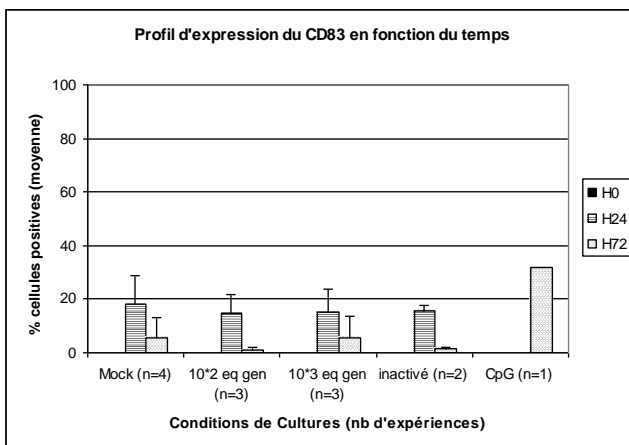
**Figure 26:** Variations d'expression (% moyen) du CD80, CD86 et CD83 par les pDCs à H0, H24 et H72 en fonction des différentes conditions de cultures.



%moyen	H0	H24	H72
Mock	0%	51.1%	68.8%
10 <sup>2</sup> eq gen	0%	59%	53%
10 <sup>3</sup> eq gen	0%	35.4%	45.5%
Inactivé	0%	51.5	40.5
CpG	0%		100%

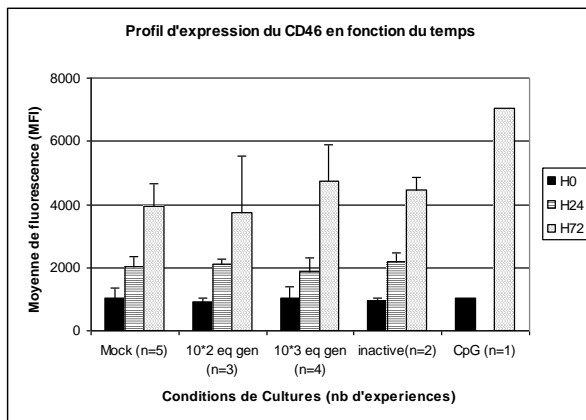


%moyen	H0	H24	H72
Mock	21.4%	63.1%	73.8%
10 <sup>2</sup> eq gen	21.4%	59.6%	62.3%
10 <sup>3</sup> eq gen	21.4%	56.2%	45.5%
Inactivé	21.4%	59.5%	48.5%
CpG	21.4%		100%

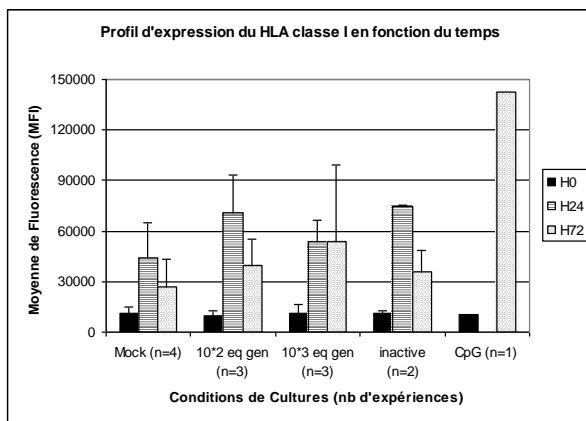


%moyen	H0	H24	H72
Mock	0%	18%	5.6%
10 <sup>2</sup> eq gen	0%	14.5%	1%
10 <sup>3</sup> eq gen	0%	15.3%	5.5%
Inactivé	0%	15.5%	1.5%
CpG	0%		32%

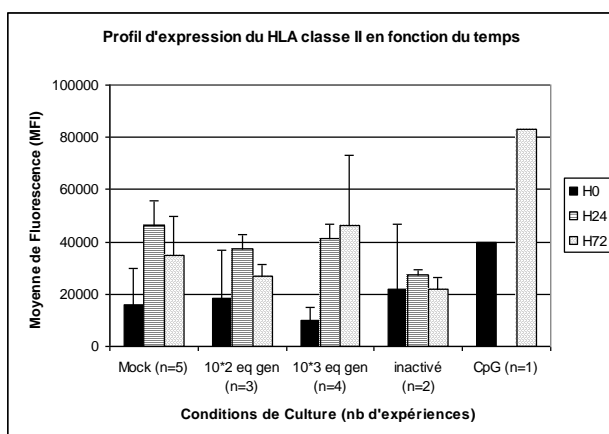
**Figure 27:** Variations d'expression (MFI moyenne) du CD46, du HLA classe I et du HLA classe 2 (DR) par les pDCs à H0, H24 et H72 en fonction des différentes conditions de cultures.



MFI	H0	H24	H72
Mock	1046	2041	3922
10 <sup>2</sup> eq gen	899	2120	3729
10 <sup>3</sup> eq gen	1052	1870	4742
Inactivé	955	2199	4473
CpG	1021		7055



MFI	H0	H24	H72
Mock	11083	43765	27026
10 <sup>2</sup> eq gen	9547	71003	39889
10 <sup>3</sup> eq gen	11273	53866	53680
Inactivé	11456	74545	35665
CpG	10515		142256

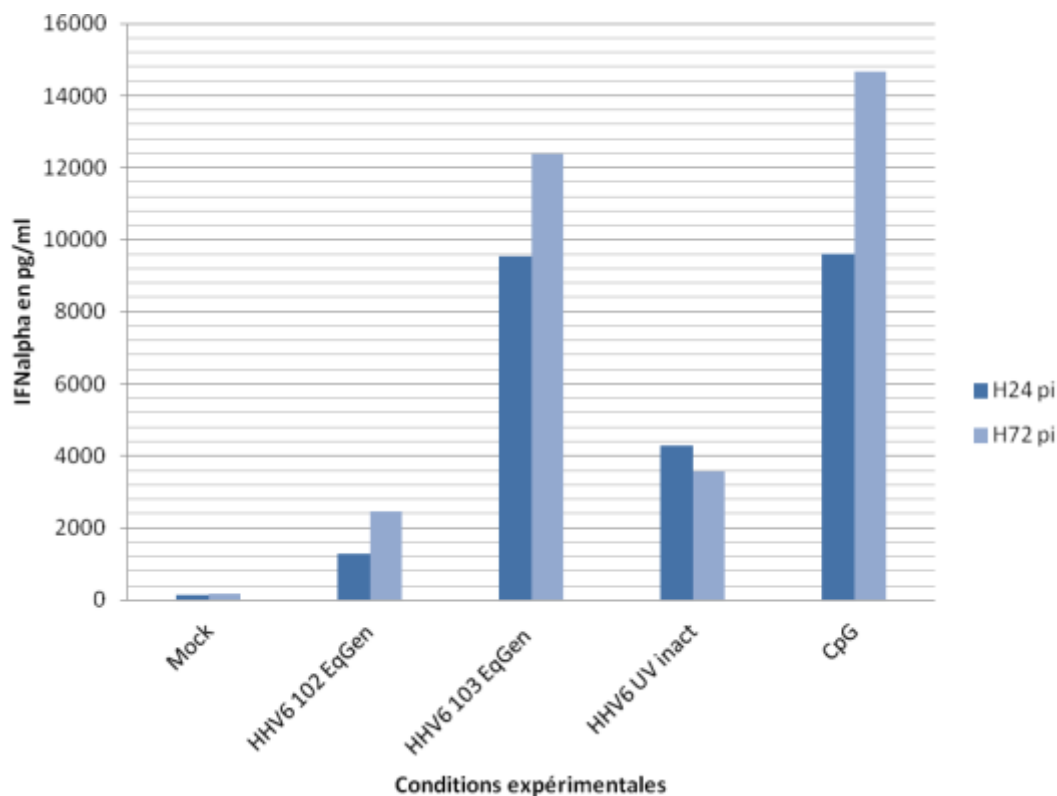


MFI	H0	H24	H72
Mock	15868	46075	34749
10 <sup>2</sup> eq gen	18195	37345	26632
10 <sup>3</sup> eq gen	9925	41245	46244
Inactivé	21990	27929	21929
CpG	39641		83142

### *Production d'IF alpha par les pDCs après stimulation virale.*

Le dosage d'IF alpha est réalisé à partir du surnageant de culture récupéré à H24 et H72 post-infection. Plusieurs conditions de culture sont analysées: pDCs sans virus (mock) ou en présence du virus ( $10^2$  et  $10^3$  équivalent génome) et virus inactivé ( $10^3$  eq gen). Les pDCs sécrètent de l'IF alpha uniquement en présence du virus (inactivé ou non) et du CpG (contrôle positif). Le niveau de sécrétion est dépendant de la quantité de virus présente et persiste à H72. La sécrétion d'IF alpha est aussi plus faible quand les pDCs sont cultivées en présence de virus inactivé. (**Figure 28**).

**Figure 28:** Production d'IF alpha par les pDCS à H24 et H72 en fonction des différentes conditions de culture.



Abréviations : pi : post-infection ; inact : inactivé, pDCs : cellules dendritiques plasmacytoïdes.

## **DISCUSSION ET PERSPECTIVES:**

Notre travail a donc consisté à étudier les conséquences fonctionnelles d'une infection *in vitro* de pDCs humaines par la souche virale HHV-6B HST. Nous avons mis en évidence un certain nombre de résultats suite à cette infection.

Premièrement, sur le plan phénotypique, les pDCs cultivées en présence d'IL-3, avec ou sans virus, acquièrent un caractère semi-mature à H24 avec modification morphologique et acquisition de dendrites, expression des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 et expression partielle du CD83. On note également une augmentation de la MFI (et donc du nombre de sites antigéniques) pour les molécules HLA classes 1 et 2 et pour le récepteur membranaire du virus HHV-6, le CD46. A H72, le pourcentage d'expression du CD83 et les MFI des molécules HLA classes 1 et 2 diminuent pareillement avec ou sans virus (à l'exception des classes 1 et 2 pour la condition  $10^3$  eq génome). La seule différence notable à H72 est l'induction d'une moindre expression du CD80 et du CD86 en présence du virus inactivé ou non. Notre étude est la première à notre connaissance à rapporter l'étude des modifications phénotypiques qui se produisent au niveau des pDCs après exposition au virus HHV-6. Cette étude est rendue difficile d'interprétation dans la mesure où les pDCs nécessitent la présence d'IL3 pour survivre *in vitro* (Grouard et al, 1997), ce qui a pour conséquence d'entraîner une sur-expression des marqueurs de maturation et de co-stimulation (revue dans Liu, 2005). Notre étude montre néanmoins que les pDCs perdent en maturité à H72 (baisse de l'expression du CD83) tout en conservant la possibilité d'une costimulation. HHV-6 semble induire une capacité moindre des pDCs à stimuler les cellules lymphocytaires T (baisse de l'expression du CD80 et du CD86). Ce probable mécanisme d'évasion immune du virus ne nécessite pas sa réplication intracellulaire puisque ce phénomène est pareillement observé en présence d'HHV-6 inactivé ou non. Ces données doivent bien sûr être confirmées par d'autres équipes.

La modification ou l'altération phénotypique des cibles cellulaires (lymphocytes T, NK ou cellules dendritiques monocytoïdes) par HHV-6 est bien connue: sur-expression ou expression de novo du CD4 (Flamand et al, 1998 ; Lusso et al, 1991 & 1993 & 1995, Vignoli et al, 2000) et du CD83 (Kakimoto et al, 2002) ou au contraire baisse d'expression ou régulation négative du CD46 (Santoro et al, 1999 ; Grivel et al, 2003), du complexe CD3/TcR (Lusso et al, 1991, Furukawa et al, 1994 ; Grivel et al, 2003), des molécules DC-SIGN (Niiya et al, 2004) et CXCR4 (Yasukawa et al, 1999). Concernant les molécules de co-stimulation ou HLA, des résultats contradictoires sont rapportés dans la littérature après culture d'HHV-6 avec les mDCs. Ainsi, le CD80, CD86 ou le HLA classe 1 et 2 sont retrouvés soit sur-exprimés (Kakimoto et al, 2002) soit au contraire sous-exprimés (Smith et al, 2005 ; Takemoto et al, 2009). Il n'y a pas d'explication claire à ces résultats différents. Les pDCs en réponse au virus HHV-6 semblent avoir un comportement mixte puisque on observe ici une baisse d'expression du CD80 et du CD86 sans augmentation du CD83 et une modulation positive des molécules HLA et du CD46. Les pDCs semblent également avoir un comportement différent en fonction du virus auquel elles sont exposées. Ainsi, en présence du CMV, il a été rapporté une sur-expression des molécules HLA classe 2 et du CD83 sans expression du CD80 et du CD86, exactement donc le contraire de ce que nous observons avec HHV-6 (Varani et al, 2007). Avec le virus HHV-8, un autre comportement est observé avec une sur-expression du CD83 et du CD86 (West et al, 2011). Ces résultats montrent la complexité et l'hétérogénéité à la fois des réponses à une stimulation virale par les pDCs humaines mais aussi des mécanismes d'évasion immune potentiels présentés par les herpesvirus. Ces données doivent bien sûr être confortés par d'autres équipes.

Notre deuxième objectif était de montrer s'il existait une permissivité du virus HHV-6 dans les pDCs humaines périphériques. Malheureusement, les techniques de PCR et de la RT-PCR ne permettent pas de conclure pour le moment. Une étape de lyse de l'ADN extracellulaire

par une DNase semble nécessaire pour les prochaines analyses. Il sera de toute façon peut-être difficile d'obtenir la détection d'antigènes viraux tardifs car le cycle de réplication du virus demande 72h et on sait qu'à partir de ce délai, les pDCs meurent rapidement. Il faudra aussi probablement utiliser un inoculum génomique plus important en nombre de copies pour les prochaines expériences afin d'obtenir des résultats significatifs. Nos résultats ne permettent pas pour le moment de répondre à la question de la permissivité ou non des pDCs vis-à-vis du virus HHV-6, comme suggéré par Takemoto et al (2009). En effet, sur le plan phénotypique, comme nous venons de le voir, il n'y a pas de différence observée concernant les modifications des marqueurs de surface entre culture avec virus inactivé ou non (plutôt en faveur de la non permissivité des cellules). D'un autre côté, la production d'IF alpha par les pDCs est obtenue aussi bien avec le virus activé qu'inactivé, ce qui traduit une sécrétion dépendante soit de l'entrée du virus par endocytose soit d'une infection productive par HHV-6, mais néanmoins une sécrétion plus importante à  $10^3$  eq gen avec le virus actif vs le virus inactivé est observée, ce qui serait plutôt en faveur d'une permissivité des pDCs. De plus, la production d'IF alpha persiste à H72, ce qui semble également contradictoire avec ce qui est rapporté dans la littérature où la production semble diminuer normalement après H24 (Liu, 2005). Il pourrait s'agir là encore d'une réponse particulière des pDCs vis-à-vis du virus HHV-6. On sait là encore que le comportement des pDCs est différent d'un herpesvirus à un autre puisque il a été démontré que les pDCs étaient non permissives pour le CMV et l'EBV (Varani et al, 2007 ; Fiola et al, 2010) et permissives pour le virus HHV-8 (West et al, 2011). Si le CMV, l'EBV et HHV-6 ne se répliquent pas dans les pDCs obtenues à partir de sang périphérique, il faut peut-être aussi évoquer un comportement différent selon l'origine des pDCs. On pourrait faire l'hypothèse par exemple d'une permissivité au contraire des pDCs placentaires vis-à-vis du virus HHV-6 pour expliquer l'augmentation de fréquence des infections HHV-6 après greffe de sang de cordon. Une étude des pDCs placentaires en



présence d'HHV-6 serait donc intéressante pour observer si le comportement de ces cellules diffère des pDCs périphériques mais reste difficile à entreprendre du fait de la faible quantité de pDCs retrouvée dans le sang placentaire. Ceci remet d'ailleurs en question les résultats observés par la seule équipe ayant, à notre connaissance, rapportée les conséquences d'une co-culture pDCs placentaires/HHV-6 (souche Z29, virus inactivé d'emblée). L'utilisation d'un virus inactivé ne permet pas de toute façon de trancher ou non sur la capacité à se répliquer du virus HHV-6 dans les pDCs placentaires. Dans cette étude également la production d'IF alpha est observée à H24. Il n'y a pas de données à H72 (Nordstrom et al, 2010 & 2012). On pourrait envisager dans un premier temps de travailler sur des cellules nucléées de sang placentaire non triées pour l'étude des modifications phénotypiques et la sécrétion d'IF alpha des pDCs consécutives à une co-culture avec le virus.

En conclusion, l'activation des pDCs humaines issues de sang périphérique semble être différente d'un herpesvirus à un autre. HHV-6B induit une altération de maturation des pDCs qui ne se traduit pas par une baisse de sécrétion d'IF alpha, production qui est même observée jusqu'à 72 heures. Nous allons poursuivre nos expériences pour d'une part consolider les résultats déjà obtenus et d'autre part pour savoir si les pDCs sont permissives ou non à l'HHV-6.

## **CONCLUSION GENERALE**

Notre travail de thèse démontre donc l'influence de l'origine du greffon sur la réactivation HHV-6 après allogreffe de CSH chez l'adulte. L'infection à HHV-6 est observée ainsi chez la quasi majorité des patients greffés avec un sang placentaire et ce jusqu'à au moins 9 mois post-allogreffe. La différence reste significative en analyse multivariée lorsque l'on compare greffe de sang placentaire et greffe de CSP. Dans cette même étude, nous avons observé des incidences d'infections à CMV et EBV comparables entre les deux groupes, alors que le CMV, par exemple, est un virus très proche d'HHV-6. Nous avons cherché dans un deuxième temps à expliquer cette différence très frappante qui se confirme à l'heure actuelle dans notre expérience quotidienne et fait l'objet de publications régulières. Notre point de départ a été la comparaison de la composition cellulaire des différents greffons utilisés pour l'allogreffe (moelle, CSP et cordons). Nous avons mis en évidence, dans le greffon placentaire, associé au déficit bien connu en lymphocytes T et B mémoires, une carence importante et significative (en valeur absolue et en pourcentage) en cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs). Ces cellules sont impliquées de manière professionnelle dans la défense anti-virale de l'organisme humain grâce à la production massive d'interferon de type 1 (alpha et bêta). Ce déficit en pDCs n'explique pas en lui-même l'accroissement des infections HHV-6 après allogreffe de sang placentaire, dans la mesure où l'on devrait constater une réactivation également plus importante du CMV ou de l'EBV par exemple. Une des hypothèses pourrait être une permissivité des pDCs placentaires à l'HHV-6 et une non permissivité des pDCs périphériques au virus. On peut ainsi imaginer qu'HHV-6 pourrait opérer un contrôle sur les pDCs placentaires, conduisant à un mécanisme d'évasion immune et une incidence d'infection plus importante que celle constatée pour le CMV ou l'EBV. Les données concernant une permissivité des pDCs périphériques du virus HHV-6 découle d'une seule étude dont la méthodologie reste discutable. Nous avons donc réalisé dans le cadre de ce

travail nos propres cultures *in vitro* de pDCs humaines périphériques avec la souche HHV-6B HST. Nos premiers résultats ne permettent pas de conclure à la permissivité ou non des pDCs périphériques pour le virus HHV-6. On sait déjà néanmoins que les pDCs périphériques ne sont pas permissives pour le CMV et de l'EBV alors qu'elles le sont pour HHV-8, et présentent donc un comportement différent d'un virus à l'autre. On peut faire l'hypothèse que ce comportement peut également être différent en fonction de l'origine, périphérique ou placentaire, des pDCs. Une étude de l'infection virale des pDCs placentaires semble ainsi importante à mener dans le futur dans le cadre de la poursuite de ce travail. Finalement, nous avons cherché à évaluer s'il existe des différences dans le niveau d'expression du récepteur membranaire du virus, le CD46, dans les différents greffons, en suspectant en particulier une sur-expression de ce récepteur dans les échantillons placentaires. D'une manière surprenante, nous montrons que l'expression du CD46 est significativement diminuée sur tous les composants cellulaires des greffons placentaires, et ne peut donc pas être une explication pour l'augmentation de fréquence des infections HHV-6 après greffe de sang placentaire. Nous savons qu'il existe un ou d'autres récepteurs membranaires pour HHV-6, mais celui-ci ou ceux-ci reste(nt) à découvrir. Une hypothèse est qu'il pourrait s'agir de molécule(s) ubiquitaire(s), comme le CD46, appartenant peut-être également comme lui à la famille des protéines régulant le complément, protéines impliquées largement dans l'immunité innée contre les pathogènes, et en particulier les virus. L'étude de l'infection à HHV-7 après greffe de sang placentaire constitue une autre piste à étudier dans la mesure où il a été rapporté que ce virus, le plus proche d'HHV-6, était nécessaire à la réplication de ce dernier.

En conclusion, le mystère de l'augmentation de la fréquence des infections HHV-6 après greffe de sang placentaire reste donc entier pour le moment. L'étude de la reconstitution immune, en particulier à la recherche de cellules cibles *in vivo* pour l'HHV-6, pourra peut-être apporter des explications complémentaires dans le futur.

# REFERENCES

Ablashi DV, Salahuddin SZ, Josephs SF, et al. HBLV (or HHV-6) in human cell lines. *Nature* 1987 ; 329 : 207.

Ablashi DV, Lusso P, Hung CL, et al. Utilization of human hematopoietic cell lines for the propagation and characterization of HBLV (human herpesvirus-6). *Int J Cancer* 1988; 42: 787-791.

Ablashi DV, Lusso P, Hung CL, et al. Utilization of human hematopoietic cell lines for the propagation and characterization of HBLV (human herpesvirus-6). *Dev Biol Stand* 1989; 70: 139-146.

Ablashi DV, Balachandran N, Josephs SF, et al. Genomic polymorphism, growth properties and immunologic variations in human herpesvirus-6 isolates. *Virology* 1991; 184: 545-552.

Achour A, Malet I, Le Gal F, et al. Variability of gB and gH genes of human herpesvirus-6 among clinical specimens. *J Med Virol* 2008; 80: 1211-21.

Adler SP, McVoy M, Chou S, et al. Antibodies induced by a primary cytomegalovirus infection react with human herpesvirus 6 proteins. *J Infect Dis* 1993; 168: 1119-26.

Agut H. Deciphering the clinical impact of acute human herpesvirus 6 (HHV-6) infections. *J Clin Virol* 2011; 52: 164-171.

Aldebert D, Diallo M, Niang M, et al. Differences in circulating dendritic cell subtypes in peripheral, placental and cord blood in African pregnant women. *Journal of Reproductive Immunology* 2007; 73: 11-19.

Andersson BS, Valdez BC, de Lima M, et al. Clofarabine +- fludarabine with once daily i.v. busulfan as pretransplant conditioning therapy for advanced myeloid leukemia and MDS. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011; 17: 893-900.

André-Garnier E, Robillard N, Costa-Mattioli M, et al. 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* 2003; 108: 213-222.

Andre-Garnier E, Milpied N, Boutolleau D, et al. Reactivation of human herpesvirus 6 during ex vivo expansion of circulating CD34+ haematopoietic stem cells. *J Gen Virol* 2004; 85: 3333-6.

Aoudjhane M, Labopin M, Gorin NC, et al. Comparative outcome of reduced intensity and myeloablative conditioning regimen in HLA identical sibling allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for patients older than 50 years of age with acute myeloblastic leukaemia: a retrospective survey from the Acute Leukaemia Working Party (ALWP) of the European group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Leukemia* 2005; 19: 2304-2312.

Appelbaum FR. Hematopoietic-cell transplantation at 50. *N Engl J Med* 2007; 357: 1472-1475.

Arpinati M, Green CL, Heimfeld S, et al. Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes Thelper 2-inducing dendritic cells. *Blood* 2000; 95: 2484-2490.

Arpinati M, Chirumbolo G, Urbini B, et al. Role of plasmacytoid dendritic cells in immunity and tolerance after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Immunol* 2003; 11: 345-356.

Arsenault S, Gravel A, Gosselin J, Flamand L. Generation and characterization of a monoclonal antibody specific for human herpesvirus 6 variant A immediate-early 2 protein. *J Clin Virol* 2003; 3: 284-90.

Asada H, Yalcin S, Balachandran K, et al. Establishment of titration system for hman herpesvirus 6 and evaluation of neutralizing antibody response to the virus. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2204-2207.

Astier A, Trescol-Biemont MC, Azocar O, et al. Cutting edge: CD46, a new costimulatory molecule for T cells that induces p120CBL and LAT phosphorylation. *J Immunol* 2000; 164: 6091-6095.

Astier AL, Meiffren G, Freeman S, et al. Alterations in CD46-mediated Tr1 regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2006; 116: 3252-3257.

Aubin JT, Agut H, Collandre H, et al. Antigenic and genetic differentiation of the two putative types of human herpes virus 6. *J Virol Methods* 1993; 41: 223-34.

Aubin JT, Poirel L, Robert C et al. Identification of human herpesvirus 6 variants A et B by amplimer hybridization with variant-specific oligonucleotides and amplification with variant-specific primers. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2434-40.

Banchereau J & Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-252.

Barchet W, Cella M, Odermatt B, et al. Virus-induced interferon alpha production by a dendritic cell subset in the absence of feedback signaling in vivo. *J Exp Med* 2002; 195: 507-16.

Barker JN, Martin PL, Coad JE, et al. Low incidence of Epstein-Barr virus-associated posttransplantation lymphoproliferative disorders in 272 unrelated-donor umbilical cord blood transplant recipients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; 7: 395-99.

Behzad-Behbahani A, Pouransari R, Tabei SZ, et al. Risk of viral transmission via bone marrow progenitor cells versus umbilical cord blood hematopoeitic stem cells in bone marrow transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 3211-3212.

Bettens F, Passweg J, Schanz U, et al. Impact of HLA-DPB1 haplotypes on outcome of 10/10 matched unrelated hematopoietic stem cell donor transplants depends on MHC-linked microsatellite polymorphisms. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012; 18: 608-16.

Betts BC, Young JA, Ustun C, et al. Human herpesvirus 6 infection after hematopoietic cell transplantation: is routine surveillance necessary? *Biol Blood Marrow Transplant* 2011; 17: 1562-1568.

Beziat V, Nguyen S, Lapusan S, et al. Fully functional NK cells after unrelated cord blood transplantation. *Leukemia* 2009; 23: 721-8.

Black JB, Sanderlin KC, Goldsmit CS, et al. Growth properties of human herpesvirus-6 strain Z29. *J Virol Methods* 1989; 26: 133-145.

Black JB, Burns DA, Goldsmith CS, et al. Biologic properties of human herpesvirus 7 strain SB. *Virus Res* 1997; 52: 25-41.

Bonnafous P, Boutolleau D, Naesens L, et al. Characterization of a cidofovir-resistant HHV-6 mutant obtained by in vitro selection. *Antiviral Res* 2008; 77: 237-40.

Bonnet D, Bhatia M, Wang JCY, et al. Cytokine treatment or accessory cells are required to initiate engraftment of purified primitive human hematopoietic cells transplanted at limiting doses into NOD/SCID mice. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 203-209.

Borras FE, Matthews NC, Lowdell MW, Navarette CV. Identification of both myeloid CD11c+ and lymphoid CD11c- dendritic cell subsets in cord blood. *Br J Haematol* 2001; 113: 925-931.

Bossard C, Malard F, Arbez J, et al. Plasmacytoid dendritic cells and Th17 immune response contribution in gastrointestinal acute graft-versus-host disease. *Leukemia* 2012; 26: 1471-4.

Boutolleau D, Fernandez C, Andre 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: 179-186.

Breese Hall C, Caserta MT, Schnabel K, et al. Chromosomal integration of human herpesvirus 6 is the major mode of congenital human herpesvirus 6 infection. *Pediatrics* 2008; 122: 513-520.

Bressollette-Bodin C, Coste-Burel M, Besse B, et al. 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: 90-98.

Brown J & Boussiotis VA. Umbilical cord blood transplantation: basic biology and clinical challenges to immune reconstitution. *Clin Immunol* 2008; 127: 286-297.

Brown JC & Newcomb WW. Herpesvirus capsid assembly: insights from structural analysis. *Curr Opin Virol* 2011; 1 : 142-149.

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 non myeloablative conditioning prior to unrelated umbilical cord blood transplantation. *Blood* 2006; 108: 2874-2880.

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: 3064-3070.

Buchwald D, Freedman AS, Ablashi DV, et al. A chronic “postinfectious” fatigue syndrome associated with benign lymphoproliferation, B-cell proliferation, and active replication of human herpesvirus-6. *J Clin Immunol* 1990; 335-44.

Burd E, Knox KK, Carrigan DR, et al. Human herpes virus 6-associated suppression of growth factor-induced macrophage maturation in human bone marrow cultures. *Blood* 1993; 81: 1645-1650.

Cahn JY, Klein JP, Lee SJ, et al. Prospective evaluation of 2 acute graft-versus-host (GVHD) grading systems: a joint Société Française de Greffe de Moelle et Thérapie Cellulaire (SFGM-TC), Dana Farber Cancer Institute (DFCI) and International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) prospective study. *Blood* 2005; 106: 1495-500.

Campadelli-Fiume G, Guerrini S, Liu X, et al. Monoclonal antibodies to glycoprotein B differentiate human herpesvirus 6 into two clusters, variants A and B. *J Gen Virol* 1993; 74: 2257-62.

Cardenas PA, Huang Y, Ildstad ST. The role of pDC, recipient Treg and donor Treg in HSC engraftment. *Chimerism* 2011; 2: 65-70.

Cardone J, Le Fric G, Vantourout P, et al. Complement regulator CD46 temporally regulates cytokine production by conventional and unconventional T cells. *Nat Immunol* 2010; 11: 862-871.

Cardone J, Le Fric G, Kemper C. CD46 in innate and adaptive immunity: an update. *Clin Exp Immunol* 2011; 164: 301-11.

Carrigan DR, Knox KK. Bone marrow suppression by human herpesvirus-6: comparison of the A and B variants of the virus. *Blood* 1995; 86: 835-6.

Cattaneo R. Four viruses, two bacteria, and one receptor: membrane cofactor protein (CD46) as pathogens' magnet. *J Virol* 2004; 78: 4385-4388.

Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, et al. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 1999; 5: 919-23.

Chae YS, Sohn SK, Kim JG, et al. New myeloablative conditioning regimen with fludarabine and busulfan for allogeneic stem cell transplantation: comparison with BuCy2. *Bone Marrow Transplant* 2007; 40: 541-7.

Challoner PB, Smith KT, Parker JD, et al. Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *PNAS USA* 1995; 92: 7440-7444.

Chaperot L, Bendriss O, Manches R, et al. Identification of a leukemic counterpart of the plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 2001; 97: 3210-3217.

Chen YB, Aldridge J, Kim HT, et al. Reduced-intensity conditioning stem cell transplantation: comparison of double umbilical cord blood and unrelated donor grafts. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012; 18: 805-812.

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: 1204-1211.

Chevallier P, Szydlo RM, Blaise D, et al. Reduced-intensity conditioning prior to allogeneic hematopoietic stem Cell transplantation in patients over 60 years: a report from the SFGM-TC. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012; 18: 289-94.

Cisse B, Caton ML, Lehner M, et al. Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development. *Cell* 135: 37-48.

Ciurea SO & Andersson BS. Busulfan in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009; 15: 523-536.

Clark DA & Griffiths PD. Human herpesvirus 6: relevance of infection in the immunocompromised host. *Br J Hematol* 2003; 120: 384-395.

Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 2006; 354: 1813-26.

Crough T & Khanna R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22: 76-98.

Daibata M, Taguchi T, Kamioka M, et al. Identification of integrated human herpesvirus 6 DNA in early pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1998; 12: 1002-1004.

Daibata M, Taguchi Y, Nemoto H, et al. Inheritance of chromosomally integrated human herpesvirus 6 DNA. *Blood* 1999; 94: 1545-1549.

De Bolle L, Naesens L, De Clercq E. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clinical Microbiology reviews* 2005; Vol 18, 217-245.

De Clercq E, Naesens L, De Bolle L, et al. Antiviral agents active against human herpesviruses HHV-6, HHV-7 and HHV-8. *Rev Med Virol* 2001; 11: 381-395.

De Clercq E. Clinical potential of the acyclic nucleoside phosphonates cidofovir, adefovir and tenofovir in treatment of DNA virus and retrovirus infections. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 569-596.

Demiriz IS, Tekgunduz E, Altuntas F. What is the most appropriate source for hematopoietic stem cell transplantation? Peripheral Stem Cell/Bone Marrow/Cord Blood. *Bone Marrow Res* 2012; 834040.

De Pagter PJ, Shuurman R, Visscher H, et al. Human herpesvirus 6 plasma DNA positivity after hematopoietic stem cell transplantation in children: an important risk factor for clinical outcome. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14: 831-9.



De Pagter PJ, Virgili A, Nacheva E, et al. Chromosomally integrated human herpesvirus 6: transmission via cord blood-derived unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; 16: 130-2.

Dewhurst S. Human herpesvirus type 6 and human herpesvirus type 7 infections of the central nervous system. *Herpes* 2004; 11 Suppl2:105A-111A.

DesJardin JA, Cho E, Supran S, et al. Association of human herpesvirus 6 reactivation with severe cytomegalovirus-associated disease in orthotopic liver transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 1358-1362.

Dockrell DH. Human herpesvirus 6: molecular biology and clinical features. *Journal of Medical Microbiology* 2003; 52: 5-18.

Dominguez G, Dambaugh TR, Stamey FR, et al. Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus A. *J Virol* 1999; 73: 8040-8052.

Downing RG, Sewankambo N, Serwadda D, et al. Isolation of human herpesviruses from Uganda. *Lancet* 1987; 2: 390.

Drobyski WR, Dunne WM, Burd EM, et al. 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* 1993; 167: 735-739.

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: 1080-9.

Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, et al. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2000; 165: 6037-6046.

Eapen M, Rubinstein P, Zhang MJ, et al. Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. *Lancet* 2007; 369: 1947-54.

Eapen M, Klein JP, Sanz GF. Effect of donor-recipient HLA matching at HLA A, B, C, and DRB1 on outcomes after umbilical-cord blood transplantation for leukaemia and myelodysplastic syndrome: a retrospective analysis. *Lancet Oncol* 2011; 12: 1214-21.

Favre G, Beksac M, Bacigalupo A, Ruutu T, Nagler A, Gluckman E et al. Differences between graft product and donor side effects following bone marrow or stem cell donation. *Bone Marrow Transplant* 2003; 32: 873-880.

Fauquet CM & Fargette D. International Committee on taxonomy of viruses and the 3,142 unassigned species. *Virol J* 2005, 2: 64.

Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet* 2009; 373: 1550-1561.

Feuillard J, Jacob MC, Valensi F, et al. Clinical and biological features of CD4(+)CD56(+) malignancies. *Blood* 2002; 99: 1556-63.

Fillet AM, Reux C, Joberty JG, et al. Detection of human herpes virus 6 in AIDS-associated retinitis by means of in situ hybridization, polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *J Med Virol* 1996; 49: 289-295.

Fiola S, Gosselin D, Takada K, et al. TLR9 contributes to the recognition of EBV by primary monocytes and plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2010; 185: 3620-31.

Flamand L, Romerio F, Reitz MS, et al. CD4 promoter transactivation by human herpesvirus 6. *J Virol* 1998; 72: 8797-8805.

Foa-Tomasi L, Guerrini S, Huang T, et al. Characterization of human herpesvirus-6 (U1102) and (GS) gp112 and identification of the Z29-specified homolog. *Virology* 1992; 191: 511-6.

Fogdell-Hahn A, Soldan SS, Shue S, et al. Co-purification of soluble membrane cofactor protein (CD46) and human herpesvirus 6 variant A genome in serum from multiple sclerosis patients. *Virus Res* 2005; 110: 57-63.

Furukawa M, Yasukawa M, Yakusijin Y, et al. Distinct effects of human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 on surface molecule expression and function of CD4+ T cells. *J Immunol* 1994; 152: 5768-5775.

Gandhi KL, Domen J, Aguila H, Weissman IL. CD8+TCR+ and CD8+TCR- cells in whole bone marrow facilitate the engraftment of hematopoietic stem cells across allogeneic barriers. *Immunity* 1999; 11: 579-90.

Gautheret-Dejean A, Dejean O, Vastel L, et al. Human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 in the bone marrow from healthy subjects. *Transplantation* 2000; 69: 1722-1723.

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: 27-35.

Geis N, Zell S, Rutz R, et al. Inhibition of membrane complement inhibitor expression (CD46, CD55, CD59) by siRNA sensitizes tumor cells to complement attack in vitro. *Curr Cancer Drug Targets* 2010; 10: 922-931.

Ghosh HS, Cisse B, Bunin A, et al. Continuous expression of E2-2 maintains the cell fate of mature plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 2010; 33: 905-16.

Gill DB, Koomey M, Cannon JG, et al. Down-regulation of CD46 by pilated *Neisseria gonorrhoeae*. *J Exp Med* 2003; 198: 1313-1322.

Giralt S, Estey E, Albitar M, et al. Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy. *Blood* 1997; 89: 4531-6.

Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989; 321: 1174-1178.

Glucksberg H, Storb R, Fefer A, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HLA matched sibling donors. *Transplantation* 1974; 18: 295-304.

Gompels UA & Macaulay HA. Characterization of human telomeric repeat sequences from human herpesvirus 6 and relationship to replication. *J Gen Virol* 1995; 76: 451-458.

Greenstone HL, Santoro F, Lusso P, et al. Human herpesvirus 6 and measles virus employ distinct CD46 domains for receptor function. *J Biol Chem* 2002; 277: 39112-39118.

Grivel JC, Santoro F, Chen S, et al. Pathogenic effects of human herpesvirus 6 in human lymphoid tissue ex vivo. *J Virol* 2003; 77: 8280-8289.

Grouard G, Risoan MC, Filgueira L, et al. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand (*J Exp Med* 1997; 185: 1101-1111.

Gyurkocza B, Rezvani A, Storb RF. Allogeneic hematopoietic cell transplantation: the state of the art. *Expert Rev Hematol* 2010; 3: 285-99.

Hadeiba H, Sato T, Habtezion A, et al. CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nat Immunol* 2008; 9: 1253-60.

Hagendorens MM, Ebo DG, Schuerwegh AJ, et al. Differences in circulating dendritic cell subtypes in cord blood and peripheral blood of healthy and allergic children. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 633-639.

Hall CB, Caserta MT, Schnabel KC, et al. Persistence of human herpesvirus 6 according to site and variant: possible greater neurotropism of variant A. *Clinical Infectious Diseases* 1998; 26: 132-137.

Hamza NS, Lisgaris M, Yadavalli G, et al. Kinetics of myeloid and lymphocyte recovery and infectious complications after unrelated umbilical cord blood versus HLA-matched unrelated donor allogeneic transplantation in adults. *Brit J Haematol* 2004; 124: 488-498.

Hoffmann A, Kirn E, Kuerten A, et al. Active human herpesvirus-6 (HHV-6) infection associated with Kikuchi-Fujimoto disease and systemic lupus erythematosus (SLE). *In Vivo* 1991; 5: 265-9.

Huang Y, Cramer DE, Ray MB, et al. The role of alphabeta- and gammadelta- T cells in allogeneic donor marrow on engraftment, chimerism, and graft-versus-host disease. *Transplantation* 2001; 72: 1907-14.

Hubacek P, Hyncicova K, Muzikova K, et al. Disappearance of pre-existing high HHV-6 DNA load in blood after allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2007; 40: 805-806.

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* 2000; 31: 881-6.

Isegawa Y, Mukai T, Nakano K, et al. Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B. *J Virol* 1999; 73: 8053-63.

Ishiyama K, Katagiri T, Hoshino T, et al. Pre-emptive therapy of human herpesvirus-6 encephalitis with foscarnet sodium for high-risk patients after hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2011; 46: 863-9.

Izaguirre A, Barnes BJ, Amrute S, et al. Comparative analysis of IRF and IFN- $\alpha$  expression in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2003; 74: 1125-38.

Jabara HH, Angelini F, Brodeur SR, et al. Ligation of CD46 to CD40 inhibits CD40 signaling in B cells. *Int Immunol* 2011; 23: 215-221.

Jung D & Dorr A. Single-dose pharmacokinetics of valganciclovir in HIV- and CMV-seropositive subjects. *J Clin Pharmacol* 1999; 39: 800-4.

Kadowaki N, Antonenko S, Lau JY, et al. Natural interferon alpha/beta producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 2000; 192: 219-226.

Kakimoto M, Hasegawa A, Fujita S, et al. Phenotypic and functional alterations of dendritic cells induced by human herpesvirus 6 infection. *J Virol* 2002; 76: 10338-10345.

Kamani N, Spellman S, Hurley CK, et al. State of the art review: HLA matching and outcome of unrelated donor umbilical cord blood transplants. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14: 1-6.

Kamble RT, Clark DA, Leong HN, et al. Transmission of integrated human herpesvirus-6 in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007; 40: 563-566.

Katsafanas GC, Schirmer EC, Wyatt LS, Frenkel N. *In vitro* activation of human herpesviruses 6 and 7 from latency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9788-9792.

Kaufman CL, Colson YL, Wren SM, et al. Phenotypic characterization of a novel bone marrow-derived cell that facilitates engraftment of allogeneic bone marrow stem cells. *Blood* 1994; 84: 2436-2446.

Kawabata A, Oyaizu H, Maeki T, et al. Analysis of a neutralizing antibody for human herpesvirus 6B reveals a role for glycoprotein Q1 in viral entry. *J Virol* 2011; 85: 12962-71.

Kemper C, Chan AC, Green JM, et al. Activation of human CD4(+) cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature* 2003; 421: 388-392.

Kim DD, Song WC. Membrane complement regulatory proteins. *Clin Immunol* 2006; 118: 127-36.

Klein J & Sato A. The HLA system: First of two-parts. *N Engl J Med* 2000; 343: 702-9.

Klein J & Sato A. The HLA system: second of two-parts. *N Engl J Med* 2000; 343: 782-6.

Knox KK & Carrigan DR. In vitro suppression of bone marrow progenitor cell differentiation by human herpesvirus 6 infection. *J Infect Dis* 1992; 165: 925-929.

Korbling M & Anderlini P. Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cell matter? *Blood* 2001; 98: 2900-2908.

Kositanont U, Wasi C, Wanprapar N, et al. Primary infection of human herpesvirus 6 in children with vertical infection of human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 1999; 180: 50-55.

Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P, et al. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med* 2004; 351: 2265-75.

Lautenschlager I & Razonable RR. Human herpesvirus -6 infections in kidney, liver, lung, and heart transplantation: review. *Transpl Int* 2012; 25: 493-502.

Le Bourgeois A, Loirat M, Tessoulin B, et al. Comparison of PBSC vs Cord Blood (CB) as stem cell source for reduced-intensity conditioning regimen (RIC) allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) in adult patients with haematological diseases: a single centre analysis. *Blood Annual ASH meeting, Atlanta 2012, abstract 3108.*

Lennert K & Remmele W. Karyometric research on lymph node cells in man. I. Germinoblasts, lymphoblasts & lymphocytes. *Acta Haematol* 1958; 19: 99-113.

Levine PH, Jahan N, Murari P, et al. Detection of human herpesvirus 6 in tissues involved by sinus histiocytosis with massive lymphadenopathy (Rosai-Dorfman disease). *J Infect Dis* 1992; 166: 291-5.

Liszewski MK & Atkinson JP. Membrane cofactor protein. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992; 178: 45-60.

Liu L, Papa EF, Dooner MS, et al. Homing and long-term engraftment of long- and short-term renewal hematopoietic stem cells. *Plos One* 2012; 7: e31300.

Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 2006; 203: 1701-1711.

Liu YJ. IPC: Professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 275-306.

Ljungman P, Wang FZ, Clark DA, et al. High levels of human herpesvirus 6 DNA in peripheral blood leucocytes are correlated to platelet engraftment and disease in allogeneic stem cell transplant patients. *Brit J Haematol* 2000; 111: 774-781.

- Ljungman P & Singh N. Human herpesvirus-6 infection in solid organ and stem cell transplant recipient. *J Clin Virol* 2006; 37: S87-91.
- 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: 227-240.
- Lopez C, Pellett P, Stewart J, et al. Characteristics of human herpesvirus-6. *J Infect Dis* 1988; 157: 1271-1279.
- Lopez MC, Palmer BE, Lawrence DA. Phenotypic differences between cord blood and adult peripheral blood. *Clinical Cytometry* 2009; 76: 37-46.
- Lovkvist L, Sjolinder H, Wehelie R, et al. CD46 contributes to the severity of group A streptococcal infection. *Infect Immun* 2008; 76: 3951-3958.
- Lublin DM, Liszewski MK, Post TW, et al. Molecular cloning and chromosomal localization of human membrane cofactor protein (MCP). Evidence for inclusion in the multigene family of complement-regulatory proteins. *J Exp Med* 1988; 168: 181-194.
- Luppi M, Barozzi R, Marasca R, Torelli G. Integration of human herpesvirus-6 (HHV-6) genome in chromosome 17 in two lymphoma patients. *Leukemia* 1994; 8: S41-S45.
- Luppi M, Barozzi P, Garber R, et al. Expression of human herpesvirus-6 antigens in benign and malignant lymphoproliferative diseases. *Am J Pathol* 1998; 153: 815-823.
- Lusso P, Salahuddin SZ, Ablashi DV, et al. Diverse tropism of human B-lymphotropic virus (human herpesvirus 6). *Lancet* 1987; 2: 743-744.
- Lusso P, Gallo RC, DeRocco, et al. CD4 is not the membrane receptor for HHV-6. *Lancet* 1989; 1: 730.
- Lusso P, Malnati M, De Maria A, et al. Productive infection of CD4+ and CD8+ mature human T cell populations and clones by human herpesvirus 6. Transcriptional down-regulation of CD3. *J Immunol* 1991a; 147: 685-691.
- Lusso P, De Maria A, Malnati M, et al. Induction of CD4 and susceptibility to HIV-1 infection in human CD8+ T lymphocytes by human herpesvirus 6. *Nature* 1991b; 349: 533-535.
- Lusso P, Malnati MS, Garzino-Demo A, et al. Infection of natural killer cells by human herpesvirus 6. *Nature* 1993; 362: 458-462.
- Lusso P, Secchiero P, Crowley RW, et al. CD4 is a critical component of the receptor for human herpesvirus 7: interference with human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 3872-3876.

Lusso P, Garzino-Demo A, Crowley RW, et al. Infection of gamma/delta T lymphocytes by human herpesvirus 6: transcriptional induction of CD4 and susceptibility to HIV infection. *J Exp Med* 1995; 181: 1336-1310.

Lusso P. HHV-6 and the immune system: mechanisms of immunomodulation and viral escape. *J Clin Virol* 2006; 37: S4-S10.

MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ, et al. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 2002; 100: 4512-4520.

Maeda Y, Teshima T, Yamada M, et al. Monitoring of human herpesviruses after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation and bone marrow transplantation. *Brit J Haematol* 1999; 105: 295-302.

Mahtout H, Chandad F, Rojo JM, et al. Porphyromonas gingivalis mediates the shedding and proteolysis of complement regulatory protein CD46 expressed by oral epithelial cells. *Oral Microbiol Immunol* 2009; 24: 396-400.

Majhail NS, Brunstein CG, Tomblyn M, et al. Reduced-intensity allogeneic transplant in patients older than 55 years: unrelated umbilical cord blood is safe and effective for patients without a matched related donor. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14: 282-289.

Malard F, Bossard C, Chevallier P, et al. Plasmacytoid dendritic cells (PDC) and TH17 immune response contribution in skin acute graft-versus-host disease (GVHD). *Blood* 2012, soumis.

Marie JC, Astier AL, Rivaller P, et al. Linking innate and acquired immunity : divergent role of CD46 cytoplasmic domains in T cell induced inflammation. *Nat Immunol* 2002; 3: 659-666.

Marie-Cardine A, Divay F, Dutot I, et al. Transitional B cells in humans: Characterisation and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. *Clinical Immunology* 2008; 127: 14-25.

Martin ME, Thomson BJ, Honess RW, et al. The genome of human herpesvirus 6: maps of unit-length and concatemeric genomes for nine restriction endonucleases. *J Gen Virol* 1991; 72: 157-168.

Martinelli E, Cicala C, Van Ryk D, et al. HIV-1 gp120 inhibits TLR9-mediated activation and IFN-alpha secretion in plasmacytoid dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci* 2007; 104: 3396-401.

Martino R, Iacobelli S, Brand R, et al. Retrospective comparison of reduced-intensity conditioning and conventional high-dose conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using HLA-identical sibling donors in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2006; 108: 836-846.

McKenna RW, Washington LT, Aquino DB, et al. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocytes precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry. *Blood* 2001; 98: 2498-2507.

McKenna K, Beignon AS, Bhardwaj N. Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity. *J Virol* 2005; 79: 17-27.

McSweeney PA, Niederwieser D, Shizuru JA, et al. Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects. *Blood* 2001; 97: 3390-3400.

Michallet M. Allogreffes de cellules souches hématopoiétiques. *Transfusion Clinique et Biologique* 2011 ; 18 : 235-245.

Mijovic A & Pamphilon D. Harvesting, processing and inventory management of peripheral blood stem cells. *Asian J Transfus Sci* 2007; 1: 16-23.

Miklos DB, Kim HT, Miller KH, et al. Antibody responses to H-Y minor histocompatibility antigens correlate with chronic graft-versus-host disease and disease remission. *Blood* 2005; 105: 2973-2978.

Mills KC, Gross TG, Varney ML, et al. Immunologic phenotype and function in human bone marrow, blood stem cells and umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplant* 1996; 18: 53-61.

Mohty M, Blaise D, Faucher C, et al. Impact of plasmacytoid dendritic cells on outcome after reduces intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 2005; 19: 1-6.

Mohty M, Labopin M, Volin L, et al. Reduced-intensity versus conventional myeloablative conditioning allogeneic stem cell transplantation for patients with acute lymphoblastic leukemia: a retrospective study from the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* 2010; 116: 4439-43.

Mori T, Tanaka-Taya K, Satoh H, et al. Transmission of chromosomally integrated human herpesvirus 6 (HHV-6) variant A from a parent to a children leading to misdiagnosis of active HHV-6 infection. *Transpl Infect Dis* 2009; 11: 503-6.

Mori Y, Seya T, Huang HL, et al. 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* 2002; 76: 6750-61.

Mori Y, Yang X, Akkapaiboon P, et al. Human herpes virus variant A glycoprotein H-glycoprotein L-glycoprotein Q complex associates with human CD46. *J Virol* 2003; 77: 4992-9.

Mori Y, Akkapaiboon P, Yonemoto S, et al. Discovery of a second form of tripartite complex containing gH-gL of human herpesvirus 6 and observations on CD46. *J Virol* 2004; 78: 4609-16.

Mori Y, Miyamoto T, Nagafuji K, et al. High incidence of human herpesvirus 6-associated encephalitis/myelitis following a second unrelated cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; 16: 1596-602.



- Morris C, Luppi M, McDonald M, et al. Fine mapping of an apparently targeted latent human herpesvirus type 6 integration site in chromosome band 17p13.3. *J Med Virol* 1999; 58: 69-75.
- Naik SH, Sathe P, Park HY, et al. Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat Immunol* 2009; 182: 1099-106.
- Naniche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F, et al. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol* 1993; 67: 6025-6032.
- Narimatsu H, Matsumura T, Kami M, et al. Bloodstream infection after cord blood transplantation using reduced-intensity stem cell transplantation for adult patients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11: 429-36.
- Ni Choilean S & Astier AL. CD46 processing: a means of expression. *Immunobiology* 2012; 217: 169-175.
- Niiya H, Azuma T, Jin L, et al. Transcriptional down-regulation of DC-SIGN in human herpesvirus 6-infected dendritic cells. *J Gen Virol* 2004. 85/ 2639-2642.
- Nordstrom I, Rudin A, Adlerberth I, et al. Infections of infant with human herpesvirus type 6 may be associated with reduced allergic sensitization and T-helper type 2 development. *Clin Exp Allergy* 2010; 40: 882-890.
- Nordstrom I & Ericksson K. HHV-6B induces IFN-Lambda 1 responses in cord plasmacytoid dendritic cells through TLR9. *Plos One* 2012; 7: e38683.
- Ogata M, Satou T, Kawano R, et al. Plasma HHV-6 viral load-guided preemptive therapy against HHV-6 encephalopathy after allogeneic stem cell transplantation: a prospective evaluation. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41: 279-85.
- Ogata M. Human herpesvirus 6 in hematological malignancies. *J Clin Exp Hematop* 2009; 49: 57-67.
- Ogata M, Satou T, Inoue Y, et al. Foscarnet against human herpesvirus (HHV)-6 reactivation after allo-SCT: breakthrough HHV-6 encephalitis following antiviral prophylaxis. *Bone Marrow Transplant* 2012; epub ahead of print, July 2th.
- O'Keeffe M, Grumont RJ, Hochrein H, et al. Distinct roles for the NF-kB1 and c-Rel transcription factors in the differentiation and survival of plasmacytoid and conventional dendritic cells activated by TLR-9 signals. *Blood* 2008; 112: 3713-22.
- Okuno T, Shao H, Asada H, et al. Analysis of a glycoprotein of human herpesvirus 6 (HHV-6) using monoclonal antibodies. *Virology* 1990; 176: 625-8.
- Okuno T, Shao H, Asada H, et al. Analysis of human herpesvirus 6 glycoproteins recognized by monoclonal antibody OHV1. *J Gen Virol* 1992; 73: 443-7.

Ottinger HD, Beelen DW, Scheulen B, et al. Improved immune reconstitution after allotransplantation of peripheral blood stem cells instead of bone marrow. *Blood* 1996; 88: 2775-2779.

Painter W, Robertson A, Trost LC. 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* 2012; 56: 2726-34.

Paloczi K. Immunophenotypic and functional characterization of human umbilical cord blood mononuclear cells. *Leukemia* 1999; 13: 87-89.

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* 2006; 12: 734-748.

Passweg JR, Baldomero H, Gratwohl A, et al. The EBMT activity survey: 1990-2010. *Bone Marrow Transplant* 2012; 47: 906-923.

Pellett PE, Black JB, Yamamoto M. Human herpesvirus 6: the virus and the search for its role as a human pathogen. *Adv Virus Res* 1992; 41: 1-52.

Pellett PE, Sanchez-Martinez D, Dominguez G, et al. 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* 1993; 195: 521-31.

Pellett PE, Ablashi DV, Ambros PF, et al. Chromosomally integrated human herpesvirus 6: questions and answers. *Rev Med Virol* 2012; 22: 144-55.

Pichereau C, Desseaux K, Janin A, et al. The complex relationship between human herpesvirus 6 and acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012; 18: 141-4.

Petropoulou AD & Rocha V. Risk factors and options to improve engraftment in unrelated cord blood transplantation. *Stem Cells International*, Volume 2011, Article ID 610514, 8 pages.

Piccoli AK, Alegretti AP, Schneider L, et al. Expression of complement regulatory proteins CD55, CD59, CD35 and CD46 in rheumatoid arthritis. *Rev Bras Reumatol* 2011; 51: 503-510.

Poli A, Michel T, Theresine M, et al. CD56 bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology* 2009; 126: 458-465.

Pulendran B, Banchereau J, Burkeholder S, et al. Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J Immunol* 2000; 165: 566-72.

Rajasekar R, Mathews V, Lakshmi KM, et al. Plasmacytoid dendritic cell count on day 28 in HLA-matched related allogeneic peripheral blood stem cell transplant predicts the incidence of acute and chronic GVHD. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14: 344-50.

Rapaport D, Engelhard D, Tagger G, et al. Antiviral prophylaxis may prevent human herpesvirus-6 reactivation in bone marrow transplant recipients. *Transplant Infectious Diseases* 2002; 4: 10-16.

Rapp JC, Krug LT, Inoue N, et al. 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* 2000; 268: 504-516.

Reizis B, Bunin A, Ghosh HS, et al. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu Rev Immunol* 2011; 29: 163-83.

Reymen D, Naesens L, Balzarini J, et al. Antiviral activity of selected acyclic nucleoside analogues against human herpesvirus 6. *Antivir Res* 1995; 28: 343-357.

Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, et al. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999; 283: 1183-1186.

Robert C, Agut H, Aubin JT, et al. Detection of antibodies to human herpesvirus-6 using immunofluorescence assay. *Res Virol* 1990; 141: 545-55.

Robert C, Massoneau V, Pothier P, et al. Selection and characterization of two specific monoclonal antibodies directed against the two variants of human herpesvirus-6. *Res Virol* 1998; 149: 403-11.

Robin M, Marque-Juilet S, Scieux C, et al. Disseminated adenovirus infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: incidence, risk factors and outcome. *Haematologica* 2007; 92: 1254-1257.

Rocha V, Labopin M, Sanz G, et al. Transplants of umbilical cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N Engl J Med* 2004; 351: 2276-2285.

Saavedra S, Sanz GF, Jarque I, et al. Early infections in adult patients undergoing unrelated donor cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2002; 30: 937-43.

Sackstein R. A revision of Billingham's tenets: the central role of lymphocyte migration in acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12: 2-8.

Safronetz D, Petric M, Tellier B, et al. Mapping ganciclovir resistance in the human herpesvirus-6 U69 protein kinase. *J Med Virol* 2003; 71: 434-439.

Sakurai F, Akitomo K, Kawabata K, et al. Down-regulation of human CD46 by adenovirus serotype 35 vectors. *Gene Ther* 2007; 14: 912-919.

Salahuddin SZ, Ablashi DV, Markham PD, et al. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science* 1986; 234: 596-601.

Santoro F, Kennedy PE, Locatelli G, et al. CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell* 1999; 99: 817-827.

Sashihara J, Tanaka-Taya K, Tanaka S, et al. High incidence of human herpesvirus 6 infection with a high viral load in cord blood stem cell transplant recipients. *Blood* 2002; 100: 2005-2011.

Sauter C & Barker JN. Unrelated donor umbilical cord blood transplantation for the treatment of hematologic malignancies. *Curr Opin Hematol* 2008; 15: 568-575.

Scheurer ME, Pritchett JC, Amirian ES, et al. HHV-6 encephalitis in umbilical cord blood transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Bone Marrow Transplant* 2012; Epub ahead of print, September 24<sup>th</sup>.

Schönberger S, Niehues T, Meisel R, et al. Transplantation of hematopoietic stem cells derived from cord blood, bone marrow or peripheral blood: a single centre matched-pair analysis in a heterogeneous risk population. *Klin Padiatr* 2004; 216: 356-363.

Schrier RD, Nelson JA, Oldstone MB. Detection of human cytomegalovirus in peripheral blood lymphocytes in a natural infection. *Science* 1985; 230: 1048-51.

Secchiero P, Zella D, Crowley RW, et al. Quantitative PCR for human herpesviruses 6 and 7: in vitro growth optimization and development of a syncytia inhibition test. *Virology* 1994; 202: 506-512.

Segal FP, Kadowaki N, Shodell M, et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999; 284: 1835-37.

Seya T, Turner JR, Atkinson JP, et al. Purification and characterization of a membrane protein (gp45-70) that is a cofactor for cleavage of C3b and C4b. *J Exp Med* 1986; 163: 837-855.

Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL, et al. Chronic graft-versus-host syndrome in man: a long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am J Med* 1980; 69: 204-217.

Singhal S, Powles R, Kulkarni S, et al. Comparison of marrow and blood cell yields from the same donors in a double-blind, randomized study of allogeneic marrow vs blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25: 501-505.

Slavin S, Nagler A, Naparstek E, et al. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and non malignant hematologic diseases. *Blood* 1998; 91: 756-763.

Smith A, Santoro G, Di Lullo L. Selective suppression of IL12 production by human herpesvirus 6. *Blood* 2003; 102: 2877-2884.

Smith AP, Paolucci C, Di Lullo G, et al. Viral replication-independent blockade of dendritic cell maturation and interleukin-12 production by human herpesvirus 6. *J Virol* 2005; 2807-2813.

Soldan SS, Fogdell-Hahn A, Brennan MB, et al. Elevated serum and cerebrospinal fluid levels of soluble human herpesvirus type 6 cellular receptor, membrane cofactor protein, in patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001; 50: 486-493.

Sorg RV, Kögler G, Wernet P. Identification of cord blood dendritic cells as an immature CD11c- population. *Blood* 1999; 93: 2302-2307.

Stem Cell Trialists' Collaborative Group. Allogeneic peripheral blood stem-cell compared with bone marrow transplantation in the management of hematologic malignancies: an individual patient data meta-analysis of nine randomized trials. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5074-5087.

Szabolcs P, Park KD, Reese M, et al. Coexistent naïve phenotype and higher cycling rate of cord blood T cells as compared to adult peripheral blood. *Exp Hematol* 2003; 31: 708-714.

Szabolcs P, Park KD, Reese M, et al. Absolute values of dendritic cell subsets in bone marrow, cord blood, and peripheral blood enumerated by a novel method. *Stem Cells* 2003; 21: 296-303.

Szabolcs P, Niedzwiecki D. Immune reconstitution in children after unrelated cord blood transplantation. *Cytotherapy* 2007; 9: 111-122.

Takahashi S, Ooi J, Tomonari A, et al. Comparative single-institute analysis of cord blood transplantation from unrelated donors with bone marrow or peripheral blood stem-cell transplants from related donors in adult patients with hematologic malignancies after myeloablative conditioning regimen. *Blood* 2007; 109: 1322-1330.

Takahata Y, Nomura A, Takada H, et al. CD25+CD4+ T cells in human cord blood: an immunoregulatory subset with naïve phenotype and specific expression of forkhead box p3 (Foxp3) gene. *Experimental Hematology* 2004; 32: 622-629.

Takeda K, Okuno T, Isegawa Y, et al. Identification of a variant A-specific neutralizing epitope on glycoprotein B (gB) of human herpesvirus-6 (HHV-6). *Virology* 1996; 222: 176-83.

Takemoto M, Imasawa T, Yamanishi K, Mori Y. Role of dendritic cells infected with human herpesvirus 6 in virus transmission to CD4(+) T cells. *Virology* 2009; 385: 294-302.

Talmadge JE. Hematopoietic stem cell graft manipulation as a mechanism of immunotherapy. *Int Immunopharmacol* 2003; 3: 1121-43.

Tanaka J, Imamura M, Kasai M, et al. The role of accessory cells in allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Int J Hematol* 1999; 69: 70-74.

Tanaka N, Kimura H, Hoshino Y, et al. Monitoring four herpesviruses in unrelated cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2000; 26: 1193-1197.

Tang H, Kawabata A, Takemoto M, et al. Human herpesvirus-6 infection induces the reorganisation of membrane microdomains in target cells, which are required for virus entry. *Virology* 2008; 378: 265-71.

Tangye SG, Good KL. Human IgM+CD27+ B cells: memory or “memory” B cells? *Journal of Immunology* 2007, 179: 13-19.

Theilgaard-Mönch K, Raaschou-Jensen K, Palm H, et al. Flow cytometric assessment of lymphocyte subsets, lymphoid progenitors, and hematopoietic stem cells in allogeneic stem cell grafts. *Bone Marrow Transplant* 2001; 28: 1073-1082.

Theilgaard-Mönch K, Raaschou-Jensen K, Schjodt K, et al. Pluripotent and myeloid-committed CD34+ subsets in hematopoietic stem cell allografts. *Bone Marrow Transplant* 2003; 32: 1125-1133.

Thomas ED, Lochte HL, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* 1957; 257: 491-6.

Thulke S, Radonic A, Nitsche A, et al. Quantitative expression analysis of HHV6 cell receptor CD46 on cells of human cord blood, peripheral blood and G-CSF mobilized leukapheresis cells. *Virology Journal* 2006; 3: 77-80.

To LB, Haylock DN, Simmons PJ, Juttner CA. The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood* 1997; 89: 2233-2258.

Tohyama M, Yahata Y, Yasukawa M, et al. Severe hypersensitivity syndrome due to sulfasalazine associated with reactivation of human herpesvirus 6. *Arch Dermatol* 1998; 134: 1113-1117.

Tokimasa S, Hara J, Osugi Y, et al. Ganciclovir is effective for prophylaxis and treatment of human herpesvirus-6 in allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002; 29: 595-598.

Tomonari A, Takahashi S, Ooi J, et al. Human herpesvirus 6 variant B infection in adult patients after unrelated cord blood transplantation. *Int J Hematol* 2005; 81: 352-5.

Ueda Y, Hagihara M, Okamoto A, et al. Frequencies of dendritic cells (myeloid DC and plasmacytoid DC) and their ratio reduced in pregnant women: comparison with umbilical cord blood and normal healthy adults. *Human Immunology* 2003; 64: 1144-1151.

Varani S, Cederarv M, Feld S, et al. Human cytomegalovirus differentially controls B cell and T cell responses through effects on plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2007; 179: 7767-7776.

Vermi W, Soncini M, Melocchi L, et al. Plasmacytoid dendritic cells and cancer. *Journal of Leukocyte Biology* 2011; 90: 1-10.

Vignoli M, Furlini G, Re MC, et al. Modulation of CD4, CXCR-4 and CCR-5 makes human hematopoietic progenitor cell lines infected with human herpesvirus-6 susceptible to human immunodeficiency virus type 1. *J Hematother Stem Cell Res* 2000; 9: 39-45.

- Villadangos JA & Young L. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 2008; 29: 352-361.
- Walker CM, van Burik JA, DeFor TE, et al. Cytomegalovirus infection after allogeneic transplantation: comparison of cord blood with peripheral blood and marrow graft sources. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13: 1106-1115.
- Weinberg A, Enomoto L, Li S, et al. Risk of transmission of herpesviruses through cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11: 35-38.
- Waller EK, Rosenthal H, Jones TW, et al. Larger numbers of CD4(bright) dendritic cells in donor bone marrow are associated with increased relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2001; 97: 2948-2956.
- West JA, Gregory SM, Sivaraman V, et al. Activation of plasmacytoid dendritic cells by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* 2011; 85: 895-904.
- Wyatt LS, Balachandran N, Frenkel N. Variations in the replication and antigenic properties of human herpes virus 6 strains. *J Infect Dis* 1990; 162: 852-857.
- Xu Y, Hu Y, Shi B, et al. HBsAg inhibits TLR9-mediated activation and IFN-alpha production in plasmacytoid dendritic cells. *Mol Immunol* 2009; 46: 2640-46.
- Xu YQ, Gao YD, Yang J et al. A defect of CD4+CD25+ regulatory T cells in inducing interleukin-10 production from CD4+ T cells under CD46 costimulation in asthma patients. *J Asthma* 2010; 47: 367-373.
- Yadav M, Arivananthan M, Chandrashekan B, et al. Human herpesvirus-6 (HHV-6) DNA and virus-encoded antigen in oral lesions. *J Oral Pathol Med* 1997; 26: 393-401.
- 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: 100-106.
- Yamanishi K, Okuno K, Shiraki M, et al. Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthema subitum. *Lancet* 1988; i: 1065-1067.
- Yasukawa M, Hasegawa A, Sakai I, et al. Down-regulation of CXCR4 by human herpesvirus 6 (HHV-6) and HHV-7. *The Journal of Immunology* 1999; 162: 5417-5422.
- Yoshida H, Matsunaga K, Ueda M, et al. Human herpesvirus 6 meningoencephalitis successfully treated with ganciclovir in a patient who underwent allogeneic bone marrow transplantation from an HLA-identical sibling. *Int j Hematol* 2002; 75: 421-425.
- Yoshikawa T, Asano Y, Ihira M, et al. Human herpesvirus 6 viremia in bone marrow transplant recipients: clinical features and risk factors. *Journal of Infectious Diseases* 2002; 185: 847-853.

Yoshikawa T. Human herpesvirus 6 infection in haematopoietic stem cell transplants patients. *Brit J Haematol* 2004; 124: 421-432.

Zerr DM, Gupta D, Huang ML, et al. Effect of antivirals on human herpesvirus 6 replication in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 309-317.

Zerr DM, Meier AS, Selke SS, et al. A population-based study of primary human herpesvirus 6 infection. *N Engl J Med* 2005; 352: 768-776.

Zerr DM, Fann JR, Breiger D, et al. HHV-6 reactivation and its effect on delirium and cognitive functioning in hematopoietic cell transplantation recipients. *Blood* 2011; 117: 5243-9.

Zerr DM. Human herpesvirus 6 (HHV-6) disease in the setting of transplantation. *Curr Opin Infect Dis* 2012a; 25: 438-44.

Zerr DM, Boeckh M, Delaney C. HHV-6 reactivation and associated sequelae after hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012b; 18: 1700- 8.

Zipfel PF & Skerka C. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 729-40.



# **Financements**

Le travail de cette thèse n'aurait pu aboutir sans le soutien financier de deux associations que nous tenons à remercier vivement:  
Association Laurette Fugain d'une part et l'IRGHET d'autre part.

# Annexe

Articles ayant été publiés ou en cours de publications et relatifs au travail de cette thèse :

- 1- Chevallier P, Hebia-Fellah I, Planche L, Guillaume T, Bressolette-Bodin C, Coste-Bure M *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: 1204-1211
  
- 2- Chevallier P, Robillard N, Illiaquer M, Esbelin J, Mohty M, Bodin-Bressollette C, Guillaume T, Stocco V, Auffray F, Derenne S, Planche L, Bene MC, Imbert-Marcille BM. Characterization of various blood and graft sources: a prospective series. *Transfusion*, 2012, sous presse.
  
- 3- Chevallier P, Robillard N, Illiaquer M, Esbelin J, Mohty M, Bodin-Bressollette C, Guillaume T, Stocco V, Auffray F, Derenne S, Planche L, Bene MC, Imbert-Marcille BM. HHV-6 cell receptor CD46 expression on various cell subsets of six blood and graft sources: a prospective series. *J Clin Virol* 2012, sous presse.

**TITRE : Infection par l'herpesvirus humain de type 6 (HHV-6) après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques : influence de la nature du greffon sur la réactivation virale.**

**RESUME EN FRANÇAIS**

Le nombre de greffe de sang placentaire chez les adultes n'a cessé d'augmenter ces dernières années, exposant les patients à un risque théoriquement accru d'infections. Au cours d'une étude rétrospective, nous avons comparé l'incidence des infections virales à CMV, EBV et HHV-6 après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques provenant soit d'un donneur non apparenté soit d'un sang de cordon. Une augmentation très significative de la fréquence et de l'intensité des infections HHV6 a été observée chez les sujets receveurs d'un greffon placentaire. Pour expliquer cet accroissement, nous avons ensuite déterminé la composition cellulaire et l'expression du CD46 (récepteur membranaire ubiquitaire de l'HHV-6) au sein de plusieurs types de greffons. Ces données, obtenues par analyse multiparamétrique en cytométrie de flux, montrent notamment un déficit quantitatif très significatif en cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs, cellules impliquées de manière professionnelle dans la défense antivirale de l'organisme par production d'interféron de type 1) et une moindre expression du CD46 sur les cellules dans les greffons placentaires. Finalement, pour préciser les effets éventuels du virus sur les fonctions cellulaires, nous avons effectué des essais préliminaires d'infection *in vitro* de pDCs triées à partir du sang périphérique de donneur sains. Ces premières données montrent une modulation de l'expression du CD80 et du CD86 sur les pDCs et une stimulation importante de la sécrétion d'IFN alpha par ces dernières. L'influence significative de l'origine placentaire du greffon sur la réactivation HHV-6 après allogreffe reste pour le moment inexpliquée.

**Mots clés :** Herpesvirus humain de type 6 ; cytomégalovirus, Epstein-Barr virus, allogreffe de cellules souches périphériques, allogreffe de sang placentaire, CD46, cellules dendritiques plasmacytoïdes.

**TITLE: Human herpesvirus 6 (HHV-6) infection after allogeneic stem cells transplantation: influence of graft source on the reactivation.**

**RESUME EN ANGLAIS**

Cord blood (CB) is increasingly used as an alternative source of graft in adults with hematologic malignancies, predisposing patients to a theoretical increased risk of infections. In a retrospective study, we compared the incidence of CMV, EBV and HHV-6 viral infections after allogeneic transplantation using stem cells issued from either unrelated donor or cord blood (CB). A very significant increase in the frequency and intensity of HHV6 infections was observed in patients receiving CB grafts. To explain this phenomenon, we then determined the cellular composition and the CD46 (ubiquitous HHV-6 membrane cell receptor) expression in several types of blood and graft sources. These data, obtained by multi-parametric flow cytometry analyses, showed a very significant deficiency in plasmacytoid dendritic cells (pDCs, cells professionally involved in antiviral defense of the organism through production of type 1 interferon) and lower CD46 cells expression in CB grafts. Finally, to clarify the possible effects of the virus on cell functions, we performed preliminary *in vitro* experiments consisting on HHV-6 infection of sorted human peripheral pDCs issued from healthy donors. These early data showed a modulation of CD80 and CD86 expressions on pDCs associated with a significant stimulation of type 1 IFN-alpha secretion by these cells. So far, the significant influence of cord blood graft source on HHV-6 reactivation after allogeneic transplantation remains to be elucidated.

**Keywords :** Human Herpesvirus 6 ; cytomégalovirus, Epstein-Barr virus, peripheral blood stem cells allograft, cord blood allograft, CD46, plasmacytoid dendritic cells.