

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE PHARMACIE

Cytomegalovirus et Herpesvirus Humain de type 6 :
étude de leur réplication au sein du système hématopoïétique

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale Chimie-Biologie de Nantes
Discipline : Sciences Pharmaceutiques
Spécialité : Virologie moléculaire

*présentée
et soutenue publiquement par*

Elisabeth ANDRE-GARNIER

Le 23 juin 2003, devant le jury ci-dessus

Président: Monsieur AGUT Henri, *Professeur des Universités, Paris*

Rapporteurs : Madame ROGÉZ Sylvie, *Praticien Hospitalier (HDR), Limoges*
Monsieur DROUET Emmanuel, *Professeur des Universités, Grenoble*

Examineurs : Madame BILLAUDEL Sylviane, *Professeur des Universités, Nantes*
Monsieur MILPIED Noël, *Professeur des Universités, Nantes*

Directeur de thèse :

Madame IMBERT-MARCILLE Berthe Marie, *Professeur des Universités, Nantes*

"La recherche", c'est comme la bicyclette, il faut avancer pour ne pas perdre l'équilibre.

D'après Albert Einstein

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	6
LISTE DES FIGURES	7
LISTE DES TABLEAUX	9
INTRODUCTION	10
RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE	13
1-CLASSIFICATION DES <i>BETAHERPESVIRINAE</i>	14
2-DONNEES GENERALES SUR LE CYTOMEGALOVIRUS HUMAIN (CMVH)	16
2.1 DÉCOUVERTE DU CMVH	16
2.2 EPIDÉMIOLOGIE ET TRANSMISSION	16
2.2.1 Prévalence	16
2.2.2 Transmission	17
2.2.3 Epidémiologie et incidence chez les transplantés	18
2.3 INFECTION HUMAINE	19
2.3.1 Histoire naturelle	19
2.3.1.1 Physiologie de l'infection	21
2.3.1.2 Sites cellulaires infectés et conséquences	22
2.3.1.3 Latence et réactivations	23
2.3.2 Réponse immunitaire	24
2.3.2.1 Immunité cellulaire	25
2.3.2.2 La réponse humorale	26
2.3.3 Autres aspects de l'interaction CMVH-cellule hôte	26
2.4 MANIFESTATIONS CLINIQUES	28
2.4.1 L'infection du sujet immunocompétent	28
2.4.2 L'infection congénitale et périnatale	29
2.4.2.1 L'infection congénitale	29

2.4.2.2 L'infection périnatale	30
2.4.3 L'infection chez les receveurs d'allogreffes	30
2.4.3.1 Exemple de la greffe rénale	30
2.4.3.2 Exemple chez les Allogreffés de moelle osseuse	31
2.4.4 L'infection chez les sidéens	31
2.5 TRAITEMENT ET PRÉVENTION DE L'INFECTION À CMVH	32
2.5.1 Les antiviraux disponibles	32
2.5.1.1 Le ganciclovir : (9-1,3-dihydroxy, 2-propoxy-méthyl) guanine	33
2.5.1.2 Le foscarnet (Trisodium phosphonoformate)	33
2.5.1.3 Le cidofovir : analogue de la cytidine	34
2.5.1.4 Le Valganciclovir	34
2.5.1.5 Les nouvelles molécules anti-CMVH en développement	35
2.5.2 Utilisation de ces antiviraux	35
2.5.3 Résistance du CMVH aux antiviraux	36
2.5.4 Prophylaxie et vaccination	37
3-DONNEES GENERALES SUR L'HERPESVIRUS DE TYPE 6 (HHV6)	39
3.1 DÉCOUVERTE DE L'HHV6	39
3.2 POLYMORPHISME	39
3.3 EPIDÉMIOLOGIE ET TRANSMISSION	40
3.3.1 Incidence et prévalence	40
3.3.2 Transmission	40
3.4 INFECTION HUMAINE	41
3.4.1 Histoire naturelle	41
3.4.1.1 Physiologie et sites cellulaires infectés	41
3.4.1.2 Latence et réactivation	42
3.4.2 Réponse immunitaire	42
3.4.3 Rôle " immunosubversif "	43
3.5 MANIFESTATIONS CLINIQUES	44
3.5.1 Au cours de la primo infection	44
3.5.2 Au cours des réactivations	44
3.5.2.1 Dans le cas de la greffe de moelle osseuse	45
3.5.2.2 Chez les greffés d'organes solides	46
3.5.2.3 Chez les patients infectés par le VIH	46
3.5.3 Pathologies potentiellement associées	47

3.5.3.1 HHV6 et oncogénèse	47
3.5.3.2 HHV6 et pathologies spécifiques	47
3.5.3.3 Interaction de l'HHV6 et du CMVH chez les transplantés	48
3.6 TRAITEMENT	49
4-CARACTERES STRUCTURAUX ET REPLICATIFS DU CMVH ET DE L'HHV6	50
4.1 INTRODUCTION	50
4.2 STRUCTURE DES PARTICULES VIRALES	51
4.2.1 Les génomes	51
4.2.1.1 Le génome du CMVH	51
4.2.1.2 Le génome de l'HHV6	56
4.2.2 Capsides et enveloppes virales	59
4.2.2.1 La capside	59
4.2.2.2 Le tégment	59
4.2.2.3 L'enveloppe	59
4.2.3 ARN messagers associés aux particules de CMVH	60
4.3 MULTIPLICATION VIRALE	60
4.3.1 Cellules cibles <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	60
4.3.2 Les étapes de la multiplication virale	61
4.3.2.1 Multiplication du CMVH	61
4.3.2.2 Multiplication de l'HHV6	62
4.4 ASPECT MOLÉCULAIRE DE LA RÉPLICATION	64
4.4.1 Expression séquentielle des gènes et des protéines	64
4.4.1.1 Caractères généraux de la réplication des <i>Betaherpesvirinae</i>	64
4.4.1.2 Caractéristiques moléculaires de la transcription des gènes du CMVH	64
4.4.1.3 Caractéristiques moléculaires de la transcription des gènes de l'HHV6	66
4.4.2 Réplication de l'ADN	67
4.4.2.1 Réplication du CMVH	67
4.4.2.2 Réplication de l'HHV6	68
5-METHODES DE DIAGNOSTIC	69
5.1 MÉTHODES DE DIAGNOSTIC INDIRECT : LES MÉTHODES SÉROLOGIQUES	69
5.1.1- Détection et dosage des IgG et IgM anti-CMVH	69
5.1.1.1 Les IgG anti CMVH	69
5.1.1.2 Les IgM anti-CMVH	70
5.1.2 Détection et dosage des IgG et IgM anti-HHV6	70

5.2 MÉTHODES DE DIAGNOSTIC DIRECT	71
5.2.1 Isolement par culture cellulaire	72
5.2.1.1 Culture du CMVH	72
5.2.1.2 Culture de l'HHV6	73
5.2.2 Détection des antigènes viraux	74
5.2.2.1 Détection des antigènes du CMVH	74
5.2.2.2 Détection directe des antigènes viraux de l'HHV6	75
5.2.3 Détection des acides nucléiques viraux	75
5.2.3.1 Réalisation de techniques d'hybridation directe	75
5.2.3.2 Réalisation des techniques d'amplification génique	77
5.3 APPLICATION DES DIFFÉRENTES MÉTHODES DE DIAGNOSTIC	82
5.3.1 Dans le cadre du CMVH	82
5.3.1.1 Diagnostic chez l'adulte immunocompétent	82
5.3.1.2 Diagnostic au cours de l'infection congénitale	82
5.3.1.3 Diagnostic chez les greffés	83
5.3.1.4 Diagnostic au cours du SIDA	84
5.3.2 Dans le cadre de l'HHV6	85
<u>PARTIE EXPERIMENTALE</u>	87
1-DEVELOPPEMENT DES MARQUEURS DE SUIVI DE L'EXPRESSION VIRALE DU CMVH ET DE L'HHV6	89
1.1 LES DIFFÉRENTS MARQUEURS DE LA MULTIPLICATION VIRALE	89
1.1.1 La microscopie électronique	90
1.1.2 Isolement viral en culture	91
1.1.2.1 Principes généraux	91
1.1.2.2 Isolement du CMVH en culture	93
1.1.2.3 Isolement de l'HHV6 en culture	93
1.1.3 La recherche des antigènes viraux	95
1.1.3.1 Immunocytdiagnostic par IF ou IP	95
1.1.3.2 Détection des antigènes viraux par cytométrie en flux (CMF)	95
1.1.4 La recherche des ARN messagers par RT-PCR	98
1.1.4.1 Généralités sur les ARNm et les techniques de RT-PCR	98
1.1.4.2 Extraction des ARNs totaux	99

1.1.4.3 Les techniques de RT-PCR	101
1.2 MARQUEURS MOLÉCULAIRES DE LA RÉPLICATION DU CMVH	107
1.2.1- Article I	108
1.2.1- Commentaires Article n°1	114
1.3 MARQUEURS MOLÉCULAIRES ET ANTIGÉNIQUES DE L'HHV6	117
1.3.1 Article n°2	118
1.3.2 Commentaires Article n°2	129
2-CMVH, HHV6 ET CELLULES SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES	132
2.1 ETAT DES CONNAISSANCES SCIENTIFIQUES	132
2.1.1 Les cellules souches hématopoïétiques	132
2.1.1.1 Physiologie de l'hématopoïèse normale	132
2.1.1.2 Méthodes de différenciation <i>in vitro</i>	134
2.1.1.3 Utilisations thérapeutiques des CSH dans le cadre des greffes	135
2.1.2 <i>Betaherpesvirinae</i> et hématopoïèse	138
2.2 RÉPLICATION VIRALE AU COURS DE LA DIFFÉRENCIATION <i>IN VITRO</i> DES CELLULES SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES	141
2.2.1 Article n°3	142
2.2.2 Commentaires Article n°3	155
<u>DISCUSSION GENERALE</u>	<u>160</u>
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	<u>169</u>
<u>ANNEXES</u>	<u>190</u>

ABREVIATIONS

ACV	: aciclovir
ADN	: acide desoxyribonucléique
ARNm	: acide ribonucléique messenger
CD	: classe de différenciation (<i>cluster différenciation</i>)
CDV	: cidofovir
CFU	: <i>colony forming unit</i>
CMF	: cytométrie de flux
CMH	: complexe majeur d'histocompatibilité
CMSP	: cellules mononucléées sanguines périphériques
CMVH	: cytomegalovirus humain
CSH	: cellules souches hématopoïétiques
CSHP	: cellules souches hématopoïétiques périphériques
D	: donneur
EBV	: virus Epstein-Barr
ECP	: effet cytopathogène
ELISA	: <i>enzyme linked immunosorbant assay</i>
GCV	: ganciclovir
gP	: glycoprotéine
GvHD	: <i>graft versus host disease</i>
HHV	: herpesvirus humain
HSV	: herpes simplex virus
IE	: <i>immediate early</i>
IF	: immunofluorescence
IFN	: interféron
Ig	: immunoglobuline
IL	: interleukine
LCR	: liquide céphalo-rachidien
LA	: liquide amniotique
kb	: kilobases
NK	: natural killer
ORF	: cadre de lecture ouvert
PCR	: <i>polymerase chain reaction</i>
PFA	: acide phosphonoformique
PHA	: phytohémagglutinine
pp	: phosphoprotéine
R	: receveur
RT-PCR	: <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SIDA	: syndrome d'immunodéficience acquis
TNF	: tumor necrosis factor
VIH	: virus de l'immunodéficience humaine
VZV	: virus de la varicelle et du zona

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : ARBRE PHYLOGÉNIQUE DE LA FAMILLE DES <i>HERPESVIRIDAE</i>	15
FIGURE 2 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA SÉROPRÉVALENCE DU CMVH EN FONCTION DE L'ÂGE ET DU NIVEAU SOCIO-ÉCONOMIQUE	17
FIGURE 3 : PHYSIOPATHOLOGIE DES INFECTIONS À CMVH	20
FIGURE 4: STRUCTURE DES VIRIONS DES <i>BETAHERPESVIRINAE</i> : DESCRIPTION À PARTIR D'UNE PHOTO DE MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE EN COLORATION NÉGATIVE (CMVHx100000)	50
FIGURE 5 : ORGANISATION DU GÉNOME DU CMVH (5A) ET DU GÉNOME DE L'HHV6 (5B) : LOCALISATION DE QUELQUES GÈNES	53
FIGURE 6 : CYCLE DE MULTIPLICATION DES α - <i>HERPESVIRINAE</i>	63
FIGURE 7: DÉTECTION DE L'ANTIGÉNÉMIE PP65 EN IMMUNOFLUORESCENCE : POLYNUCLÉAIRES NON INFECTÉS (7A) ET INFECTÉS (7B) (x100)	74
FIGURE 8 : PRINCIPE DE LA QUANTIFICATION GÉNOMIQUE PAR LA TECHNIQUE D'HYBRIDATION MOLÉCULAIRE PAR AMPLIFICATION DE SIGNAL (<i>BDNA</i>)	76
FIGURE 9 : SYSTÈME TAQMAN®	79
FIGURE 10 : PRINCIPE DE LA QUANTIFICATION DE LA CHARGE VIRALE PLASMATIQUE PAR LA TECHNIQUE D'AMPLIFICATION ISOTHERME NASBA	81
FIGURE 11: DÉTECTION EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE, APRÈS COLORATION NÉGATIVE DE PARTICULES VIRALES DE CMVH (13A) ET D'HHV6 (13B)(x 100000)	90

FIGURE 12: EFFETS CYTOPATHOGÈNES (ECP) DU CMVH SUR CELLULES FIBROBLASTIQUES EMBRYONNAIRES HUMAINES (12A) ET DE L'HHV6 SUR CELLULES MONONUCLÉÉES SANGUINES PÉRIPHÉRIQUES (12B) (x100)	92
FIGURE 13 : SYSTÈME OPTIQUE D'UN CYTOMÈTRE ANALYSEUR (BECTON DICKINSON, FRANCE)	96
FIGURE 14: AMPLIFICATION D'UN ARN MESSAGER CIBLE PAR LA MÉTHODE DE RT-PCR, EN UN SEUL TUBE	102
FIGURE 15 : PRINCIPE DE L'HYBRIDATION EN PLAQUE DES PRODUITS DE PCR (DEIA)	106
FIGURE 16 : RÔLE DES FACTEURS DE CROISSANCE SUR LES DIFFÉRENTES ÉTAPES DE L'HÉMATOPOÏÈSE	134
FIGURE 17 : MORPHOLOGIE DES CELLULES, APRÈS COLORATION AU MAY-GRÜNWARD-GIEMSA (x100), OBTENUES À DIFFÉRENTS TEMPS D'EXPANSION EX VIVO DE CSHP CD34+ : J 0 (17A), J14 (17B), J21 (17C)	156
FIGURE 18 : MODÈLE SIMPLIFIÉ D'INTERACTION DE L'HHV6 AVEC L'HÉMATOPOÏÈSE	168

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I : CLASSIFICATION DES HERPESVIRUS D'APRÈS LEURS CARACTÉRISTIQUES BIOLOGIQUES	14
TABLEAU II : DÉFINITION DES DIFFÉRENTS ABORDS PHYSIOPATHOLOGIQUES DE L'INFECTION À CMVH	19
TABLEAU III : PRINCIPAUX GÈNES NON STRUCTURAUX DU CMVH ET PRODUITS DES GÈNES	54
TABLEAU IV : PRINCIPAUX GÈNES STRUCTURAUX DU CMVH ET PRODUITS DES GÈNES	55
TABLEAU V : PRINCIPAUX GÈNES DES VARIANTS HHV-6A ET HHV-6B, LEURS PRODUITS ET LEURS HOMOLOGUES SUR LE GÉNOME DU CMVH	57

INTRODUCTION

Les *Herpesviridae* constituent une des plus vastes famille de virus identifiée à ce jour, qui compte des représentants dans tout le règne animal. Leur génome de grande taille (plus de 100 kilobases) leur confère une importante capacité de codage pour des protéines virales, qui vont intervenir non seulement dans la réplication génomique ou composer la structure du virion, mais également leur permettre d'interagir largement avec les effecteurs immunitaires. Ils présentent ainsi la particularité d'échapper en partie à la pression du système immunitaire, ce qui s'objective, à l'issue de la primo-infection, par l'instauration d'un état de latence. Ceci assure la pérennité du virus au sein de l'organisme et les épisodes de réactivations qui entrecoupent les phases de latence, contribuent à sa dissémination. Ils représentent ainsi un modèle particulièrement pertinent d'études des interactions entre un micro-organisme et son hôte. Chez l'homme, les huit membres décrits à ce jour se répartissent en trois sous-familles, en fonction notamment de leur capacité répllicative, leur tropisme cellulaire et tissulaire et la structure de leur génome.

Le Cytomégalo virus humain (CMVH) et l'Herpesvirus humain de type 6 (HHV6), de découverte beaucoup plus récente, sont deux membres de la sous-famille des *Betaherpesvirinae*. Ils présentent des communautés génétiques et antigéniques, et sont à l'origine d'infections actives assez fréquentes chez les sujets immunodéprimés, en particulier chez les receveurs d'allogreffes. Ces infections actives s'objectivent notamment par la survenue de cytopénies partielles, voire totales, qui illustrent bien leur tropisme pour le système hématopoïétique. Ils établissent en particulier leur latence dans les cellules mononucléées du sang périphérique, notamment les monocytes. En outre, les leucocytes du sang périphérique constituent, au cours des infections actives, le vecteur essentiel de ces deux virus, assurant leur dissémination virale dans l'organisme. Leurs interactions avec le système hématopoïétique médullaire, en raison notamment des difficultés liées à la culture des cellules qui le composent, sont moins bien comprises. Il en résulte une connaissance limitée des mécanismes physiopathologiques concourant aux atteintes de l'hématopoïèse.

Une des thématiques de recherche du groupe virologie de l'équipe UPRES-EA 1156 " Stratégies en Epidémiologie et Thérapeutique des Infections ", est centrée sur l'étude de certains aspects de la physiopathologie des infections à CMVH. S'y associent, sur un versant de recherche clinique, le développement et l'évaluation de marqueurs biologiques visant à optimiser la prise en charge de ces infections chez les sujets immunodéprimés. Parmi les champs d'investigations qui ont été privilégiés au cours de ces dernières années, une place

importante a été réservée à la mise en place et à l'évaluation clinique de moyens complémentaires de quantification de la charge virale (Imbert-Marcille et al., 1997a; Imbert-Marcille et al., 1997b; Poirier-Toulemonde et al., 2000). Parallèlement, ce groupe a étendu ses investigations sur l'HHV6, décrivant notamment plus précisément son pouvoir pathogène chez les sujets allogreffés de cellules souches hématopoïétiques (Boutolleau et al., 2003; Imbert-Marcille et al., 2000b). Ces données ont conduit à envisager la mise en place d'études pour mieux appréhender la nature et les conséquences éventuelles des interactions de ces deux virus avec certaines cellules cibles du système hématopoïétique.

L'objectif principal de cette thèse a été d'étudier la réplication du CMVH et de l'HHV6 au cours de la différenciation *in vitro* des progéniteurs hématopoïétiques. Ceci a nécessité le développement préalable d'outils performants, permettant d'investiguer la réplication virale. La présentation du travail expérimental est précédée d'un rappel bibliographique qui retrace l'état des connaissances disponibles à ce jour sur le CMVH et l'HHV6. Les résultats expérimentaux sont rapportés sous la forme de trois articles, précédé d'un bref état de la question établi en fonction des données de la littérature. Chacun d'entre eux est assorti de commentaires qui apportent, notamment, des précisions sur la conduite adoptée pour mener les travaux. Les deux premiers articles publiés dans des revues internationales portent sur le développement et la validation d'outils moléculaires et/ou immunologiques permettant d'étudier les différentes phases du cycle de réplication des deux virus. L'article 1: "*Use of reverse transcription ploymerase chain reaction with colorimetric to detect a Cytomegalovirus late spliced mRNA in polymorphonuclear leukocytes from renal transplant patients.*" (Andre et al., *Diagn.Microbiol. Infec. Dis*; 1999; 34:287-291) présente les travaux effectués pour le CMVH. L'article 2 : "*A one-step RT-PCR and a flow cytometry method as two specific tools for direct evaluation of human Herpesvirus-6 replication.*" (Andre-Garnier et al., *J. Virol. Methods* ; 2003,108 : 213-222) rapporte ceux entrepris pour l'HHV6. Un troisième article "*Reactivation of Human Herpesvirus 6 but not Cytomegalovirus occurs during ex vivo expansion of circulating CD34+ hematopoietic stem cells*" (Andre-Garnier et al., soumis dans *Blood*), présente l'évaluation de la réplication des deux virus au cours de l'expansion *ex vivo* en milieu liquide de cellules souches hématopoïétiques périphériques CD34+. L'ensemble des travaux conduits dans cette thèse est ensuite analysé et discuté de façon plus générale, au vu notamment des données les plus récentes de la littérature.

RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

1-CLASSIFICATION DES *BETAHERPESVIRINAE*

Le cytomégalovirus humain (CMVH) ou herpesvirus type 5 et l'herpesvirus humain de type 6 (HHV6) appartiennent à la famille des *Herpesviridae* et à la sous famille des *Beta-Herpesvirinae*. Cette sous famille, qui comprend également l'herpesvirus humain de type 7 (HHV7), regroupe des virus de spécificité d'hôte étroite, se répliquant sur un nombre très restreint de systèmes cellulaires et caractérisées par leur cycle infectieux long (Tableau I)

Tableau I : Classification des Herpesvirus d'après leurs caractéristiques biologiques

Sous-famille	α - <i>Herpesvirinae</i>	β - <i>Herpesvirinae</i>	γ - <i>Herpesvirinae</i>
Représentants humains	HSV1, HSV2 VZV	CMVH HHV6 HHV7	EBV HHV8
Spécificité d'hôte	plus large	très étroite	étroite
Tropisme cellulaire <i>in vitro</i>	nombreuses cellules, fibroblastes	fibroblastes ou lymphocytes	lymphocytes
Durée de cycle	court	long	variable
Effet cytopathogène	extension rapide très lytique	progression lente	variable en fonction du type cellulaire
Groupes génomiques	Surtout D et E	E ,A et B	B et C

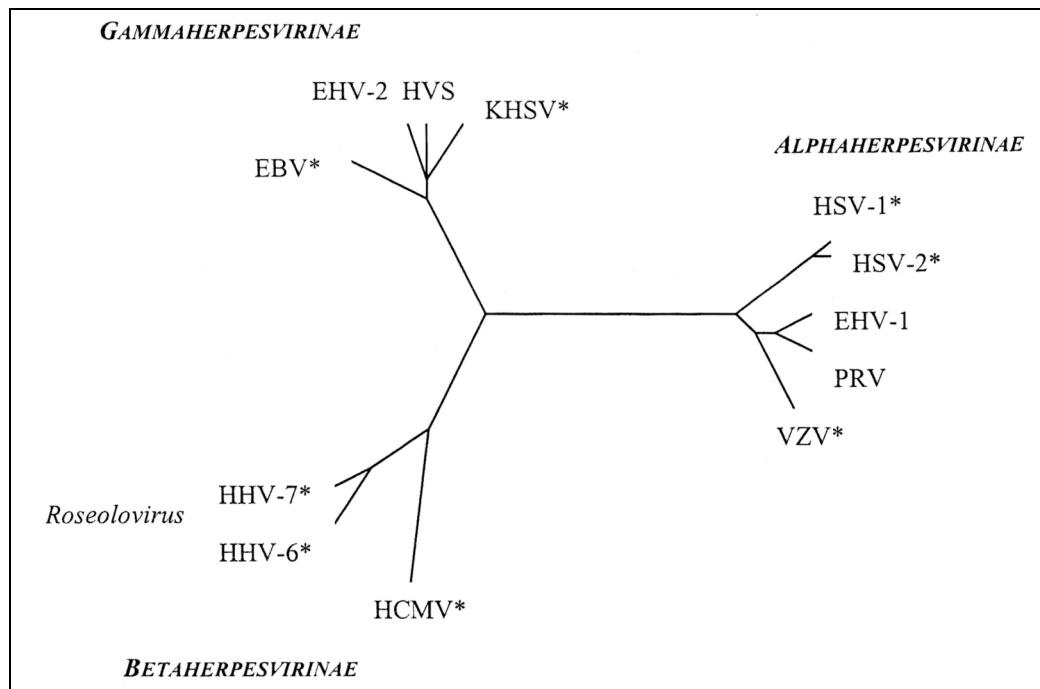


Figure 1: Arbre phylogénique de la famille des *Herpesviridae* d'après (Moore *et al.*,1996)

2-DONNEES GENERALES SUR LE CYTOMEGALOVIRUS HUMAIN (CMVH)

2.1 Découverte du CMVH

La première description de la pathogénie du cytomégalovirus remonte au début du 20ème siècle. En 1904, la lésion histologique caractéristique de la maladie des inclusions cytomégaliqes est décrite par Ribbert, Jesionek et Kiolemenoglou sous forme de grandes cellules à inclusions intranucléaires présentes dans les reins, les poumons, le foie et la parotide de fœtus et d'enfants mort-nés. En 1921, Goodpasture et Talbot les rapprochent des cellules observées dans les lésions cutanées de la varicelle dessinant ainsi la possibilité d'une étiologie virale pour la maladie des inclusions cytomégaliqes du nouveau-né. La première technique de diagnostic suggérée par Wyatt en 1950 et appliquée par Fetterman en 1952 consiste en la recherche de cellules caractéristiques dans les urines des bébés. En 1956, Smith obtient la réplication du virus responsable dans des cellules fibroblastiques humaines cultivées *in vitro*. La même année la première souche de virus est isolée par Rowe à partir de tissu adénoïdien d'enfants normaux constituant la souche AD169 (référence ATCC VR 977). En 1960, Weller rebaptise le virus de la maladie des glandes salivaires cytomégalovirus humain (CMVH). Le rôle étiologique du CMVH est décrit ensuite dans les syndromes mononucléotiques et dans les années 60-70 des liens sont établis entre la baisse des défenses immunitaires de l'hôte, des stimulations allogéniques et la réactivation du virus.

2.2 Epidémiologie et transmission

2.2.1 Prévalence

L'infection à CMVH est endémique, ubiquitaire et mondiale comme le montrent des enquêtes séro-épidémiologiques. Elle évolue sans influence saisonnière. Les populations à faible niveau socio-économique sont les plus fréquemment contaminées. Ainsi, la prévalence des anticorps détectés est supérieure à 50% chez les jeunes adultes d'Amérique du nord et d'Europe et atteint 100% en Afrique, Amérique du Sud et Asie. Cependant, certaines populations des pays industrialisés sont d'avantage exposées au virus : sujets polytransfusés et/ou receveur de

greffes et sujets à partenaires sexuels multiples. Par ailleurs, l'hypothèse d'une réponse immunitaire cellulaire T sans réponse sérologique est actuellement envisagée chez certains patients et peut sous estimer le nombre de sujets infectés (Imbert-Marcille, 2002; Pass, 2001; Ranger-Rogez et al., 1999) (Figure 2).

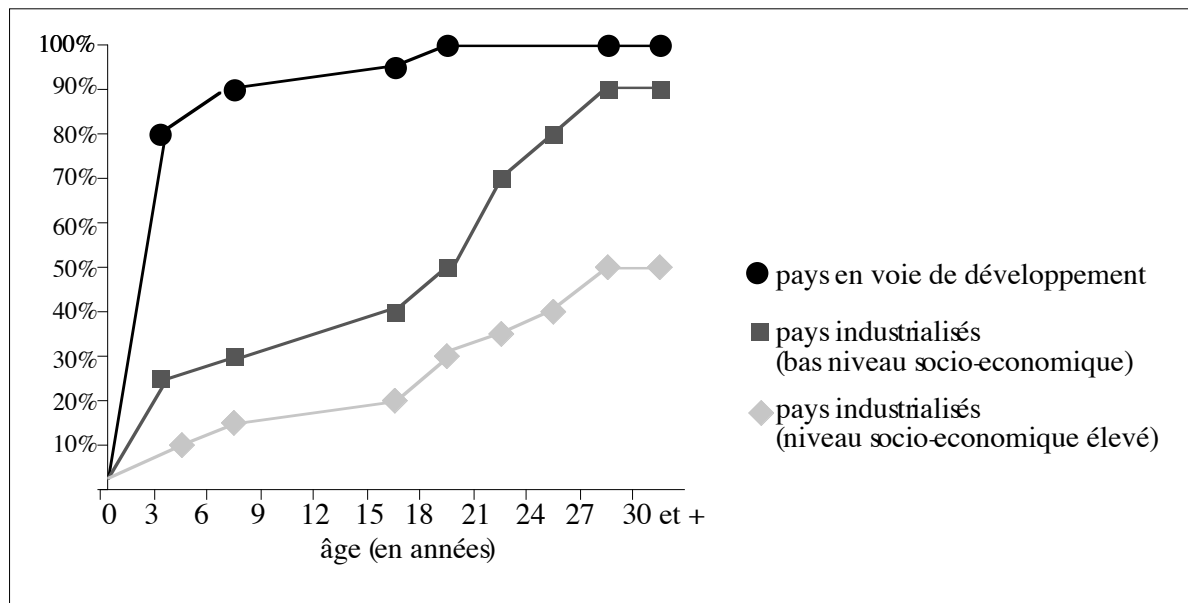


Figure 2 : Représentation schématique de la séroprévalence du CMVH en fonction de l'âge et du niveau socio-économique, d'après (Imbert-Marcille, 2002)

2.2.2 Transmission

Le cytomégalovirus humain est hautement spécifique d'espèce. De part sa structure enveloppée, il est très fragile et ne conserve pas son pouvoir infectieux dans le milieu extérieur. Ce virus strictement humain est donc transmis lors de contacts étroits entre les individus par des différentes voies horizontales ou verticales. A partir de sujets infectés, les sources de contamination sont représentées par la plupart des liquides biologiques : les sécrétions naso-pharyngées, les urines, les sécrétions vaginales, le lait maternel, les selles, le sperme, les larmes et le sang. La diffusion au sein d'une population est accentuée par le phénomène d'excrétion prolongée existant au cours des primo-infections et des réactivations, survenant en particulier, chez les sujets immunodéprimés. Chez les sujets immunocompétents, une excrétion, généralement moins intense, existe au cours d'une primo-infection ou de

réactivations asymptomatiques. Le bébé infecté *in utero* représente, également, une source importante de contamination : 0,3% à 2% des bébés sont viruriques à la naissance suite à une infection maternofoetale. Des facteurs socio-économiques semblent concourir au taux élevé d'infection observé dans certaines populations en raison notamment des phénomènes de promiscuité (Ranger-Rogez et al., 1999).

La transmission inter-humaine existe au sein des familles et dans les collectivités par le biais des gouttelettes de sécrétions respiratoires ou salivaires (gouttelettes de pflügge). Dans la période péri-natale allant de 0 à 6 mois, 1% à 15% des bébés sont infectés lors d'un contact avec le virus au cours du passage pelvien, par le lait maternel ou tout simplement en raison du contact intime existant entre la mère et l'enfant. Dans les pays industrialisés, l'entrée dans les crèches est associée à un premier pic de séroconversion.

La contamination par voie sexuelle représente ensuite, dans les pays développés, un mode majeur et même prédominant de transmission du virus au sein de population adulte. Elle est favorisée par les microtraumatismes. Il a été constaté que la prévalence des anticorps double chez les adolescents lors de leur première année d'activité sexuelle : deuxième pic de séroconversion (Imbert-Marcille, 2002).

La transmission virale selon un mode iatrogène (forme nosocomiale) par l'intermédiaire de transfusions de produits sanguins ou lors de transplantation d'organes n'est pas nulle. La déleucocytation systématique des produits transfusés diminue considérablement le risque de transmission par les cellules sanguines (Bowden et al., 1991).

2.2.3 Epidémiologie et incidence chez les transplantés

Chez les patients transplantés d'organes solides, plus que la transfusion, c'est dans 90% des cas la greffe d'un organe issu d'un donneur séropositif qui est responsable d'une contamination. Parmi les receveurs d'organe solide séronégatifs environ 60% développeront une infection à CMVH et 30 à 50% une véritable maladie à CMVH. Il existe cependant des variations en fonction du ou des organes transplantés et donc de niveau d'immunosuppression observée (Patel and Paya, 1997).

Chez les greffés de moelle osseuse l'incidence globale de l'infection à CMVH, tout type sérologique confondu, est évaluée entre 10 et 50% avec de grosses différences en fonction notamment du statut séropositif pour le CMVH du receveur. Ainsi l'incidence de l'infection symptomatique dans les couples R+/D- et R+/D+ est évaluée autour de 69% contre 57% chez

les couples R-/D+. Des études en biologie moléculaire ont permis d'établir que la souche du receveur était en cause dans ces cas, faisant du statut séropositif de l'allogreffé un facteur de risque principal (Winston et al., 1985).

2.3 Infection humaine

2.3.1 Histoire naturelle

Le premier contact avec le virus caractérise la primo-infection qui est accompagnée d'une excrétion virale prolongée. La mise en place de la réponse immunitaire est contemporaine de l'instauration d'un état de latence, qui sera entrecoupé, notamment, au décours des états d'immunodépression de périodes de réactivations. La capacité du CMVH à disséminer chez son hôte et à infecter de nombreux types cellulaires détermine la multiplicité des présentations cliniques. Les particules virales dès qu'elles rentrent en contact avec une cellule hôte sont susceptibles de modifier le métabolisme cellulaire (Griffiths et al., 2000).

La distinction entre infection active et maladie à CMVH est importante. L'infection active, qui survient au cours de la primo-infection ou des réactivations, est définie biologiquement par la présence du virus, de ses antigènes ou de son génome au niveau du sang périphérique ou par l'isolement du virus dans les urines ou dans le liquide broncho-alvéolaire. Au cours des infections actives, le risque majeur pour le patient est la survenue d'une atteinte tissulaire, encore nommée maladie à CMVH stade le plus grave de l'infection virale (Tableau II d'après (Imbert –marcille,2002) ; Figure 3).

Tableau II : Définition des différents abords physiopathologiques de l'infection à CMVH

Infection	Présence du virus dans l'organisme, sous forme latente ou active
Excrétion	Présence du virus dans les liquides biologiques
Infection active	Présence du virus dans le sang périphérique (au cours de la primo-infection ou de la réactivation
Maladie	Atteinte tissulaire au cours d'une infection active
Primo-infection	Premier contact avec le virus
Latence	Présence du virus arépliatif limité à de sites particuliers (tels les monocytes
Réinfection	Infection par une souche virale différente
Réactivation	Infection active survenant après une période de latence virale

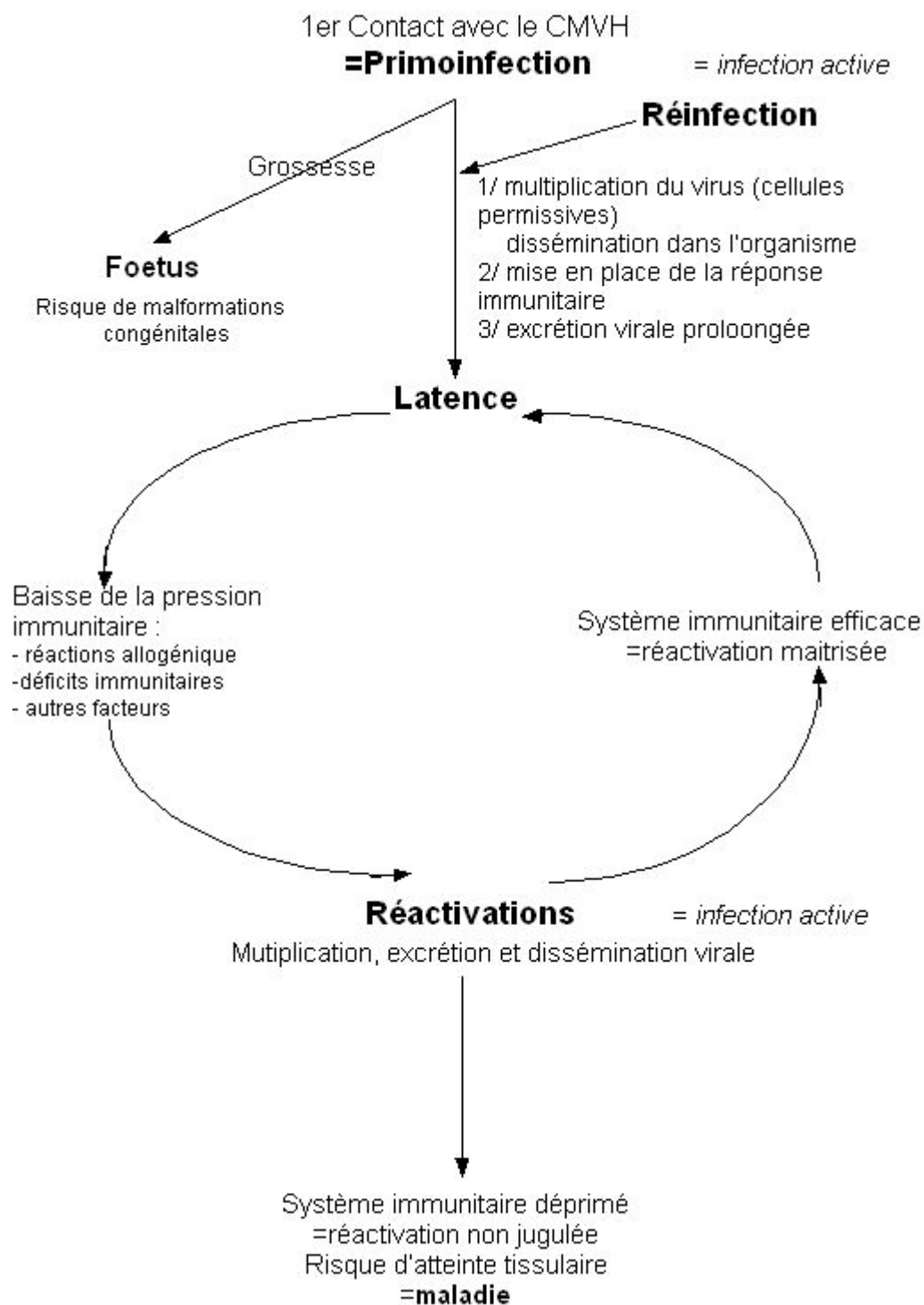


Figure 3 : Physiopathologie des infections à CMVH

2.3.1.1 Physiologie de l'infection

Au cours de l'infection active, la dissémination du CMVH aux différents organes se fait par voie sanguine où il est véhiculé par trois principaux types cellulaires (Imbert-Marcille, 2001):

- la présence du virus au sein des polynucléaires du sang périphérique caractérise par définition l'infection active, ce qui justifie que le diagnostic virologique soit conduit avant tout sur ce type cellulaire. L'existence ou non d'une réplication virale complète au sein de ces cellules est restée longtemps un sujet de controverse. Ainsi, en plus de l'ADN viral, la protéine pp65 et certains transcrits ont été détectés dans les noyaux des polynucléaires confirmant l'importance de ces cellules lors de l'infection active. Pour certains auteurs, la mise en évidence d'ARNm viraux à la fois précoces et tardifs, dans les polynucléaires, par des techniques d'hybridation *in situ* (Dankner et al., 1990) et de RT-PCR (Gozlan et al., 1993; von Laer et al., 1995b) est en faveur d'une réplication productive. Cette première hypothèse est dans l'état actuel des connaissances largement controversée par des travaux d'autres équipes. Pour ces derniers, la présence des transcrits viraux précoces ne serait le témoin que d'une réplication abortive du CMVH dans ces cellules. La présence d'antigènes et de transcrits viraux précoces et tardifs serait la conséquence d'une phagocytose de particules virales, après contact des polynucléaires avec des cellules productrices, telles que les cellules endothéliales vasculaires. Leur modèle expérimental, mis au point *in vitro*, permet de le démontrer en soulignant qu'un phénomène de microfusion serait majoritairement en cause associé à un phénomène d'endocytose lui minoritaire (Gerna et al., 2000b; Revello et al., 1998; Revello et al., 1992).

- les monocytes CD14+ jouent un rôle de réservoir et de dissémination virale par la voie sanguine. En dehors de toute infection active, chez un sujet sain séropositif pour le CMVH, les monocytes apparaissent comme le site essentiel de latence au niveau sanguin. Une conformation circulaire du génome du CMVH a été mise en évidence dans ces cellules (Bolovan-Fritts et al., 1999). Ces mêmes cellules, après avoir subi une différenciation en macrophages, sont capables d'exprimer des transcrits viraux comme l'ont démontré différentes équipes lors de la réalisation de stimulation allogénique de monocytes *in vitro* (Soderberg-Naucleer et al., 2001; Taylor-Wiedeman et al., 1994). L'infection productive est, dans ces cellules, particulière car non cytopathique. Les virions néoformés sont séquestrés

dans des vacuoles intracytoplasmiques : ceci favorise la survie de la cellule infectée et donc sa migration vers les tissus, tout en protégeant le virus du système immunitaire (Fish et al., 1996).

- enfin, d'autres cellules présentant des inclusions cytomégaliqes (en " œil de Hibou ") peuvent être observées dans la circulation sanguine. Elles présentent les marqueurs caractéristiques des cellules endothéliales et pourraient provenir de dommages induits par le CMVH sur l'endothélium vasculaire (Grefte et al., 1993).

La présence de génome viral a été retrouvée dans le plasma de certains patients présentant des infections actives: elle pourrait résulter de la lyse de cellules infectées telles que les polynucléaires ou les cellules endothéliales par les effecteurs immunitaires (Boeckh et al., 1997).

Le passage du virus de la circulation sanguine vers un organe donné, puis au sein de l'organe atteint fait intervenir des contacts de cellule à cellule, impliquant notamment les cellules endothéliales et les cellules épithéliales (Plachter et al., 1996). Les cellules endothéliales jouent un rôle probablement majeur dans la pathogénèse de l'infection. Elles forment une interface entre le sang périphérique et les tissus sous-jacents, et qu'elles sont impliquées dans différents processus régulant l'hémostase tissulaire et l'inflammation. Le virus semble infecter de façon lytique les cellules endothéliales des microvaisseaux, alors que celles des gros vaisseaux seraient plus volontiers infectées de façon persistante (Fish et al., 1998). Ce type cellulaire pourrait donc servir de réservoir viral, permettant la contamination des monocytes au cours de contacts intercellulaires.

2.3.1.2 Sites cellulaires infectés et conséquences

A partir de cette dissémination sanguine, le CMVH peut être retrouvé dans tous les organes, où il infecte de nombreux types cellulaires. Dans le cadre d'une maladie très sévère, les effets du CMVH peuvent alors s'accompagner de différentes manifestations pathologiques. Si le CMVH est susceptible d'être directement lytique sur cellules cibles, le mécanisme d'atteinte tissulaire est plus complexe associant à l'effet direct, la libération de cytokines de l'inflammation, l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion, la réponse immunitaire cellulaire induite par le virus. Les cibles majeures sont constituées par les cellules épithéliales, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales (Sinzger et al., 1995). Les glandes salivaires et le tractus génito-urinaire sont des sites d'infection privilégiés, expliquant l'excrétion parfois prolongée du virus dans la salive et

l'urine. Chez les transplantés rénaux, le CMVH serait capable de jouer un rôle néfaste en participant au dysfonctionnement du rein (dépôt de complexes immuns dans les glomérules). Enfin, de nombreux arguments permettent maintenant d'évoquer la participation du virus dans le rejet du greffon.

La moelle osseuse est une des cibles majeures du CMVH, dont l'atteinte au cours des infections actives s'objective par la survenue d'une myélosuppression partielle ou totale. Ces atteintes sont probablement liées à la réplication du virus dans les cellules stromales (Simmons et al., 1990) et/ou dans les cellules progénitrices myéloïdes (Movassagh et al., 1996). Leur infection pourrait s'accompagner d'une modification de la production des cytokines indispensables à la différenciation hématopoïétique (Lagneaux et al., 1996a).

Les cellules endothéliales infectées des vaisseaux favorisent la dissémination virale, formant une interface entre le sang périphérique et les tissus sous jacents (Fish et al., 1998). Des études plus poussées, réalisées *in vitro*, d'infection des cellules endothéliales ont montré que la capacité du virus à se multiplier après endocytose par la cellule dépendait de la migration rapide de l'ADN vers le noyau (Sinzger et al., 2000).

Le tractus respiratoire dans sa totalité est un autre site fréquemment impliqué. Dans le poumon, notamment chez les receveurs de greffe cœur-poumon ou de moelle osseuse, les cellules cytomégaliennes se situent dans les alvéoles et l'épithélium bronchique alors infiltrés par de nombreuses cellules inflammatoires.

Le système nerveux dans son ensemble, lors de la maladie des inclusions cytomégaliennes du nouveau-né, d'encéphalites, de rétinites (sidéens), peut être touché. Dans les nerfs périphériques, les cellules endothéliales du tronc nerveux et les cellules de Schwann sont des cibles du CMVH.

Les cellules de la peau sont susceptibles elles aussi d'être le site d'ulcérations cutanéomuqueuses, secondaires à une vascularite à complexes immuns des petits vaisseaux du derme.

2.3.1.3 Latence et réactivations

Après la primo-infection, le virus reste présent indéfiniment dans l'organisme à l'état latent. Les mécanismes moléculaires d'établissement et de maintien de la latence ne sont pas clairement élucidés. Pour les Herpesvirus, la recherche de marqueurs viraux de cette phase de latence est toujours en voie d'exploration. Il a été démontré, récemment, que le génome viral est sous sa forme épisomale au niveau des monocytes (Bolovan-Fritts et al., 1999). Pour le CMVH, une production de transcrits spécifiques, désignés ARNm de latence et codés dans la

région des gènes très précoces IE1/IE2, est retrouvée, notamment, dans les cellules sanguines (cellules souches hématopoïétiques, monocytes, macrophages, lymphocytes) et dans cellules épithéliales glandulaires (Kondo et al., 1996). Leur rôle est pour l'instant inconnu. Le CMVH persiste également, très probablement, dans les cellules endothéliales d'autres tissus de l'organisme (poumon, rein par exemple). La fréquence des cellules infectées de façon latente, chez les sujets sains, est très faible, concernant de 0,004% à 0,01% des cellules mononuclées (Slobedman and Mocarski, 1999).

A la faveur d'une altération du système immunitaire, le virus peut, de façon inégale selon le type cellulaire, se réactiver. Cette réactivation ne semble pas être la conséquence directe de la seule immunosuppression car le virus, chez le sujet immunocompétent, se réactive régulièrement, en particulier au cours de la différenciation des monocytes en macrophages. Pendant ce processus, l'expression des protéines très précoce IE permet la détection du virus par le système immunitaire, qui, s'il est compétent, jugule rapidement la multiplication virale. Cet équilibre permanent entre le virus et son hôte se trouve rompu lorsque le système immunitaire est défaillant, conduisant alors à une infection active. L'administration de drogues immunosuppressives, les réactions allogéniques induites lors d'une transplantation ou d'une transfusion sont autant de phénomènes concomitants, aux mécanismes mal connus, capables d'induire une réactivation (Soderberg-Naucler and Nelson, 1999; Soderberg-Naucler et al., 2001). Parmi les facteurs cellulaires évoqués, le TNF α sécrété en grande quantité au cours de l'inflammation peut activer NF- κ B qui stimule alors l'activité du promoteur IE. Des effets similaires sont observés avec le facteur *CREB*, qui peut être stimulé par l'AMP cyclique, dont les concentrations augmentent sous l'influence des catécholamines ou de certaines drogues.

Enfin, un sujet infecté de façon latente n'est pas à l'abri d'une réinfection par un virus exogène ayant pour, dans la majorité des cas, une origine iatrogène.

2.3.2 Réponse immunitaire

La réponse immunitaire induite par le CMVH existe, mais est insuffisante pour l'éliminer de l'organisme. Ainsi, comme tous les *Herpesviridae*, il persiste à l'état latent chez son hôte. Chez l'immunocompétent, une homéostasie hôte-virus s'installe et s'oppose au développement de la maladie à CMVH n'empêchant pas, cependant, les éventuelles réactivations le plus souvent silencieuses. Chez l'immunodéprimé la rupture de cet équilibre se traduit par des infections actives à CMVH.

Les lésions tissulaires sont essentiellement dues à des destructions des cellules infectées par les effecteurs immunologiques (Segondy and Michelson, 1999).

2.3.2.1 Immunité cellulaire

La réponse immunitaire contre le CMVH est essentiellement à médiation cellulaire comme en témoigne la fréquence élevée des infections chez des sujets présentant un déficit de cette immunité.

Parmi les acteurs de l'immunité non spécifique, les macrophages participent à la phagocytose et initient la réponse cellulaire du fait de leurs fonctions de présentations des antigènes aux lymphocytes T4. Ils participent également à la réaction de cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC). Par ailleurs, les cytokines produites par ces cellules infectées par le CMVH pourraient favoriser l'immunodépression induite par le virus. Le polynucléaire ne paraît pas, quant à lui, jouer un rôle d'élimination du virus mais plus de dissémination virale (Gerna et al., 2000b). Les cellules NK ont une activité cytotoxique non spécifique mis en évidence dans des liquides broncho-alvéolaires de receveurs de greffe de moelle osseuse (Bowden et al., 1993). Elles ont pour cibles les cellules infectées par le CMVH présentant une expression altérée des molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Farrell et al., 1997).

Les lymphocytes CD4⁺ (Helper), associés au CMH de classe II, ont un rôle central activant à la fois la réponse immunitaire spécifique capable d'activer la réponse cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ et la réponse humorale des lymphocytes B. Chez les patients sidéens la maladie invasive à CMVH s'aggrave lorsque le taux des lymphocytes CD4⁺ passe en dessous de 50/mm³, stade de la maladie associé à une détérioration importante de la réponse lymphocytaire T.

Le rôle fondamental du CMH de classe I et des lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺, dans le contrôle de l'infection, a été démontré en constatant les effets de l'infection sur les enfants *in utero* pour lesquels une telle immunité est déprimée par le virus. La disparition de la virurie chronique chez ces patients est associée à une normalisation de la réponse lymphocytaire T. Certaines protéines sont connues pour être les cibles de la réponse immunitaire des lymphocytes T, parmi elles la protéine très précoce (IE1) codée par le gène pUL123, le produit du gène UL18 homologue d'une protéine de classe du CMH de classe I et la protéine tégumentaire pp65 (produit du gène UL83). Il est démontré que le polymorphisme du

complexe majeur d'histocompatibilité des patients participe à la sélection des protéines virales induisant la réponse cellulaire (Retiere et al., 1998).

2.3.2.2 La réponse humorale

Certaines glycoprotéines de l'enveloppe sont impliquées dans la réponse humorale protectrice comme la protéine gB (UL 55) et gH (UL75). L'immunogénicité dominante et l'abondance de l'antigène gB explique que l'activité anticorps contre celui-ci représente plus de 50% de l'activité neutralisante dans les sérums d'un convalescent. Les anticorps dirigés contre la protéine gH limitent la propagation du virus au sein des cellules mononucléées sensibles après l'étape d'absorption virale. Par ailleurs, une réponse anticorps durable et intense est induite vis-à-vis des protéines tégumentaires telles que pp28 (UL99), pp65 (UL82), et pp150(UL32) mais aussi des protéines de capsid (UL86). Ces protéines associées aux protéines non structurales pp52 (UL44) et pp72 (IE-1) sont probablement responsables de l'activité anticorps mesurée par méthode ELISA dans un sérum d'un sujet convalescent (Segondy and Michelson, 1999).

Même si la réponse anticorps ne joue qu'un rôle modeste, elle est importante dans la prévention de la maladie sévère à CMVH. Une étude réalisée par Yeager *et al* (Yeager et al., 1981), lors de l'infection congénitale, a démontré la réduction de la mortalité et de la morbidité chez les enfants présentant des anticorps anti-CMVH de leur mère par rapport aux enfants nés d'une mère séronégative. Les anticorps anti-CMVH participent à la destruction du réservoir de virus intracellulaire en utilisant les mécanismes de cytotoxicité dépendante des anticorps et l'activation du complément.

L'immunité innée participe également à la lutte contre l'infection. Le CMVH induit, non spécifiquement, la synthèse des interférons α et β : cytokines impliquées dans la signalisation cellulaire et capable de conférer une résistance antivirale à la cellule. Le système du complément, après activation intervient en lysant les cellules infectées.

2.3.3 Autres aspects de l'interaction CMVH-cellule hôte

Le CMVH a la capacité d'échapper à la réponse immune par différents mécanismes complémentaires (Tortorella et al., 2000b). Il est ainsi relativement peu sensible à l'action des anticorps du fait de son mode de dissémination par passage de cellule à cellule, de sa liaison avec la α 2-microglobuline, de sa capacité à coder pour des protéines homologues des fragments Fc (MacCormac and Grundy, 1996) et à entraîner la surexpression de deux

protéines inhibitrices de la voie classique du complément : autant de phénomènes le rendant peu accessible à la séroneutralisation.

L'échappement à la réponse cellulaire est également lié à plusieurs événements (Drouet et al., 2002). Parmi eux, la "non-présentation" d'IE1, phosphorylée par pp65, dès l'entrée dans la cellule cible. L'inhibition et ou la dégradation des molécules du CMH de classe I (Tortorella et al., 2000a) et II par le CMVH contribuent respectivement à perturber la réponse T CD4+ et TCD8+. La lyse des cellules infectées par les cellules NK est également entravée par le produit du gène UL18 du virus codant pour un homologue du CMH de classe I reconnu par les récepteurs inhibiteurs des ces cellules et non par les cellules T (Farrell et al., 1999). Un mécanisme d'inhibition de l'apoptose par le virus est également envisagé. Notamment, l'inhibition de la Caspase 8 a été démontrée récemment (Drouet et al., 2002). Enfin le virus, par interférence avec les chémokines entrave les mécanismes inflammatoires naturels (Michelson et al., 1997).

La forme latente du virus après la primo-infection lui permet d'échapper à l'action du système immunitaire. L'absence de présentation des protéines virales pendant ce stade explique que ces cellules infectées de façon latente ne soient pas reconnues comme cible par le système immunitaire.

Le virus induit, transitoirement chez l'hôte, un effet immunosuppresseur capable de potentialiser les infections à germes opportunistes. Des études menées au sein de diverses populations (primo-infection à CMVH chez le sujet sain, infection chez les sujets transplantés, lors de l'infection congénitale) et reproduites *in vitro* ont montré une diminution des réactions d'hypersensibilité retardée, une dépression de la réponse lymphocytaire après stimulation par les antigènes du virus, une diminution de la réponse NK et une modification de la réponse des macrophages infectés. Les mécanismes exacts de l'impact du CMVH sur le système immunitaire ne sont pas encore clairement établis. Dans tous ces phénomènes, l'intrication avec les cytokines, souvent difficile à reproduire *in vitro*, est importante. D'une part la présence du CMVH modifie la production de cytokines par les cellules infectées: augmentation du TNF α , de l'IFN γ , et du TGF β , concourant à une hyporéactivité immunitaire. D'autre part, certaines cytokines ont un effet modulateur sur la réplication virale (Michelson, 1998).

Le CMVH a été proposé comme cofacteur dans la pathogénie des infections à VIH. De plus, il serait capable d'activer des promoteurs cellulaires entraînant une augmentation ou une diminution de l'expression des protéines cellulaires, incluant des oncogènes intervenant dans la prolifération cellulaire (Doniger et al., 1999).

2.4 Manifestations cliniques

2.4.1 L'infection du sujet immunocompétent

Dans la majorité des cas, l'infection à CMVH reste asymptomatique (environ 90%des cas) et touche le sujet jeune. Le cycle de réplication lent, la faible transmission de cellule à cellule pourraient contribuer à la pathogénicité limitée chez l'individu sain.

Chez les rares sujets symptomatiques, le tableau clinique est le plus souvent constitué par des myalgies, une fièvre persistante (souvent supérieure à 39°C), parfois un rash maculopapuleux accompagné dans un tiers des cas par des troubles digestifs. Le tableau biologique le plus caractéristique se présente sous la forme d'un syndrome mononucléosique. La primo-infection à CMVH représente 8% des causes des syndromes mononucléosiques et 30% de ceux à réaction de Paul-Bunnell-Davidson négative. Les autres anomalies biologiques à type d'anémie et de thrombopénie sont plus rares.

Des complications plus graves surviennent dans de rares cas : il a été rapporté chez des sujets immunocompétents des cas de pneumopathies, d'hépatites (essentiellement cytolytiques), de myocardites, d'encéphalites, de purpuras thrombopéniques et de Syndromes de Guillain-Barré (10%à 22% des cas de SGB)(Cohen and Corey, 1985). Les infections à CMVH acquises au cours des transfusions sanguines restent une des causes de fièvre et d'hépatite chez des patients hospitalisés.

Les réactivations et réinfections se manifestent très exceptionnellement par un syndrome mononucléosique et sont en général asymptomatiques chez le sujet immunocompétent. Dans tous les cas l'excrétion du virus sera prolongée dépassant la durée des signes cliniques lorsqu'ils existent.

Il est par ailleurs envisagé que le CMVH pourrait représenter un cofacteur de la genèse de l'athérosclérose (High, 1999) et de certains processus tumoraux (arguments moléculaires) (Doniger et al., 1999).

2.4.2 L'infection congénitale et périnatale

2.4.2.1 L'infection congénitale

L'infection à CMVH représente la plus fréquente des infections virales congénitales avec un taux d'incidence d'environ 1%. La gravité de la maladie est directement liée au caractère primaire ou non de l'infection chez la mère et de façon un peu moins sensible à la précocité de l'infection au cours de la gestation. La séroprévalence du CMVH est de 55.4% chez les femmes françaises en âge de procréer (taux variant en fonction du niveau socio-économique) et le risque d'infection primaire chez une femme séronégative est compris entre 1 et 2%. Lors de la survenue d'une primo-infection le taux de transmission fœtale est évalué entre 25% à 50%, alors qu'il ne dépasse pas les 2% en cas de réinfection ou de réactivation. Finalement, l'incidence de la survenue d'une infection symptomatique chez les enfants nés d'une mère séropositive avant la grossesse pour le CMVH est quasiment nulle. Elle atteint 10% à 15% pour les bébés nés d'une mère ayant été en contact pour la première fois avec le CMVH au cours de la grossesse (Gratacap-Cavallier et al., 1998).

L'infection peut être suspectée soit au cours de la gestation lors d'échographies (retard de croissance intra-utérin, oligoamnios ou hydramnios, hyperéchogénicité des anses intestinales, calcifications intracrâniennes, anasarque) ou devant l'évidence d'une infection maternelle rarement symptomatique, soit au moment de la naissance revêtant différents aspects cliniques plus ou moins graves.

La forme la plus grave est la forme généralisée ou maladie des inclusions cytomégaliennes qui touche environ 5% des enfants infectés *in utero* et est caractérisée par un enfant de petit poids présentant un tableau ictéro-hémorragique avec hépatosplénomégalie, pétéchies ou des ecchymoses. A l'examen, une hypotonie associée à des convulsions et des troubles respiratoires sont observés. La biologie se caractérise par une hyperbilirubinémie, une anémie et une thrombopénie, une élévation des transaminases, des troubles de la coagulation pouvant atteindre le tableau gravissime de coagulation intra-vasculaire disséminée. Si le décès ne survient pas en quelques jours, l'évolution reste très grave avec la persistance de séquelles notamment psychomotrices.

Les formes d'infections congénitales moins graves sont constituées par toutes les formes localisées de la maladie généralisée en particulier l'atteinte hépatique, l'encéphalite, la

pneumopathie. Dans 15% des cas le diagnostic est tardif après la naissance sous la forme de convulsions, d'un retard mental, d'une surdité bilatérale (Boppana et al., 1992).

2.4.2.2 L'infection périnatale

Elle est généralement moins sévère que la forme congénitale et est le plus souvent diagnostiquée fortuitement. Lorsqu'elle revêt un caractère grave, elle s'exprime sous la forme d'une pneumopathie interstitielle pouvant laisser des séquelles pulmonaires (Nelson and Demmler, 1997).

2.4.3 L'infection chez les receveurs d'allogreffes

Le CMVH reste un agent pathogène responsable d'un taux de mortalité et de morbidité important en période de post transplantation chez les receveurs d'allogreffe. La fréquence globale de la maladie à CMVH augmente dans l'ordre suivant selon les organes greffés : rein, foie, cœur, rein-pancréas, intestin et cœur-poumon (Fishman and Rubin, 1998). Le statut du couple D+/R-, le degré d'immunodépression du sujet receveur en particulier, l'administration de sérum anti-lymphocytaire, la survenue d'un ou plusieurs rejets aigus précédemment, une co-infection avec l'HHV6 ou HHV7 sont autant de facteurs de risque de développement d'une pathologie à CMVH.

2.4.3.1 Exemple de la greffe rénale

Au cours de l'infection active, qui survient généralement entre la 4ème et la 8ème semaine après la greffe, une maladie symptomatique peut être développée par le patient avec une fièvre supérieure à 38°C pendant au moins deux jours consécutifs, une leucopénie ($GB < 3.10^9/l$) et/ou une thrombopénie (plaquettes $< 100.10^9/l$). Dans les formes les plus graves des localisations viscérales témoignent alors de la gravité et de la forme invasive du CMVH pouvant se présenter sous différents tableaux : une atteinte hépatique, une atteinte pulmonaire ou même une atteinte du système nerveux central (très rare). L'existence d'une forme au départ souvent asymptomatique souligne l'importance d'un suivi rapproché. La mise en place très rapide du traitement sur les données des indicateurs biologiques a conduit à une diminution des formes graves sans empêcher l'apparition d'infections plus tardives (au delà du quatrième mois).

Le rôle du CMVH dans les glomérulopathies avec dépôts d'immunoglobulines, bien qu'évoqué, n'a été confirmé que par peu d'auteurs. Le rôle du CMVH dans la survenue du

rejet est mal établi et reste très controversé. En période de post-transplantation à la suite d'une infection à CMVH, le rôle immunosuppresseur du virus est rendu responsable de la survenue de surinfections à pathogènes opportunistes (*Pneumocystis carinii*, colonisation des voies supérieures par des bacilles à Gram négatif, co-infection virale : EBV, HHV6, HHV7) (Tong et al., 2000).

2.4.3.2 Exemple chez les Allogreffés de moelle osseuse

Au cours de la greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques, la stimulation allogénique des cellules mononucléées favorise la réactivation virale alors que le système immunitaire est profondément atteint. Depuis quelques années, l'instauration d'une thérapeutique "*préemptive*", voir préventive par certaines équipes, a modifié considérablement le schéma de l'infection à CMVH chez ces patients. Ainsi la fréquence de ces infections est passée de 25% à 10 % chez les patients séronégatifs avec comme facteur de risque le déficit immunitaire accru si le greffon est déplété en lymphocytes T.

La présentation clinique est caractérisée le plus souvent par une fièvre (38°C à 39°C) inexplicée sans autre origine évidente et pouvant être masquée par la corticothérapie. Les signes hématologiques sont présents : leucopénie et/ou thrombopénie associées à un retard de la prise du greffon ou survenant dans le cadre d'une insuffisance médullaire secondaire. Le poumon est l'organe le plus souvent touché au cours du développement d'une localisation viscérale de la maladie devant le foie (atteinte cholestatique plutôt que cytolytique) et le système nerveux. C'est au niveau du parenchyme pulmonaire que les manifestations des lésions induites par le virus et la réponse immunologique sont les plus bruyantes (Boeckh and Boivin, 1998) .

Des conséquences indirectes de la réactivation à CMVH sont également décrites. Elles sont considérées, notamment, comme un facteur adjuvant voir déclenchant de la réaction du greffon contre l'hôte (GvH). La leucopénie liée au virus et/ou au traitement par ganciclovir favorise l'apparition d'autres infections, notamment, aspergillaires

2.4.4 L'infection chez les sidéens

Le CMVH est considéré comme l'un des pathogènes opportunistes le plus important au cours du Syndrome d'Immunodéficience humaine Acquis (SIDA). La primo-infection à CMVH est rare chez les patients infectés par le VIH, 80% à 90 % d'entre eux ayant déjà été en contact avec le virus auparavant, par voie sanguine ou sexuelle.

La réactivation du virus survient presque inévitablement dans l'évolution du SIDA dès lors que le taux de lymphocytes CD4⁺ descend au-dessous de 100 lymphocytesT4/mm³. A ce moment, une excrétion urinaire débute suivie de la diffusion virémique et des atteintes progressivement multiviscérales plus ou moins associées à des dysfonctionnements organiques. Le syndrome fébrile survient en général dans les rares cas de primo-infection associée à des myalgies, des arthralgies et parfois une hépatosplénomégalie.

La rétinite, signe d'une immunodépression sévère, est la forme clinique la plus fréquente (10 à 15% des malades) caractérisée par une baisse de l'acuité visuelle et évoluant vers la cécité. La localisation digestive, fréquente chez ces patients, se présente sous la forme de diarrhées chroniques accompagnées d'un amaigrissement, mais aussi sous forme d'oesophagites, de gastrites, d'entéocolites (Drouet et al., 1993). Enfin, les infections du SNC ne sont pas négligeables, au sein de cette population. Elles rappellent celles de l'infection congénitale et font souvent suite à la rétinite sous la forme d'encéphalite. La pneumopathie interstitielle, plus rare que dans les autres formes d'immunodépression, se manifeste sous une forme bilatérale symétrique. Des atteintes du système nerveux périphérique (polyradiculonévrite évocatrice d'un syndrome de Guillain-Barré) ou du myocarde ont également été décrites au cours du SIDA.

Depuis la généralisation des stratégies antirétrovirales associant plusieurs molécules, dont les antiprotéases, un recul très important des infections à CMVH a été observé (Salmon-Ceron et al., 2000).

2.5 Traitement et prévention de l'infection à CMVH

Le pronostic des infections à CMVH a été transformé au cours de ces dernières années, grâce aux progrès réalisés dans le domaine de la chimiothérapie antivirale et dans celui des méthodes de diagnostic.

2.5.1 Les antiviraux disponibles

Deux antiviraux sont utilisés depuis 1987 dans le traitement de l'infection à CMVH : un analogue nucléosidique le ganciclovir (CYMEVAN[®]) et un analogue des pyrophosphates le foscarnet (FOSCAVIR[®]). Ces deux médicaments font preuve d'une activité antivirale tout en entraînant des effets indésirables qui nécessitent une grande rigueur d'utilisation.

2.5.1.1 Le ganciclovir : (9-1,3-dihydroxy, 2-propoxy-méthyl) guanine

Le ganciclovir (GCV) ou DHPG est une molécule acyclique synthétique analogue de la guanine proche de l'aciclovir (Zovirax®). Il possède une activité antivirale sur le CMVH 50 fois plus efficace que le Zovirax® grâce à une chaîne latérale carboxylique unique. L'action antivirale est liée à une inhibition sélective de la synthèse d'ADN viral, dans la cellule infectée, par la forme triphosphate du produit. La première phosphorylation est sous la dépendance d'une kinase virale codée par le gène UL97. La forme triphosphate du ganciclovir est incorporée à l'ADN viral au cours de la réplication, par compétition avec la guanosine triphosphate et/ou inhibe l'ADN-polymérase. Un nucléoside de plus est incorporé, et l'élongation est stoppée par un mécanisme mal élucidé.

Deux formes pharmaceutiques sont disponibles : une à usage parentéral et l'autre à usage orale sous le nom de Cymevan® (laboratoire Roche) et une pour injection intravitréenne Vitrasert® (laboratoire Chiron).

Le traitement initial d'induction à CMVH est de 5 mg/kg deux fois par jour pendant quatorze jours. La posologie optimale du traitement d'entretien est voisine de 50% de la dose d'induction (5mg/kg/jour) sept jours par semaine. Il peut être utilisé *per os* en prophylaxie à raison de 3g/jour en 3 à 6 prises. Administré sous cette forme, les taux sériques du ganciclovir sont faibles en raison de sa mauvaise absorption digestive.

Le principal effet secondaire de cette molécule est la neutropénie qui peut nécessiter une diminution des doses (en dessous de 1000 polynucléaires/mm³) ou un arrêt du traitement (en dessous de 500 polynucléaires/mm³). Pour diminuer la toxicité médullaire, certains protocoles expérimentaux associent un facteur de croissance comme le G-CSF (*Granulocyte Colony Stimulating Factor*). La surveillance du traitement nécessite des numérations régulières. D'autres effets indésirables affectant le SNC sont décrits chez les patients sidéens sous forme de confusion mentale, de sensation vertigineuse, de céphalées. Les nausées et les troubles digestifs sont également fréquents (Crumpacker, 1996).

2.5.1.2 Le foscarnet (Trisodium phosphonoformate)

Le foscarnet est un analogue des pyrophosphates qui inhibe de nombreuses polymérases virales (herpesvirus, rétrovirus, virus de la grippe...). Cette molécule bloque le site de liaison aux pyrophosphates de l'ADN-polymérase virale ou de la reverse transcriptase de façon non

compétitive et s'oppose ainsi au clivage du groupement pyrophosphate du nucléoside triphosphate. Cette action est relativement sélective assurant une inhibition de l'ADN-polymérase du virus à des concentrations inférieures à 1% de celles inhibant l'ADN polymérase cellulaire. Le foscarnet, par rapport à d'autres antiviraux, ne nécessite pas une phosphorylation intracellulaire préalable pour inhiber les ADN-polymérases virales, ce qui rend un recours possible à cette molécule lors des survenues de résistance au ganciclovir par mutation sur UL97. Les mutations de l'ADN-polymérase restent cependant un mécanisme de résistance possible.

Il n'est commercialisé que sous sa forme pour usage parentérale sous le nom de Foscavir $\square$ (laboratoire Astra). La posologie initiale recommandée du foscarnet est de 90 à 100mg/kg toutes les 12 heures en IV en traitement d'attaque puis toutes les 24 heures en traitement d'entretien.

Les effets indésirables du foscarnet sont, principalement, une altération des fonctions rénales (tubulopathie, anémie, hypocalcémie, diminution du magnésium et des phosphates). La posologie doit être adaptée selon la fonction rénale, correctement surveillée et accompagnée d'une bonne hydratation du patient (Gerard and Salmon-Ceron, 1995).

2.5.1.3 Le cidofovir : analogue de la cytidine

L'HPMC ou cidofovir est un analogue de nucléoside monophosphorylé ce qui lui permet d'éviter la première étape de phosphorylation réalisée par l'enzyme viral et de n'être phosphorylé que par des enzymes cellulaires. Le cidofovir diphosphate, forme active, s'intègre à la chaîne d'ADN en formation et/ou inhibe l'ADN polymérase.

Il est commercialisé sous sa forme parentérale Vistide $\square$ (laboratoire Pharmacia&Upjohn). Le traitement d'induction a l'avantage d'être possible en une perfusion une fois par semaine, le traitement d'entretien étant ensuite pratiqué avec une injection tous les quinze jours.

Des études ont montré que son principal effet indésirable est la néphrotoxicité, qui peut être maîtrisée partiellement par une adaptation correcte de la posologie et un ajustement du schéma thérapeutique. D'autres effets ont été rapportés : alopecie, uvéite, neuropathie périphérique, hypotension intra oculaire (Safrin et al., 1999).

2.5.1.4 Le Valganciclovir

Promédicament du ganciclovir, le valganciclovir (ester de valyle) a l'avantage de pouvoir être administré par voie orale ; sa forme commerciale est le Valcyt®. Il possède une activité

similaire au ganciclovir et est prometteur pour supplanter les traitements par voie IV. Son administration est de 900mg (deux gélules) deux fois par jour en traitement d'attaque. Le traitement d'entretien est ensuite d'une gélule par jour. Dans les études cliniques, le principal effet indésirable reste la neutropénie (Curran and Noble, 2001).

2.5.1.5 Les nouvelles molécules anti-CMVH en développement

La mise au point d'oligonucléotides anti-sens qui bloquent l'expression de produits génétiques viraux essentiels en se liant à des séquences complémentaires d'un ARN messager est une autre voie thérapeutique. Lors de l'évaluation clinique de phase I, deux oligonucléotides triphosphates Isis 2922□ (anti-sens complémentaires de la frontière intron-exon des gènes UL36 et UL37 du CMVH et de l'ARNm de IE2) après injection intravitréenne se sont révélés efficaces dans le traitement de la rétinite à CMVH.

Des inhibiteurs spécifiques du clivage des concatémères d'ADN polygéniques de haut poids moléculaire représentés par les ribonucléosides benzimidazolés et dont le principal prototype est BAY38-4768 (Bayer) a été évalué pour sa pharmacocinétique et sa tolérance.

D'autres molécules de type anti-protéases en inhibant l'assemblage des virions sont également testées. Ce sont, en général, des molécules qui miment le site de coupure de la protéase bloquant ainsi le site actif de l'enzyme. La protéase UL80 du CMVH constitue ainsi une cible thérapeutique potentielle pour inhiber la réplication virale (De Clercq, 2001).

2.5.2 Utilisation de ces antiviraux

Chez les greffés de moelle osseuse, dans le cadre gravissime de la maladie déclarée à CMVH, le ganciclovir associé à des immunoglobulines est administré en IV à la dose de 5mg/kg deux fois par jour pendant 14 à 21 jours suivi d'un traitement à 5 mg/kg/jour au moins deux semaines. L'association foscarnet (100mg/kg/jour)/ganciclovir est une solution envisageable. Ces traitements restent néanmoins décevants, avec le maintien d'un taux de mortalité élevé en cas d'atteinte multiviscérale. Les équipes se tournent depuis 1991 vers la thérapeutique en prophylaxie. Des essais sont réalisés en instaurant un traitement par le ganciclovir immédiatement après la greffe (5 mg/kg 2 fois par jour pendant les 5 premiers jours de la greffe suivi de 5 mg/kg/j pendant 100 jours). Les équipes se trouvent alors confrontées à deux problèmes : la neutropénie induite par le traitement et l'apparition de formes retardées d'infections (Goodrich et al., 1991). Pour pallier à ces inconvénients une autre stratégie, appelée "*preemptive therapy*" par les anglosaxons qui consiste à mettre en place de façon très

précoce le traitement par ganciclovir ou foscarnet, sur la base de la positivité d'un marqueur sanguin (culture rapide, AgPP65, PCR) est envisagée. La réduction de la maladie à CMVH est démontrée dans ces conditions (Boeckh, 1999; Goodrich et al., 1993).

Chez les greffés d'organe solide, le schéma thérapeutique en cas de maladie à CMVH est comparable à celui des greffés de moelle osseuse. Il est initié généralement dès l'apparition des premiers signes évocateurs d'une maladie à CMVH (hyperthermie, diminution des leucocytes). Le foscarnet, comme le cidofovir, néphrotoxiques et neurotoxiques, ne sont utilisés qu'en cas de résistance au ganciclovir. La chimioprophylaxie consiste à utiliser essentiellement le ganciclovir IV ou VO, éventuellement le valganciclovir ou l'aciclovir à forte dose et pendant au moins 3 mois (Couchoud et al., 1998). La prévention ciblée avec mise en place du traitement anticipé est également une alternative, moins étudiée, mais qui a déjà fait preuve d'efficacité (Hibberd et al., 1995).

Chez les patients sidéens, le traitement de la rétinite, principale expression clinique du CMVH, et des autres formes de la maladie est possible par ganciclovir IV (5mg/kg x 2/jour pendant 14 à 21 jours), par ganciclovir en intravitréen, par foscarnet IV (90 à 100mg/kg/12h pendant 14 à 21j), ou par cidofovir (5mg/kg/semaine) (Anduze-Faris et al., 2000). Des études prometteuses ont été réalisées avec le valganciclovir versus ganciclovir VO soulignant les avantages de la forme pro drogue. Le traitement par ganciclovir oral (3g/jour en trois prises) a reçu une autorisation de mise sur le marché comme alternative au traitement IV d'entretien. La mise en place des trithérapies antirétrovirales a considérablement modifié la durée du traitement d'entretien le réduisant à quelques semaines. Le traitement anticipé par valganciclovir devant un marqueur biologique positif comme l'antigénémie semble le plus prometteur.

2.5.3 Résistance du CMVH aux antiviraux

Les trois inhibiteurs de l'ADN polymérase, représentés par le ganciclovir, le foscarnet, le cidofovir, sont susceptibles d'être mis en échec par le développement de résistance. Des mutations de la protéine kinase virale UL97 (mutations des codons 460, 594, 595), en particulier au niveau de son site catalytique, réduisent la première phosphorylation indispensable au GCV. L'ADN polymérase codée par le gène UL54 est également une cible potentielle de mutation induite par un traitement préalable par GCV et responsable de résistance croisée avec le CDV. Certaines mutations peuvent ainsi conduire à une diminution de l'affinité de l'enzyme pour le ganciclovir-triphosphate par rapport à la guanosine-

triphosphate. Les positions stratégiques sont alors les codons 412, la 501, 987 (Legendre, 2000). Des mutations 700, 715 et 781 sur ce même gène peuvent induire des résistances au foscarnet. Pour mettre en évidence ces résistances, la méthode phénotypique avec détermination de la CI50 ou CI90, bien que lourde, reste une méthode très utilisée. Le séquençage des gènes UL97 et UL54 est la méthode de référence. Dans de rares cas la détection de mutations par la réalisation de ces génotypes s'accompagne d'un phénotype sensible. Ce type de discordance peut trouver une explication dans l'hétérogénéité de certains isolats rendant le phénotypage complexe. Les traitements prolongés et répétés seraient en cause dans l'apparition de ces résistances. Concernant les isolats résistants au GCV, leur prévalence varie selon les études et selon le type de patients. Elle ne dépasse pas 10% (Alain et al., 1997). Il est très occasionnel d'observer une souche résistante avant tout traitement.

2.5.4 Prophylaxie et vaccination

Outre le traitement préventif ou anticipé par le ganciclovir, actuellement évalué chez des patients greffés ou sidéens, la prévention est essentiellement représentée par la diminution du risque de contamination en administrant des produits sanguins issus de patients séronégatifs pour le CMVH aux patients greffés ou au moins déleucocytés (Bowden et al., 1991). Des études récentes, par méta-analyse, ont abouti à des résultats contradictoires sur l'efficacité des immunoglobulines, par ailleurs, onéreuses dans la prévention.

Concernant le risque materno-fœtal, la détermination du statut de la mère, beaucoup discutée, pourrait être envisagée pour les femmes à haut risque (infirmière, personnel de crèche, pédiatre, jeune maman...) assorti de mesures d'hygiène nécessaire en cas de séro-négativité.

La vaccination n'est pas encore de pratique courante. Un vaccin atténué préparé à partir d'une souche de référence (après plusieurs passages en culture cellulaire) a entraîné, après une injection sous-cutanée, l'apparition d'anticorps en quantité faible. Celui-ci testé chez des greffés rénaux séronégatifs avant la greffe ne réduit pas l'incidence ultérieure de l'infection mais sa morbidité et sa gravité (Starr et al., 1991). Parallèlement des vaccins recombinants à partir des gènes de glycoprotéines du virus (gB et gH) sont préparés après clonage et expression dans des vecteurs plasmidiques (Plotkin, 1999). L'utilisation de vaccin recombinant qui consiste à faire exprimer la ou les protéines d'intérêt par un virus le canarypox, utilisé comme vecteur est en développement (Adler et al., 1999). Mais il existe un risque de développement d'une immunité contre le canarypox. Enfin, les vaccins ADN représentés par des plasmides porteurs d'un ou plusieurs gènes sont étudiés.

L'avenir paraît également résider dans la constitution d'une immunité T cellulaire spécifique du CMVH. Ainsi la faisabilité et la tolérance de cette méthode de prévention sont en cours d'évaluation.

3-DONNEES GENERALES SUR L'HERPESVIRUS DE TYPE 6 (HHV6)

3.1 Découverte de l'HHV6

L'HHV6 a été isolé fortuitement par l'équipe de Salahuddin en 1986 lors de cultures de lymphocytes de patients présentant des syndromes lymphoprolifératifs B d'où sa première dénomination de HBLV (*Human B lymphotropic virus*) (Salahuddin et al., 1986). Deux de ces patients étant séropositifs vis à vis du VIH, d'emblée ce nouveau virus a été évoqué comme un cofacteur de la progression du SIDA. Son effet cytopathogène et ses caractéristiques structurales ont permis d'emblée de le classer dans la famille des *Herpesviridae*. Pour des raisons de taxonomie, ce virus HBLV a été renommé Herpesvirus Humain de type 6 en 1987 (Ablashi et al., 1991). En 1988, le nouvel herpesvirus est isolé dans des lymphocytes de quatre très jeunes patients atteints d'exanthème subit (Yamanishi et al., 1988). Ainsi l'agent étiologique de cette pathologie est identifié. L'exanthème subit ou «roséole infantile» ou «6^{ème} maladie» est décrit chez les jeunes enfants depuis le début du 20^{ème} siècle, caractérisé par l'apparition séquentielle d'une fièvre, en général élevée, puis d'une éruption bénigne régressant sans traitement.

3.2 Polymorphisme

Les souches d'HHV6 ont été rapidement classées en deux variants A et B, L'HHV-6A et l'HHV-6B. Elles présentent des caractères épidémiologiques, immunologiques, et moléculaires propres à chacun justifiant leur individualisation (Ablashi et al., 1991). Ainsi, existe-t-il une divergence de 5% entre les génomes de l'HHV-6A et de l'HHV-6B, montrée au cours des études de restriction enzymatique et de séquençage (Dominguez et al., 1999). Des épitopes antigéniques différents ont été identifiés (Campadelli-Fiume et al., 1993) témoignant des différences phénotypiques entre les deux variants. *In vivo*, des différences ont été évoquées sur l'impact clinique de chaque variant avec notamment une plus forte incidence de l'HHV6B dans l'exanthème subit (Yamanishi et al., 1990) alors qu'*in vitro* des différences de tropisme cellulaire sont à souligner (Campadelli-Fiume et al., 1999).

3.3 Epidémiologie et transmission

L'épidémiologie de l'HHV6 est marquée par son caractère ubiquitaire correspondant à une répartition mondiale non saisonnière et par sa très forte séroprévalence chez les enfants dès leur plus jeune âge.

3.3.1 Incidence et prévalence

Du fait du manque de test sérologique spécifique de chaque variant et du caractère relativement banal de la principale forme pathologique, il est difficile de décrire avec exactitude la prévalence et la distribution virale notamment en fonction du type.

Dans la majorité des populations, la séroprévalence dépasse 90% et peut même atteindre 100% avec une séroconversion rapide après la naissance, dans 90% des cas avant 2 ans (Braun et al., 1997). Les études complémentaires à la sérologie, réalisées par PCR, témoignent du caractère prédominant de l'HHV6B avant l'âge de 3 ans. Par contre, des inconnues demeurent sur l'âge d'acquisition de l'HHV6A et sur la possibilité d'une protection croisée entre les deux virus.

3.3.2 Transmission

La salive est sans aucun doute la première source de contamination virale, pour l'HHV6B, le virus étant hébergé, entre autre, par les glandes salivaires. Il s'agit donc essentiellement d'une transmission horizontale, par voie oro-pharyngée, entre des personnes vivant en promiscuité : enfants, parents-enfants, dans les crèches... Parmi les autres modes, des transmission ont été rapportées lors de transplantations chez des patients séronégatifs (Yoshikawa et al., 1998). Les voies sexuelles et sanguines sont aussi évoquées. Elles sont difficiles à démontrer étant donnée la forte prévalence à l'âge adulte du virus.

Une mise en évidence d'une excrétion virale au niveau du tractus génital féminin et une transmission intra utérine ont été décrites (Aubin et al., 1992). Les études par PCR ont permis de conclure que des réactivations virales étaient fréquentes aux cours des grossesses et pouvaient conduire à une transmission fœtale (Dahl et al., 1999).

Les réactivations de l'HHV6 sont fréquentes, passant inaperçues et entraînant rarement une virémie chez l'immunocompétent. Chez le patient immunodéprimé, elles sont associées à différents signes cliniques plus ou moins graves. Des études prospectives, utilisant la biologie moléculaire menées chez des allo et des autogreffés de moelle osseuse ont démontré la survenue d'infection active chez presque la moitié de ces patients (60% pour Wilborn *et*

al(Wilborn et al., 1994a) ; 42.5% pour Imbert-marcille *et al* (Imbert-Marcille et al., 2000b)) Elles ont été, notamment, associées à un effet myélosuppressif témoignant de l'effet délétère de ces réactivations virales chez ces patients.

3.4 Infection humaine

3.4.1 Histoire naturelle

Communément à ce qui est décrit pour tous les autres Herpesvirus, après une phase d'incubation de 5 à 15 jours, la primo-infection survient très tôt dans l'enfance. Elle est suivie d'une phase de latence dans différents sites de l'organisme, phase pour laquelle des inconnues subsistent. Au cours de celle-ci, des phases de réactivations endogènes ou des réinfections exogènes surviennent. Les expressions cliniques sont silencieuses chez l'immunocompétent et souvent symptomatiques chez les patients immunodéprimés.

3.4.1.1 Physiologie et sites cellulaires infectés

Après une transmission du virus, le plus fréquemment par voie orale, la primo-infection se déroule au niveau de l'oropharynx. Grâce aux techniques de biologie moléculaire et marquage antigénique, l'HHV6 a été détecté dans de nombreux compartiments de l'organisme.

In vivo, l'HHV6 a un tropisme préférentiel pour les cellules mononucléées du système hématopoïétique. Le site majeur de réplication virale au cours des infections actives est ainsi représenté par les lymphocytes T CD4+ circulants. Ces mêmes lymphocytes T jouent un rôle dans le phénomène de latence virale. Les lymphocytes CD8+, les cellules NK sont aussi capables de supporter une réplication virale. Les cellules épithéliales glandulaires sont le site d'une forte réplication virale dès le début de la primo-infection. D'autres cellules ont été identifiées comme site de réplication et/ou de latence virale : les macrophages, les lymphocytes B, les histiocytes, les cellules endothéliales et épithéliales, les cellules gliales et les neurones cérébraux. Les sites infectés par le virus sont ainsi très nombreux représentés par les amygdales, les ganglions lymphatiques, le cerveau, le foie, le rein, la peau, les poumons ou encore la moelle osseuse (Dockrell, 2003).

L'identification du récepteur cellulaire de l'HHV6, le CD46, glycoprotéine ubiquitaire et rattachée à un ensemble de protéines intervenant dans la régulation de l'activation du complément, est une des explications de cette large représentation (Santoro et al., 1999) .

3.4.1.2 Latence et réactivation

Après la survenue de la primo-infection, comme pour les autres Herpesvirus, l'HHV6 persiste dans l'organisme. Cette persistance peut elle-même être découpée en période de latence d'infection chronique avec un très faible niveau de production virale et de réactivation. L'état latent est défini par l'absence de cycle viral lytique, accompagné d'une expression limitée de certains gènes sous la forme de transcrits de latence dans la région IE1/IE2 (Kondo et al., 2002a; Kondo et al., 2002b). L'hypothèse d'une intégration du génome viral dans l'ADN des cellules mononucléées périphériques a par ailleurs été émise, en réalisant une étude de profil de restriction qui a conduit à la détection d'éléments du génome viral dans le bras court du chromosome 17 (Luppi et al., 1998). Divers sites de latence sont clairement identifiés, parmi lesquels au niveau sanguin: les monocytes (Kondo et al., 1991), les progéniteurs médullaires (Luppi et al., 1999). Peuvent également être cités: les ganglions lymphatiques, les cellules épithéliales des glandes salivaires, les cellules nerveuses du système périphérique et central, les cellules endothéliales de différents organes (rein, poumon, la peau). A partir de certains de ces sites, et selon un mécanisme partiellement élucidé (influencé par l'immunodépression), des réactivations caractérisées par la survenue d'un cycle de réplication complet, sont observées conduisant à une infection récurrente.

3.4.2 Réponse immunitaire

A la suite de la primo-infection, les anticorps apparaissent en 5 à 7 jours après les premiers signes cliniques sous forme d'IgM neutralisantes avec un pic atteint en 2 à 3 semaines suivi par une disparition au bout de 2 à 3 mois (Suga et al., 1992). La réponse par IgG survient dans les 7 à 10 jours après la phase fébrile de la roséole avec maintien d'un taux résiduel variable. Certains épitopes reconnus par les anticorps neutralisants sont identifiés : gB, gH et gp 82-105 (Pfeiffer et al., 1993).

Cette immunité humorale est sans aucun doute protectrice, comme en témoigne l'absence d'infection du nouveau-né qui a acquis les anticorps maternels. La primo-infection survient à partir de 4-6 mois au moment où l'immunité transmise par la mère s'affaiblit pour atteindre un pic entre 6 et 12 mois (Huang et al., 1992). Les études cliniques, notamment celles des réactivations à HHV6 chez les patients immunodéprimés, argumentent du rôle important joué par l'immunité cellulaire dans la lutte contre les primo-infections et les réactivations

(Carrigan et al., 1991; Corbellino et al., 1993). La réponse cellulaire T est généralement présente dans la population adulte immunocompétente (Wang et al., 1999). Des clones cellulaires de lymphocytes T spécifiques de la réponse à l'HHV6 ont été identifiés *in vitro* (Yasukawa et al., 1993).

Parmi les acteurs de la réponse non spécifique, l'interféron γ joue un rôle dans la limitation de l'infection à HHV6 (Kikuta et al., 1990). Les cellules NK (cellules susceptibles d'être infectées par le virus) entraînent une augmentation de la synthèse d'IL15 et de la production d'IFN γ .

3.4.3 Rôle " immunosubversif "

Comme pour le CMVH, la possibilité d'un rôle immunosuppresseur/immunosubversif joué par l'HHV6 est de plus en plus envisagé d'autant plus que le tropisme de ce virus s'étend à de nombreux effecteurs de l'immunité. Des études, *in vitro*, ont montré que l'infection de clones de cellules T par l'HHV6 diminuait l'expression de CD3 (Lusso et al., 1991b). Ce phénomène est susceptible de s'exprimer, *in vivo*, par une diminution de l'activation des cellules T participant ainsi aux mécanismes d'immunosubversion (Flamand et al., 1995). L'interaction de l'HHV6 avec les cellules immunitaires s'accompagne également d'une stimulation des cellules NK, d'une induction de la libération de cytokines par les cellules infectées : IFN γ , IL-1 β , *tumor necrosis factor* (TNF) (Flamand et al., 1991; Takahashi et al., 1992) et d'une augmentation de l'expression de la molécule CD4+ à la surface des lymphocytes T CD8+ et des cellules NK (Lusso et al., 1991a). Le virus semble être en mesure, par ailleurs, d'entraver l'activation des monocytes (Burd et al., 1993). Il serait susceptible de moduler la réponse inflammatoire à l'infection en modulant le chimiotactisme des cellules infectées (Hasegawa et al., 2001).

Tous ces phénomènes d'altération de la réponse cellulaire et de libération de cytokines peuvent contribuer à des désordres lymphoprolifératifs. De plus, l'hypothèse d'interactions entre l'HHV6 et d'autres virus notamment le VIH est envisagée. En effet, l'HHV6 comme le VIH, a pour principale cible les cellules CD4+ avec la mise en évidence *in vitro* d'une augmentation de l'expression de la molécule CD4 à la surface des cellules (Luppi et al., 1993). Les mécanismes exacts de cette interaction restent à élucider. Cliniquement l'HHV6 pourrait être un co-facteur de la progression du SIDA. De nombreuses interactions entre l'HHV6 et d'autres virus sont actuellement suspectées en particulier avec les autres *Betaherpesvirinae* : CMVH, HHV7 (DesJardin et al., 2001).

3.5 Manifestations cliniques

3.5.1 Au cours de la primo infection

Depuis 1988, l'HHV6 est reconnu comme le principal agent étiologique de l'exanthème subit ou roséole infantile survenant très communément vers l'âge de 6 mois (Yamanishi et al., 1988). Survenant avec une incidence variable selon la situation géographique et sans influence saisonnière, ces primo-infections sont plus ou moins apparentes. Lorsqu'elles sont symptomatiques, comme c'est le cas par exemple dans 60% des primo-infections au Japon, elles se présentent sous la forme d'une fièvre élevée (supérieure à 39°C) pendant 3 à 5 jours. Elles représentent 15% à 40% des cas d'admissions pour hyperthermie aux urgences pédiatriques (Hall et al., 1994). Le plus souvent celle-ci est suivie par l'apparition d'un érythème maculeux ou papuleux persistant sous la forme d'un rash pendant 1 à 3 jours. Dans certaines formes moins évidentes, le seul composant clinique sera la forte fièvre ou le rash cutané. Biologiquement, une lymphocytose et une neutropénie sont fréquemment associées. Des formes plus graves sont décrites avec atteinte des voies respiratoire, inflammation des tympans, symptômes intestinaux. Des complications peuvent apparaître comme une hépatomégalie, un dysfonctionnement hépatique, un purpura thrombopénique, une thrombocytémie, un syndrome hémotophagocytaire. Les complications neurologiques sont relativement fréquentes : syndrome méningé, encéphalite, convulsions. Si des formes d'encéphalite mortelle, d'hémi-parésie, de retard mental ou d'hépatite fulminante (Asano et al., 1990) ont été décrites, la majorité des complications rentrent spontanément dans l'ordre. Les formes très rares de primo-infection chez l'adulte, sont souvent plus graves que les formes infantiles, fréquemment associées à une lymphadénopathie prolongée, un syndrome mononucléosique ou une hépatite.

3.5.2 Au cours des réactivations

Les réactivations de ce virus sont décrites chez différentes catégories d'immunodéprimés : les transplantés de moelle osseuse, d'organe solide (rein, foie, cœur) et les patients sidéens. Leurs expressions cliniques restent mal connues.

3.5.2.1 Dans le cas de la greffe de moelle osseuse

Des études ont été menées sur les réactivations à HHV6 chez les allo et autogreffés de la moelle osseuse pour élucider le lien avec des observations cliniques (Cone et al., 1999) et mieux estimer leur fréquence. Ainsi dans ces études, l'incidence de la survenue d'une réactivation est estimée selon les auteurs entre 37% et 50% (Drobyski et al., 1993a; Kadakia et al., 1996). Le type de greffe, allogénique ou autologue, ne semble pas influencer cette fréquence. Alors que Kadakia dans son étude sur 36 greffés (15 allo et 21 auto) ne fait aucun lien entre ces réactivations et la survenue d'une symptomatologie clinique, si ce n'est la survenue d'un sinusite, d'autres auteurs ont décrits la survenue contemporaine de différentes manifestations. Le variant B apparaît comme plus fréquent lors de la survenue de pathologies en post-greffe imputées à l'HHV6 (Drobyski et al., 1994).

En 1991, Carrigan et al (Carrigan et al., 1991) a été le premier à décrire une pneumopathie associée à l'HHV6 chez un receveur de greffe médullaire. Il est parvenu à isoler le virus des lymphocytes infectés dans les lavages broncho-alvéolaire. Plus tard en 1993, (Cone et al., 1993a), puis Knox en 1994 (Knox and Carrigan, 1994) ont corrélié l'existence d'une forte quantité d'ADN viral dans le tissu pulmonaire à la survenue d'une pneumopathie. Il reste, actuellement, à élucider le rôle exact d'HHV6 dans cette pathologie.

Différentes formes biologiques et/ou cliniques (épisodes fébriles, rash cutané) ont également été observées chez de jeunes enfants greffés, au cours d'une étude prospective, témoignant de l'impact important de ce virus (48%) chez ces jeunes patients (Yoshikawa et al., 1991). Cette symptomatologie clinique a également été observée chez des adultes (Imbert-Marcille et al., 2000b).

Par ailleurs, l'HHV6 a été associé à la survenue d'encéphalite chez ces patients alors qu'aucune autre étiologie n'était retrouvée (Drobyski et al., 1994), (Griffiths et al., 2000). Récemment, il a été démontré que l'utilisation de l'anticorps anti-CD3, en prophylaxie de la GvHD, augmentait le risque de développer une encéphalite.

La relation entre l'apparition d'une GvHD et d'infection à HHV6 a été évoquée par différents auteurs (Appleton et al., 1995; Cone et al., 1993a; Wilborn et al., 1994a). Récemment, l'étude prospective menée à Nantes chez des patients d'hématologie (Imbert-Marcille et al., 2000b) met en évidence une association entre la détection du génome viral dans les lymphocytes et la

gravité de la GvHD sans qu'il puisse être affirmé si l'HHV6 est la cause ou la conséquence de la GvHD.

D'autres auteurs ont rapporté un lien très probable entre l'infection à HHV6 et l'observation d'une myélosuppression pouvant conduire à un retard de la sortie d'aplasie ou une insuffisance médullaire à distance d'une récupération d'une hématopoïèse normale, toutes deux particulièrement handicapantes chez ces patients (Carrigan and Knox, 1994; Drobyski et al., 1993a; Imbert-Marcille et al., 2000b). Le recours aux méthodes *in vitro* a alors été envisagé par ces auteurs pour mieux comprendre les mécanismes de ce phénomène.

3.5.2.2 Chez les greffés d'organes solides

Une association a été rapportée entre le rejet du greffon chez des receveurs de rein et la réactivation à HHV6 (Humar et al., 2002b; Okuno et al., 1990). Une autre étude prospective menée chez 65 transplantés confirme la survenue d'une réactivation dans les 3 mois suivant la greffe chez la moitié des patients, sans confirmer l'existence d'un lien entre l'infection à HHV6 et un rejet (Yoshikawa et al., 1992).

Chez les transplantés hépatiques, en plus de la survenue d'une fièvre, d'un rash cutanée, de l'observation d'infections fongiques opportunistes, de sévères cytopénies ont été décrites au cours de réactivations dans les 50 premiers jours après la greffe (Lautenschlager et al., 1998; Singh et al., 1995).

3.5.2.3 Chez les patients infectés par le VIH

Dans le cas du syndrome d'immunodéficience humaine, le lien entre l'HHV6 et le VIH remonte à la découverte de l'herpesvirus. Lusso et Gallo (Lusso and Gallo, 1994) ont décrit le rôle joué par l'HHV6 comme cofacteur d'immunodépression du SIDA. Des études contradictoires ont été publiées concernant l'impact de l'HHV6 dans la progression du SIDA (Chen et al., 1992; Spira et al., 1990). Cependant, lors des études réalisées chez des enfants, l'hypothèse d'un impact probable de l'HHV6 sur une progression vers la maladie domine (Kositanont et al., 1999). Des études post mortem témoignent de la présence de l'HHV6 dans de très nombreux organes de patients séropositifs pour le VIH (Knox and Carrigan, 1994). Par ailleurs, chez des patients sidéens, une implication entre HHV6 et la survenue de rétinites (Fillet et al., 1996) (avec comme cofacteur le CMVH) et d'encéphalites (Saito et al., 1995) a été mise en évidence.

3.5.3 Pathologies potentiellement associées

3.5.3.1 HHV6 et oncogénèse

Des observations, *in vitro*, et sur un modèle de souris ont conduit à émettre des hypothèses sur un rôle joué par l'HHV6 dans le développement d'un processus oncogène. Elles témoignent du pouvoir transformant, *in vitro*, du virus et de sa capacité à induire une lymphoprolifération. Des études sérologiques ont été réalisées chez des patients atteints de lymphomes hodgkinien et non hodgkinien (LMNH) (Di Luca et al., 1994) rendant compte d'un taux d'anticorps plus élevé chez les patients atteints de lymphome, par rapport à la population générale sans que cela ne soit imputable à des réactivations virales plus fréquentes. Une forte prévalence du virus a été constatée dans les carcinomes oraux des glandes salivaires (Yadav et al., 1997). Cependant, actuellement, aucune étude ne conclut à un lien entre l'HHV6 quelque soit le variant avec un processus malin.

3.5.3.2 HHV6 et pathologies spécifiques

Des études sont actuellement en cours pour rechercher le lien entre l'HHV6 et différentes pathologies aux étiologies inconnues, notamment, dans des contextes d'auto immunité. Le syndrome de Goujerot-Sjögren (SGS) en fait partie. Un des mécanismes possible serait une infection persistante des cellules épithéliales glandulaires exprimant alors plus d'adhésines et de molécules de HLA de classe I et II. Les lymphocytes T joueraient alors le rôle d'amplificateur de cette réponse aboutissant à la production de cytokines. Dans ce cadre, un rôle joué par l'HHV6 est envisageable. Les études menées dans ce sens n'ont jusqu'alors pas permis de le démontrer rendant le lien difficile à faire (Ranger-Rogez et al., 1995). Une autre pathologie concernée serait la sclérose en plaques (SEP). Des techniques moléculaires ont été développées en vue de rechercher un agent pathogène associé à cette pathologie caractérisée par une réaction auto immune (probablement inflammatoire) contre des composants de la myéline capable de détruire les oligo dendrocytes. Ainsi une quantification de l'HHV6, au niveau des noyaux des oligodendrocytes des plaques de SEP et à distance, a été réalisée par l'équipe de Challoner (Challoner et al., 1995) démontrant une grande densité de génome viral dans les plaques. D'autres auteurs restent plus septiques par rapport à ces résultats démontrant, notamment, la détection du génome dans des neurones et cellules gliales normales en l'absence d'inflammation (Fillet et al., 1998).

3.5.3.3 Interaction de l'HHV6 et du CMVH chez les transplantés

La co-responsabilité de l'HHV6 et le CMVH, dans une symptomatologie clinique en post transplantation, est envisagée par différentes équipes. Leur tropisme cellulaire assez proche, leur impact respectif sévère chez les greffés, et leurs capacités conjointes de perturber le système immunitaire sont autant d'arguments en faveur d'une interaction possible.

Les premières observations cliniques rapportent des signes cliniques plus sévères chez des transplantés d'organe solide au cours de la survenue d'infection active à HHV6 associée à une infection à CMVH (Herbein et al., 1996). L'étude d'Osman, chez 56 transplantés rénaux, portant sur le suivi de l'ADNémie du CMVH, de l'HHV6 et de l'HHV7, dans les leucocytes périphériques, conclut à une possible augmentation du risque de développement de la maladie à CMVH pour les patients présentant simultanément une réactivation à HHV6. Dans cette même étude, un impact encore plus important de la réactivation d'HHV7 est décrite. Le rôle prédominant de l'HHV7 par rapport à l'HHV6, comme co-facteur de la maladie à CMVH a été par ailleurs souligné lors d'une étude prospective réalisée chez 52 greffés rénaux (Kidd et al., 2000).

Chez les transplantés hépatiques le rôle de la réactivation de l'HHV6 dans la sévérité de la maladie à CMVH a également été évalué. En 2001, Desjardin *et al* (DesJardin et al., 2001) rapportent une étude prospective, réalisée chez 139 patients greffés hépatiques, basée sur les marqueurs sérologiques, dont les résultats sont globalement plus en faveur d'un lien entre la réactivation à HHV6 et des maladies graves à CMVH. Récemment, Lautenschlager *et al* (Lautenschlager et al., 2000b) ont recherché l'antigénémie de l'HHV6 dans les cellules mononucléées chez des greffés du foie présentant une maladie à CMVH et concluent à une association entre l'infection à CMVH et la détection des antigènes de l'HHV6. Ils constatent une prédisposition du patient à développer une primo infection à CMVH à la suite d'une réactivation à HHV6 (Dockrell et al., 1997; Lautenschlager et al., 2002). L'hypothèse d'une réactivation concomitante des *Betaherpervirinae*, liée à la perturbation du système immunitaire, est également évoquée (Humar et al., 2002a; Mendez et al., 2001).

Concernant les patients greffés de moelle osseuse, il existe actuellement peu de données sur les interactions des deux virus, laissant l'opportunité de réaliser des investigations.

3.6 Traitement

Actuellement, encore peu de données sont retrouvées dans la littérature concernant le traitement des infections à HHV6. Les formes chez l'immunocompétent, généralement bénignes et spontanément résolutive, ne justifient pas d'envisager une thérapeutique. Par contre, un traitement des infections à HHV6 chez les immunodéprimés apparaît nécessaire, dans certains cas, sans qu'il n'existe de véritable consensus sur la démarche thérapeutique à adopter.

Les connaissances de l'efficacité des antiviraux sur ce virus reposent essentiellement sur des études de sensibilité, en culture cellulaire, non standardisée. Les cellules utilisées et les souches sont variables. Ces études, *in vitro*, ont, cependant, d'ores et déjà, permis de conclure à une relative résistance à l'aciclovir et à une sensibilité du virus aux antiviraux utilisés contre le CMVH : le foscarnet, le ganciclovir, le cidofovir, avec une efficacité supérieure de cette dernière molécule non dénuée de toxicité (Yoshida et al., 1998).

Aucune étude prospective randomisée, sur le traitement des infections à HHV6, n'ayant été effectuée, seuls des cas cliniques et quelques études rétrospectives ont été rapportées. Ainsi, des encéphalites survenant chez des greffés de moelle osseuse, pour lesquelles aucun autre agent étiologique que l'HHV6 n'avait été mis en évidence, ont régressé sous ganciclovir (Mookerjee and Vogelsang, 1997) ou sous foscarnet (Rieux et al., 1998). Une étude rétrospective récente, lors des traitements du CMVH par ganciclovir ou foscarnet, chez 11 patients greffés de moelle osseuse présentant des signes d'atteintes neurologiques, démontre une diminution de la charge virale HHV6 dans le liquide céphalorachidien (Zerr et al., 2002). Dans cette même étude, chez un patient, l'ADN d'une souche d'HHV6A est resté détectable en dépit du traitement, soulevant le problème d'une éventuelle résistance de cette souche *in vivo*.

In vitro, des recherches de résistance de l'HHV6 aux antiviraux étudient les mutations du gène U69 (gène de la protéine kinase équivalent au gène UL97 pour le CMVH) (Manichanh et al., 2001).

Des études futures seront, également nécessaires, pour envisager la mise en place d'un traitement préemptif, comme pour CMVH, en se basant sur un marqueur biologique, tel que la charge virale, chez les patients immunodéprimés. Le valaciclovir administré par voie orale serait dans ce cadre un candidat potentiel.

4-CARACTERES STRUCTURAUX ET REPLICATIFS DU CMVH ET DE L'HHV6

4.1 Introduction

Les *Herspesviridae* ont en commun une structure typique. Le diamètre des virions est compris entre 180 et 200nm. Le génome, molécule d'ADN double brin, est protégé par une capside icosaédrique, elle-même entourée par un tégument et une enveloppe. La capside comprend 162 capsomères et représente un diamètre de 100 nm. Le tégument est souvent réparti de façon asymétrique autour de la capside et sa taille peut varier en fonction de la localisation du virus dans la cellule. L'enveloppe, indispensable à la virulence des herpesvirus, dérive de la membrane cellulaire et présente un aspect trilamellaire typique. Elle contient des spicules de petite taille correspondant à un nombre variable de glycoprotéines selon l'herpesvirus (8 nm) (Figure 4).

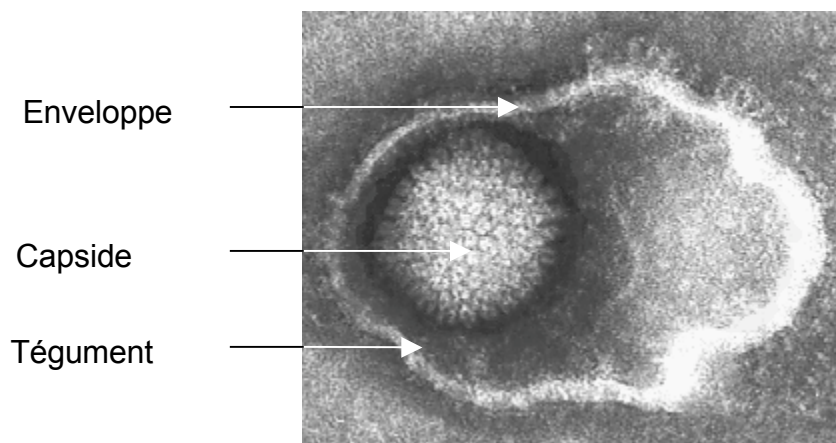


Figure 4: Structure des virions des *Betaherpesvirinae*: description à partir d'une photo de microscopie électronique en coloration négative (CMVHx100000)

(Cliché, Dr C Mollat, Laboratoire de Virologie, CHU Nantes)

Leur cycle de réplication complet (infection lytique) est typiquement et de façon classique divisé en trois phases avec des variations de durée selon les sous-familles (Figure 6). Certains auteurs ont proposé récemment une division plus subtile de ce cycle en définissant deux sous famille de gènes dans les deux premières phases (Oster and Hollsberg, 2002). Les *Betaherpesvirinae* sont caractérisés par leur cycle de réplication long.

4.2 Structure des particules virales

4.2.1 Les génomes

4.2.1.1 Le génome du CMVH

Le génome du CMVH est constitué d'une molécule d'ADN bicaténaire et linéaire de masse moléculaire relative de 150.10^6 daltons (229kb) et dont la teneur en bases G+C approche 58%. Il est caractérisé par l'existence de séquences génomiques répétées dont les critères de réitération permettent de le classer dans le groupe des génomes E. Schématiquement, l'ADN viral peut être divisé en deux segments de séquences uniques, une longue (UL: " Unique Long ", 82 % de la molécule) et une courte (US : " Unique Short ", 18 % de la molécule). La jonction des 2 segments est constituée de la répétition inversée des séquences d'ADN appelées IRL et IRS (*Internal Repeat Long* et *Internal Repeat Short*) selon qu'elles sont attachées à la séquence UL ou US. Aux extrémités de la molécule, les mêmes séquences inversées sont retrouvées dites terminales TRS et TRL selon leur point de liaison. Au cours de la réplication, il apparaît 4 formes isomères par changement de l'orientation relative des 2 segments UL et US. Des séquences réitérées directes (séquences " a ") de même orientation existent aux deux extrémités du génome et d'orientation inversée à la jonction des deux segments permettant la circularisation après action d'un enzyme l'exonucléase III (Figure 5a). Le génome du CMVH a été complètement séquencé à partir de la souche AD 169 (Chee et al., 1990) (european molecular Biology laboratory sequence database accession number X17403). 208 cadres de lecture ouverts ou ORFs sont dénombrés. Ils sont désignés et numérotés selon leur localisation dans les régions uniques, UL1,UL2...ou US1 ou dans leurs régions répétées (TRL, IRS, IRL et TRS) et peuvent coder pour des protéines (pULx), des glycoprotéines (gpULx), ou des phosphoprotéines (ppULx). Parmi les ORFs séquencés, 41 sont

indispensables pour la croissance sur des fibroblastes humains et certains de ces cadres de lecture ouverts correspondent à des protéines connues (Tableaux III et IV).

Le génome du CMVH s'individualise par rapport aux autres herpesvirus par sa grande densité en séquences répétées. L'homologie de séquence existant entre les ADN des différentes souches virales et notamment avec l'ADN de la souche de référence AD 169 est supérieure à 80%. Les zones les plus hétérogènes sont les répétitions directes « a » et la zone de jonction de UL et TRL (Mocarski and Courcelle, 2001).

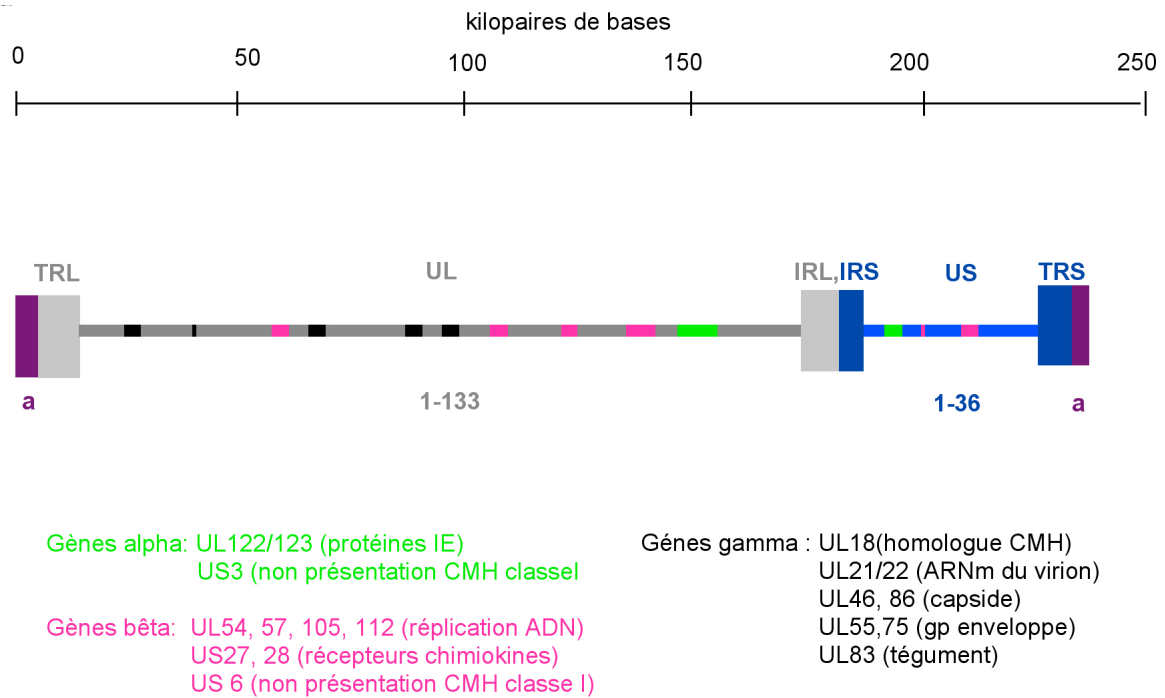


Figure 5a

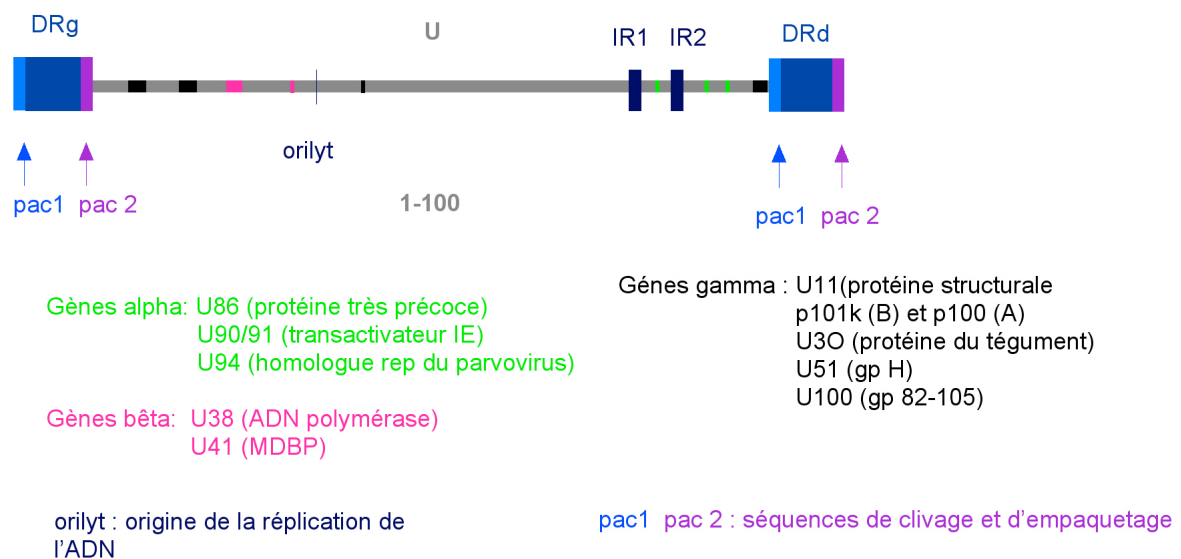


Figure 5 b

Figure 5 : Organisation du génome du CMVH (5a) et du génome de l'HHV6 (5b) : localisation de quelques gènes

Tableau III : Principaux gènes non structuraux du CMVH et produits des gènes, d'après (Mocarski and Courcelle, 2001)

ORF	Famille de gène	Classe	Produits du gène	Fonctions/Caractéristiques
UL18		□	Gp UL18	Homologie du CMVH
UL20				Gp homologue du TCR
UL33		□ □ □ □	Gp UL33	Recepteur couplé à la protéine G
UL36*-38	US22	□		Transactivateurs de IE
UL44		□	p52, ICP36, ppUL44	Facteur de processivité de l'ADN pol
UL54		□	ADN polymérase	Commun aux herpesvirus
UL57		□	ppUL57, ICP8, ssDNABP	Protéine de liaison ADN nucléaire
UL69		□	ppUL69	Transactivateur de IE
UL70		□		Helicase-primase
UL72		□		dUTPase
UL97		□	ppUL97	Kinase du Ganciclovir
UL98		□	DNase	Commun aux herpesvirus
UL101			Enzyme de la réplication	Commun aux herpesvirus
UL102			Enzyme de la réplication	Commun aux herpesvirus
UL105			Hélicase-primase	
UL112-113*		□		Protéine de liaison à l'ADN
UL114			Uracil-ADN glycosylase	
UL122-123*		□	pp72:IE1; pp86:IE2	IE1: protéine majeure très précoce
IRS1	US22	□		Transactivateur de IE
US3*	US2	□	g US2	Transactivateur de IE
US8	US6	□		
US27		□ □ □ □		Récepteur couple à la protéine G
US28		□ □ □ □	gp US28	C-C chemokine recepteur
TRS1	US22	□	TRS1	Transactivateur de IE

* gènes subissant un épissage

Tableau IV : Principaux gènes structuraux du CMVH et produits des gènes d'après (Mocarski and Courcelle, 2001)

CLO(ORF)	Famille de gène	Classe	Produits du gène	Fonctions/Caractéristiques
Enveloppe				
UL4	RL11	□	GpUL4 (gp48)	
UL55		□	GpUL55(gB)	Protéine majeur enveloppe
UL74			GpUL74(gO)	Protéine complexée gH/gL
UL75		□	GpUL75(gH)	Protéine complexée gO/gL
UL100		□	GpUL100(gM)	complexée à gN
UL115		□	GpUL115(gL)	Commun aux herpesvirus
Glycoprotéines de localisations inconnues				
UL16		□	GpUL15	Homologue du TCR
UL18		□	GpUL18	Similaire au CMH1
US10	US6	□		
US11	US6	□		
Tégument				
UL32		□	ppUL32(pp150)	
UL48		□	HMWP,pp200	Commun aux herpesvirus
UL65			pp67,ppUL65	
UL82	UL82	□	ppUL82(pp71)	Protéine du tégument
UL83	UL82	□	ppUL83(pp65)	Protéine du tégument (corps denses)
UL98		□	p59, UL99A	DNase
UL99				
Nucléocapside				
UL46		□	p34	Protéine mineure de la capside
UL48.5		□	SCP	
UL80A		□	p37	Protéine d'assemblage capside, commune aux herpesvirus
UL86		□	p155,pp150	Protéine majeur de la capside
Protéine de localisation inconnue				
UL56		□	pUL56	Commun aux herpesvirus

4.2.1.2 Le génome de l'HHV6

Le génome de l'HHV6, classé dans le groupe AB, mesure respectivement 159kb pour le variant A et 162kb pour le variant B (Isegawa et al., 1999), avec un pourcentage en G+C% relativement faible de 40-43 %. Il se décompose en une séquence unique centrale de 143-144kb contenant les cadres de lectures numérotés de U1-100, flanquée de deux séquences directement répétées (DR) respectivement DR_R à droite et DR_L à gauche de 9-13kb (Dominguez et al., 1999; Gompels et al., 1995; Isegawa et al., 1999). Aux deux extrémités de chaque séquence DR, des séquences GGGTA sont trouvées, répétées en tandem, identiques aux TRSs (*Telomeric Repeat Sequences*) des chromosomes humains. Ces séquences pourraient conférer au génome HHV6 la capacité de persister dans le noyau cellulaire pendant la phase d'infection latente (Thomson et al., 1994), pour d'autres auteurs, elles favoriseraient l'intégration virale. Des signaux pac 1 et pac 2, communs aux autres herpesvirus, sont également localisés aux deux extrémités de chacune des séquences DR. Ils participent au clivage et à l'empaquetage et permettent la concatémérisation du génome. Le gène très précoce IE (Immediate Early Gene) est lui-même entouré par des séquences répétées IR1 et IR2. La séquences IR2 contient des sites de liaison pour des facteurs de transcription cellulaire comme NF- κ B et semblerait agir comme activateur transcriptionnel (Figure 5b).

Le génome est décomposé en plus d'une centaine de cadres de lecture ouverts (*ORFs*) selon les auteurs et les souches : 115 pour la souche HST (Isegawa et al., 1999) et 119 pour la souche Z29 (Dominguez et al., 1999)... L'hypothèse de l'existence d'un épissage pour 11 gènes conduit à supposer que ces 119 *ORFs* correspondent à 97 gènes dont beaucoup restent indéterminés sur le plan fonctionnel. La séquence unique longue UL est en partie colinéaire avec celle du CMVH avec 70 gènes homologues entre les deux virus (Tableau V).

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

ORF		Identité en %	Gene bloc	Classe	Fonctions/caractéristiques	Homologue CMVH(classe)
HHV-6B (HST)	HHV-6A (U1102)					
DR1	DR1	86.4		□	Gène de la famille US22 du CMVH	
DR6	DR6	84.5		□	Gène de la famille US22 du CMVH	
DRHN1	abs			□		Exon IE1/IE2 (□)
U2	U2	92	beta	□	Gène de la famille US22 du CMVH	
U3	U3	901.1	beta	□	Transactivateur/ Gène de la famille US22 du	CMVH
U11	U11	80.1	beta	□	Protéine structurale :p101k (B) et p100(A)	UL32 (□)
U12*	U12*	89	beta	□	Recepteur couplé aux protéines G	UL33 (□)
U14	U14	86	beta	□□	Protéine antigénique du tégment	UL25
U16/17*	U16/17	95	beta	□ □□ □	IE-B/ Gène de la famille US22	UL36* (□)
U27	U27	95	1	□ □□ □	Facteur de processivité de l'ADN	UL44 (□)
U29	U29	96	1	□	Assemblage capsid et maturation de l'ADN	UL46 (□)
U30	U30	92	1	□	Protéine du tégment	UL47
U31	U31	93	1		Protéine large du tégment	UL48
U32	U32	95			Protéine de capsid	
U33	U33	98	1		Protéine du virion	UL49
U38	U38	97	2	□	ADN polymérase	UL54 (□)
U39	U39	96	2	□	Glycoprotéine gB	UL55 (□)
U40	U40	98	2		Transport/assemblage de la capsid	UL56
U41	U41	99	2	□	Protéine majeure de liaison à l'ADN	UL57
U42	U42	95	3	□	transactivateur	UL69
U47	U47	70			Glycoprotéine O	UL74 (□)
U48	U48	94	4	□	Glycoprotéine H	UL75 (□)
U51	U51	94		□ □□ □	Recepteur couplé aux protéines G	UL78
U53	U53	97	4	□	Protéinase	UL80
U54	U54	79			Transcactivateur/protéine du tégment	UL82/83 (□)
U57	U57	98	5		Protéine majeure de la capsid	UL86
U60/66*	U60/66	99	6		Empaquetage de l'ADN	UL89
U69	U69	94	6		Phosphotransférase/ kinase du GCV	UL97
U72	U72	97	6	□	Glycoprotéine M	UL100
U73	U73	97	nd	□ □□ □	OBP	
U74	U74	96	6	□	Complexe protéique hélicase-primase	UL102
U79	U79	77	nd	□	Réplication de l'ADN	UL112/113* (□)
U81	U81	94	7	□	Uracil Dnase glycosylase	UL114
U82	U82	93	7	□	Glycoprotéine L	UL115 (□)
U86	U86	64		□	IE-A/transactivateur	UL122* (□)
U90/91*	U90/91			□	IE-A/transcactivateur	
U94*	U94	97		□	Homologue <i>rep</i> du parvovirus/transactivateur	
U100*	U100	76		□	Glycoprotéine gp 82-105/épissé	

* gènes subissant un épissage

La majorité des gènes situés au centre de la région UL sont des gènes de régulation, des gènes codant pour des protéines de structure et de réplication du core, homologues de ceux retrouvés chez les autres herpesvirus et sont répartis en 7 régions ou blocs numérotés I-VII. Il existe des gènes propres aux *Betaherpesvirinae* situés à gauche des 7 blocs (zone bêta), parmi lesquels les gènes de la famille US-22 (supposée au départ exclusive du CMVH) et identifié sur le génome de l'HHV6.

Enfin, certains gènes sont spécifiques aux *Roseolovirus* (genre comprenant le CMVH, l'HHV6 et l'HHV7) situés à droite et à gauche des blocs I-VII, parmi lesquels U20, U21, U23, U24, U100. Moins de dix gènes ont été retrouvés uniquement sur le génome d'HHV6 sans homologue avec ceux de l'HHV7 : DR3, U6, U22, et, notamment, U94 (Clark, 2000; Oster and Hollsberg, 2002). Comme pour le cytomegalovirus, aucun gène codant pour une protéine à activité thymidine kinase n'a été identifié, mais il possède une « ganciclovir kinase » U69 (homologue de l'*ORF* UL97 du CMVH). Parmi leurs gènes précoces les roséolovirus possèdent le gène U73 codant pour une protéine se fixant à l'origine de la réplication (OBP) qui n'est retrouvé, par ailleurs, que chez les *Alphaherpesvirinae*. En dehors des zones de séquences répétées, deux régions génomiques ne codent pas pour des protéines : U41-42, qui correspondent à l'origine de la réplication lytique de l'ADN (*ori*lyt), et la région située entre U77-U79.

Les génomes des variants HHV6A et HHV6B ont été comparés, permettant de conclure à plus de 90% d'homologie des séquences nucléotidiques (Tableau V). Les régions situées entre U32 et U77 sont les plus conservées (95% d'identité). Les régions situées entre U86 et U100 et celle de la région DRr sont les plus divergentes, n'atteignant que 72 % d'identité en moyenne (Dominguez et al., 1999) (Isegawa et al., 1999). Les *Roseolovirus* ont la particularité de présenter peu de divergence dans leurs séquences génomiques entre des souches appartenant au même variant. Une des explications résiderait dans leur faible G+C% qui excluerait toute variation du troisième acide aminé à la troisième position du codon. Récemment, des *ORFs* spécifiques du variant B de l'HHV6 ont été identifiés désignés comme B3, B4, B5, B6, B7 et B8 faisant de ces zones génomiques des candidats intéressants pour la caractérisation des variants (Dominguez et al., 1999; Isegawa et al., 1999).

4.2.2 Capsides et enveloppes virales

4.2.2.1 La capside

Dense aux électrons en microscopie électronique, elle est constituée de 162 capsomères et comporte 2 protéines principales : la *Major Capsid Protein* (MCP de 155 kd) codée respectivement par pUL86 pour le CMVH et U57 pour l'HHV6 (représentant 90% des protéines de la capside), et une protéine mineure (34kd) qui permet l'ancrage de l'ADN génomique correspondant aux cadres de lecture ouvert UL46 du CMVH et U29 des roseolovirus. Elles sont analogues à celles retrouvées dans la capside d'*Herpesvirus simplex* de type 1. Deux autres protéines sont également nécessaires pour la constitution de la capside pUL49 et pUL85 du CMVH, pU33 et pU85 de l'HHV6.

4.2.2.2 Le tégment

Le tégment (ou “matrice”) situé entre la capside et l'enveloppe, est constitué de 7 protéines principales, pour la plupart phosphorylées. La ppUL32 du CMVH (p100 d'HHV-6A et p1201K d'HHV-6B codée par l'*ORF* U11), très immunogène, représente 20% (Benko et al., 1988) des protéines totales du virion. La ppUL83, ou pp65 (*ORF* U24 du génome de l'HHV6) présente dans le virion mature, est le composant majeur des “corps denses” du CMVH, particules virales abortives présentes dans le cytoplasme des cellules infectées.

4.2.2.3 L'enveloppe

Elle dérive des membranes cellulaires, modifiées par des glycoprotéines virales. Les gènes codant pour ces glycoprotéines, ainsi que leurs fonctions, sont connus. La gpUL55 du CMVH (*ORF* U39 chez l'HHV6) ou protéine gB intervient dans les phénomènes de fixation membranaire, dans la pénétration du virion dans les cellules, dans la transmission de cellule à cellule et dans la fusion des cellules infectées. Par clivage de son précurseur de 130-150kd, 2 formes sont obtenues, l'une de 55kd porteuse d'épitopes inducteurs d'anticorps de neutralisation et l'autre de 93kd pouvant être différente selon les souches. La gp UL75 du CMVH (*ORF* U48 de l'HHV6) ou gH (de 742 à 743 acides aminés) participe également à la fixation du virus à la membrane cellulaire.

4.2.3 ARN messagers associés aux particules de CMVH

Récemment ont été découverts des ARNm viraux et cellulaires directement associés à la particule virale du CMVH (Bresnahan and Shenk, 2000; Greijer et al., 2000). Ces transcrits seraient empaquetés dans le virion infectieux au moment de sa production et seraient délivrés dans la cellule hôte au cours du phénomène d'infection. Parmi les ARNm faisant parti de ce nouveau groupe de transcrit, les ARNm du gène R28070 (ARNm tardif UL22), des gènes IRL4 et IRL7(précoce), du gène UL109 (très précoce) ont été identifiés dans le travail de Bresnahan et Shenk. D'autres ARNm seraient également associés : ceux des gènes UL123 et UL65 (Greijer et al., 2000). Le rôle joué par ces ARNm et la voie empruntée pour leur incorporation sont encore au stade des hypothèses. Ils pourraient permettre la production de protéines virales avant une réelle activation de la transcription virale. Cette incorporation pourrait être parfaitement aléatoire et non spécifique survenant au cours de l'enveloppement de la capside.

4.3 Multiplication virale

4.3.1 Cellules cibles *in vivo* et *in vitro*

Le tropisme cellulaire du CMVH comme de l'HHV6 est très étendu suggérant l'utilisation de récepteurs exprimés sur un grand nombre de cellules. Ils présentent tous deux une spécificité d'hôte étroite et ne sont capables de se multiplier aussi bien *in vivo*, qu'*in vitro* que sur des cellules d'origine humaine.

Différents niveaux de permissivité des cellules aux virus sont définis. Les cellules permissives supportent un cycle de multiplication virale complet assurant la production de virions à la faveur d'une infection lytique. Les cellules, peu ou pas permissives, sont le site d'une infection dite abortive : le cycle de multiplication est bloqué aux phases très précoces ou précoces avant l'étape de réplication de l'ADN. Enfin les infections latentes sont définies, au plan moléculaire, par la présence du génome sous sa forme épisomale et, plus récemment, l'expression de transcrits dit de latence a été mise en évidence (Kondo et al., 2002b; Kondo et al., 1996) . Les mécanismes qui déterminent cette permissivité pour un type cellulaire donné sont mal définis.

Les récepteurs cellulaires du CMVH ne sont pas clairement établis. L'annexine II et les protéoglycanes héparine-sulfate des cellules, molécules très ubiquitaires et impliquées dans l'attachement d'autres virus, jouent un rôle important. La présence de facteurs cellulaires

intervenant de façon séquentielle ou totale après l'entrée du virion est envisagée. Les études *in vitro* ont par ailleurs montré que la différenciation cellulaire jouerait un rôle essentiel dans la permissivité cellulaire (Fish et al., 1996). Le CD13, est une ectopeptidase, sans aucun doute impliquée dans l'étape de fixation de haute affinité comme cela a été démontré sur le modèle de la souris.

L'équipe de Santoro et al (Santoro et al., 1999) a identifié, récemment, un des récepteurs cellulaires de l'HHV6 représenté par le CD46. CD46 est une glycoprotéine de type 1 ubiquitaire qui fait partie de la famille des protéines de régulation de l'activation du complément. *In vivo*, l'HHV6 infecte principalement au niveau sanguin les lymphocytes T et les monocytes/macrophages qui expriment par ailleurs CD4. Son tropisme concerne aussi les lymphocytes B. Selon le variant, des différences de tropisme sont constatées *in vivo* comme *in vitro*. Ainsi HHV-6B nécessite une maturation cellulaire associée à l'expression de CD3 alors que le variant A semble préférer les lymphocytes CD4+ peu différenciés (Takahashi et al., 1989). *In vitro*, le variant B ne se propage pas sur les cellules HSB-2. Ce même variant ne donne pas lieu à la formation de syncytia à l'inverse de l'HHV6A capable sans réplication virale de former des cellules géantes multinucléées (Mori et al., 2002). Enfin, en dépit de l'expression de CD46, certaines cellules de lignées T sont incapables de supporter la réplication virale ce qui témoigne de la nécessité de co-récepteurs, non encore identifiés.

4.3.2 Les étapes de la multiplication virale

4.3.2.1 Multiplication du CMVH

A partir du modèle *in vitro* de fibroblastes humains, modèle le plus couramment utilisé pour l'isolement du CMVH, les étapes de la multiplication virale du virus ont été en partie élucidées. Des études en microscopie électronique montrent que l'attachement et la pénétration surviennent à la surface de la cellule alors que la maturation est réalisée dans le noyau comme pour HSV1. La glycoprotéine d'enveloppe virale gp 55 (gpUL55, gB) se fixe à une annexine cellulaire ou aux protéoglycanes héparine-sulfate. L'homologue de la chaîne légère de la protéine HLA de classe I (UL18) est capable de se lier avec la α 2-microglobuline. La fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire est obtenue grâce à la gpUL75 (protéine gH) de l'enveloppe virale. La protéine de surface CD13 participerait également à la pénétration du virus. Pour certains types cellulaires, tels que les cellules endothéliales ou les cellules épithéliales de la rétine, le mécanisme de pénétration est l'endocytose. La capside,

après libération dans le cytoplasme, est transportée jusqu'à un pore nucléaire par lequel seul pénètre le complexe ADN-protéines virales. La protéine ppUL83 (pp65) fait partie de ces protéines activement transportées dans le noyau avant toute transcription virale. La fixation très rapide (dans l'heure qui suit) du virus aux récepteurs cellulaires permet l'activation de la fonction kinase de ces récepteurs et aboutit à la stimulation de la transcription de gènes cellulaires. La phospholipase C agit classiquement en augmentant la libération cytosolique d'inositol tri-phosphate et de diacylglycérol responsables, par le biais d'une augmentation du calcium intra-cellulaire, de l'activation de la protéine kinase C. La cascade de phosphorylation induite par la protéine kinase mobilise des facteurs de transcription cellulaire tel que NF- κ B permettant le passage dans le noyau de facteurs de transcription inactifs jusque là dans le cytoplasme. D'autres protéines du virion comme ppUL82 activent directement des gènes viraux et cellulaires. La réplication virale est réalisée dans le noyau où l'ADN devient détectable en 48 heures. Les protéines virales synthétisées dans le cytoplasme sont assemblées en capsides immatures dans le noyau aboutissant, en raison de leur accumulation, à une inclusion nucléaire (entre la 24ème et la 48ème heure). Après incorporation de l'ADN viral, les particules encore immatures s'enveloppent du feuillet interne de la membrane nucléaire et migrent dans le réticulum endoplasmique du cytoplasme. Dès lors une inclusion cytoplasmique se forme, caractéristique du CMVH, constituée de virions matures, enveloppés, et infectants mais aussi des corps denses deux à trois fois plus gros que les virions enveloppés formés de protéines virales synthétisées au sein du cytoplasme (porteuses d'une spécificité antigénique semblable à celle de l'enveloppe). La libération des virions, par un mécanisme d'exocytose, atteint un maximum le cinquième jour après le début de l'infection (Mocarski and Courcelle, 2001).

4.3.2.2 Multiplication de l'HHV6

La multiplication de l'HHV6 suit les mêmes grandes étapes. Le virus reconnaît le CD46, très probablement associé à d'autres co-récepteurs, sur sa cellule cible. L'attachement et l'entrée du virus dans la cellule hôte sont possibles grâce à la protéine gB (U39) et au complexe hétérodimérique, exprimé à la surface de l'enveloppe et formé des protéines gH(U48) et gL (U82) (Liu et al., 1993). Un troisième composant protéique, qui correspond à l'un des produits du gène U100 (gp 82-105) (Gompels et al., 1995; Pfeiffer et al., 1993) connu depuis longtemps, mais dont le rôle n'était pas clairement élucidé, a été très récemment identifié comme appartenant à ce complexe et identifié sous le nom de gQ (Mori et al., 2003). Le virus

se fixe et pénètre dans le cytoplasme, plus probablement, par un mécanisme de fusion (Santoro et al., 1999). La possibilité d'une entrée par un mécanisme d'endocytose a été également évoquée (Inoue et al., 1993). L'ADN est ensuite libéré dans le noyau où a lieu la réplication virale qui est amorcée au bout de 3 jours. Le tégusome qui correspond aux invaginations cytoplasmiques dans le noyau serait le site d'acquisition du tégument (Roffman et al., 1990). Les capsides bourgeonnent dans ce tégusome, et après acquisition du tégument, les particules virales sont relarguées dans le cytoplasme et prise en charge par des vacuoles. Ces vacuoles fusionnent avec la membrane plasmique aboutissant à la libération de virions au bout de 5 jours dans le cytoplasme et le milieu environnant. L'effet cytopathogène induit par le virus s'accompagne de l'induction de cytokines : IL1, INF γ , IL6, TNF α (Flamand et al., 1991; Inoue et al., 1994). Au cours de l'infection lytique, l'expression des protéines de la capside, respectivement p100 du variant A et p101K du variant B(U11), représente un des marqueurs de l'infection à HHV6 (Drobyski et al., 1994).

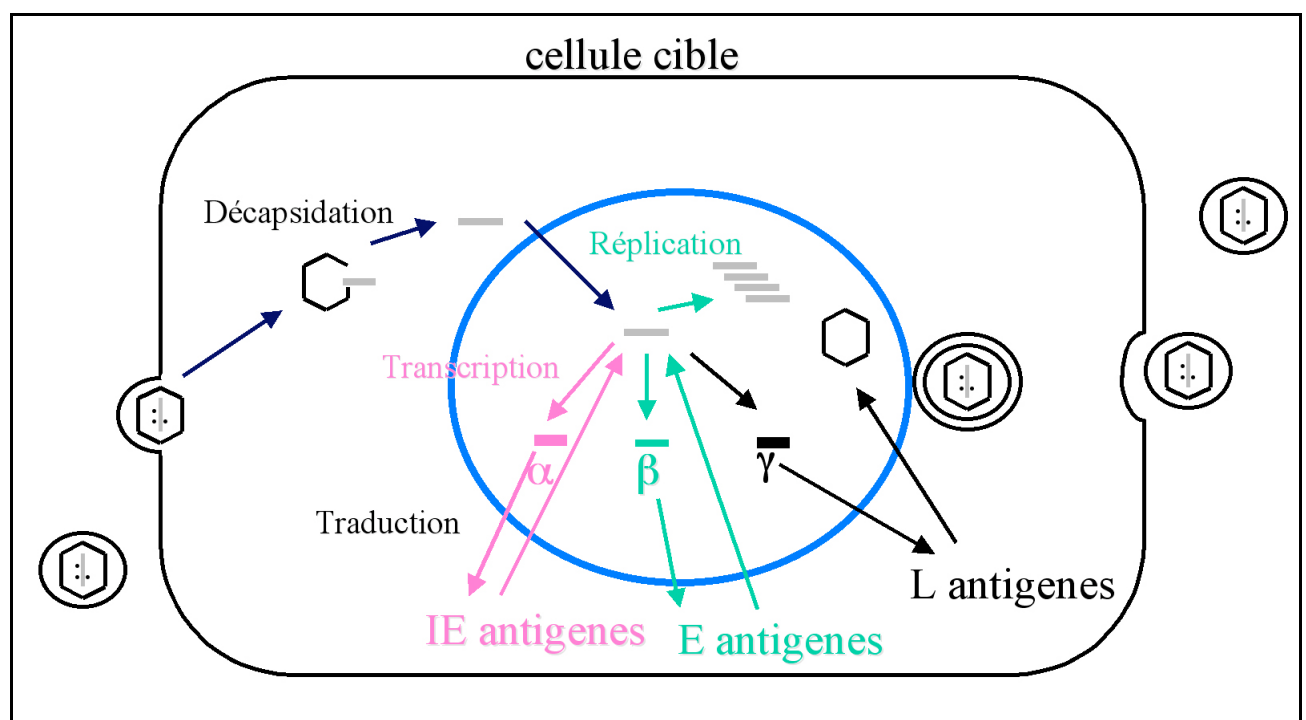


Figure 6 : Cycle de multiplication des α -Herpesvinae

4.4 Aspect moléculaire de la réplication

4.4.1 Expression séquentielle des gènes et des protéines

4.4.1.1 Caractères généraux de la réplication des *Betaherpesvirinae*

Une réplication productive de ces virus fait suite à l'expression séquentielle et ordonnée de trois groupes principaux de gènes : les gènes très précoces (α ou IE pour "*immediate early*"), les gènes précoces (β ou E pour "*early*") et enfin les gènes tardifs (γ ou L pour "*late*"). Dans la complexité de la cascade d'expression de ces gènes, comme pour les autres herpesvirus, les gènes très précoces ont un rôle dans l'organisation des étapes suivantes de la réplication. Le cycle, selon les caractéristiques propres au groupe des *Betaherpesvirinae* est lent, nécessitant 48 à 72 heures pour permettre la détection de jeunes virions *in vitro*. Si l'accumulation des particules virales au sein des cellules infectées débute dès la 48ème heure, le maximum sera atteint entre la 72ème et la 96ème heure.

L'exploration du mécanisme de la réplication se heurte au problème de la détermination des cellules permissives, semi-permissives et non permissives. Au sein des cellules permissives, la réplication du virus sera totale et productive, ce type de cellule étant capable de supporter l'expression des ARNm tardifs. Les meilleurs modèles cellulaires de ce type de cellules *in vitro* sont constitués par les fibroblastes humains pour le CMVH et par les CMSP activées (Takahashi et al., 1989) ainsi que les cellules de lignée T pour l'HHV6 capables, par rapport à d'autres cellules testées, de supporter une réplication virale importante. Pour les cellules semi-permissives, l'expression virale est réduite aux gènes précoces tandis qu'au sein des cellules non-permissives, en dépit d'une pénétration, l'expression des gènes est nulle.

Des facteurs sont en cours d'identification pour expliquer l'impact de la différenciation cellulaire sur la réplication virale. Une des hypothèses repose sur une augmentation de l'expression des gènes de régulation IE1/IE2 du CMVH, capable d'initier la transcription (Sissons et al., 2002).

4.4.1.2 Caractéristiques moléculaires de la transcription des gènes du CMVH

L'expression des gènes s'établit séquentiellement: très précoces (0-2ème heure), précoce (2ème-20ème heure) et tardive (au-delà de la 20ème heure) (Mocarski and Courcelle, 2001).

-La phase de transcription des gènes très précoces (TP ou IE : *Immediate Early*)

Elle peut se faire en l'absence de synthèse de protéines *de novo* et aboutit à la synthèse de protéines très précoces essentiellement régulatrices de la réplication virale.

Cinq gènes codant pour ces protéines ont été cartographiés sur le génome du CMVH : UL36-38, IE1/IE2 (UL122 et UL123), TRS1-IRS1, UL69 et US3. Les ARN messagers très précoces, *in vitro*, représentent 0,6% des ARN polyadénylés de la cellule infectée. Les gènes les plus abondamment transcrits, IE1 et IE2, sont exprimés après un épissage différentiel et partagent des séquences localisées dans des exons communs. Leurs produits de transcription sont représentés par deux protéines respectivement de 68 à 72 kd pour la "*major immediate early protein*" codée par UL122, et 80 à 86 kd pour celle codée par UL123 dont le rôle est essentiel dans la régulation positive et négative de l'expression des gènes du virus. Leur expression est sous le contrôle d'un promoteur-activateur puissant MIEP (*Major Immediate Early Promoteur*).

La transcription de ces deux gènes est particulièrement abondante dans la phase précoce de la régulation mais existe également aux stades plus tardifs. En effet, une synthèse fonctionnelle des produits de ces gènes est indispensable pour l'expression des gènes précoces et tardifs à suivre (Mocarski and Courcelle, 2001).

- la phase de transcription des gènes précoces (□ ou E: *Early*)

Elle correspond, principalement, à la production des enzymes intervenant dans la réplication de l'ADN et dans son métabolisme. La transcription de ces gènes débute au plus tard au bout de 24 h (plus généralement entre 4 h et 12 h). Ces gènes peuvent être divisés, de façon plus précise, en deux sous classe □1 (précoces) et □2 (précoces-tardifs) en fonction de leur pic d'expression, de l'impact *in vitro* des inhibiteurs de l'ADN-polymérase et de leurs modifications d'expression au stade tardif. Parmi les produits des gènes identifiés et exprimés à cette période de la réplication sont représentées l'ADN-polymérase, protéine de 140 kd codée par le gène UL54 (classe □2), et la protéine, nécessaire à son activité, codée par le gène UL 44 (classe □2). Les gènes précoces UL112 et UL113 (classe □) codent pour des phosphoprotéines nucléaires au rôle de régulation de la réplication d'ADN, exprimées à des temps séquentiels provenant d'un épissage alternatif des ARNm. Les régions génomiques UL105 et UL70 sont associées à une activité hélicase-primase et le gène UL97 intervient, notamment, dans la phosphorylation du ganciclovir.

-la phase de transcription des gènes tardifs (□ ou L : *late*)

Une sous classification, en gènes □1 (leaky late) et □2 (vrais tardifs) est également en cours de réalisation pour ces gènes tardifs. Les transcrits des gènes □1 sont exprimés furtivement, et suivent une régulation de transcription proche des gènes □2. La transcription des gènes □2 est quant à elle totalement impossible en cas d'inhibition de la synthèse virale d'ADN. La régulation des promoteurs des gènes tardifs qui codent pour des protéines et des glycoprotéines structurales du virus n'est pas bien connue, mais l'hypothèse la plus probable serait une double influence de la réplication de l'ADN et des transactivateurs très précoces.

Parmi ces gènes □1, le gène de la protéine majeure tégmentaire ppUL83 (pp65) auparavant considéré comme *early/late* y a été reclassé. Le caractère particulier de ce gène réside dans le fait qu'il code pour une protéine détectée tardivement dans la cellule infectée alors qu'il est transcrit à des stades précoces. Les gènes UL86 et UL46, codant respectivement pour la protéine majeure et mineure de la capsid, sont parmi les plus importants. Le gène UL80 codant pour une protéine d'assemblage de la capsid est particulier car il possède un domaine protéase et un domaine d'assemblage (Mocarski and Courcelle, 2001).

4.4.1.3 Caractéristiques moléculaires de la transcription des gènes de l'HHV6

Les étapes de la réplication de l'HHV6 sont moins bien connues, se heurtant notamment aux problèmes d'obtention d'une grande quantité de stock viral au titre infectieux souvent décevant. Il apparaît, cependant, grâce aux travaux déjà publiés, que la majorité des gènes ne possèdent pas de zones introniques dans leurs séquences et donc ne subissent pas d'épissage au cours de leur transcription. Les exceptions identifiées sont représentées notamment par certains gènes très précoces U16-U17, U19-U20, U91 et par le gène U100 codant pour la glycoprotéine d'enveloppe gp82-105 (Mirandola et al., 1998).

-Transcription des gènes très précoces IE ou □

Malgré des divergences concernant la séquence en acides aminés et les profils d'épissages des gènes, les deux principales régions des gènes très précoces du CMVH sont retrouvées au niveau du génome de l'HHV6. Ainsi en plus des gènes équivalents à la famille US22 du CMVH identifiés sur le génome d'HHV6 (DR2,DR6,DR7... U95), la région U17-U19 du virus correspond au domaine très précoce IEB du CMVH (locus UL36-UL38) et la région IEA des *Roseolovirus* couvrant les gènes U86-U90 est l'homologue de la région majeur IE1/IE2 du cytomegalovirus (Martin et al., 1991). L'épissage et sa classification en gènes □

ou □ du gène U91 apparaît comme complexe et différente selon les variants A au B (Mirandola et al., 1998).

-Transcription des gènes précoces E *early* ou □

Comme pour le cytomégalovirus, ils dépendent de la transcription des gènes très précoces IE et de la synthèse *de novo* de protéines, donc sont théoriquement inhibés, *in vitro*, par l'addition de cycloheximide dans le milieu de culture (Mirandola et al., 1998). Les gènes de cette classe codent pour des enzymes et des protéines indispensables pour le métabolisme des nucléotides. Parmi elles sont retrouvées la DNA polymérase (U38), les composants du complexe hélicase/primase (U43, U74, U77, U55, U79, U80), la protéine OBP (*Origin Binding Protein*) ainsi que les enzymes impliquées dans le métabolisme des substrats nucléotidiques et la réparation de l'ADN telles que la ribonucléase réductase (U28), la phosphotransférase (U69), l'alkaline exonucléase (U70). Ces gènes précoces sont peu divergents entre les 2 variants, ils ne semblent donc pas être impliqués dans les différences observées entre l'HHV6A et l'HHV6B (Isegawa et al., 1999).

-Transcription des gènes tardifs ou *late*

Ces gènes tardifs sont soumis à la troisième vague de transcription qui dépend des deux étapes précédentes. Une inhibition de leur transcription en présence de phosphonoacétate (PAA : inhibiteur des ADN polymérases virales) est obtenue, *in vitro*, aidant à leur classification (Di Luca et al., 1990). Les gènes codant pour les glycoprotéines de membrane sont exprimés tardivement : U39(gB), U48(gH), U72(gM), U82(gL). Des protéines qui sont des récepteurs de protéines G (U12) et des chemokines RANTES, MIP 1□ et 1□ (U52) représentent des produits de traduction de gènes tardifs (Isegawa et al., 1998).

4.4.2 Réplication de l'ADN

4.4.2.1 Réplication du CMVH

La synthèse de l'ADN viral débute *in vitro* dès la 12ème heure et atteint son maximum entre la 72ème et la 96ème heure. La réplication de l'ADN du CMVH suit approximativement les mêmes séquences d'événements qui sont connues pour les autres herpesvirus faisant intervenir 7 ORFs codant pour des protéines intervenant dans la réplication.

L'origine de la synthèse se situe dans une région adjacente à la séquence UL nommée IPC8 ou *ori-Lyt* riche en séquences répétitives. A partir de cette origine, la synthèse est bidirectionnelle. Parmi les enzymes de la réplication de l'ADN, l'ADN-polymérase incorpore

les nucléosides triphosphates à l'extrémité 3' OH et représente le site d'action final des analogues de nucléosides. Deux protéines de liaison non structurales, codées par le gène UL57 (pour la plus précoce) et par le gène UL52 (pour la plus tardive) fixent et protègent l'association de l'ADN-polymérase à l'ADN simple brin. Un complexe protéique codé par les régions génomiques UL70, UL105, et UL101/102 joue le rôle d'hélicase-primase. L'ADN étant répliqué selon le modèle du cercle tournant, les concatémères ainsi formés sont ensuite clivés par un complexe protéique codé par les gènes UL47 et UL48. L'ADN clivé est ensuite empaqueté dans les précapsides avant le passage au niveau cytoplasmique cellulaire.

4.4.2.2 Réplication de l'HHV6

La réplication de l'ADN de l'HHV6 est, également, initiée au niveau de sa région *ori-Lyt* qui a la particularité d'être proche de celle des α -*Herpesvirinae* et par conséquent éloignée des *ori-Lyts* du CMVH et des β -*Herpesvirinae*. Les études de réplication *in vitro* ont permis de la localiser dans la région située entre la partie 5' terminale de U41 et 3' terminale de U42 (Dewhurst et al., 1993); le gène U41 codant pour la protéine majeure de liaison à l'ADN (MDBP). Cette région se caractérise par ailleurs par deux séquences palindromiques OBP-1 et OBP-2 qui sont reconnues par la protéine se liant à l'origine (OBP) codée par le gène U73. En plus de cette OBP et de la MDBP, cinq autres protéines virales interviennent dans cette réplication, représentées par l'ADN-polymérase, le facteur de processivité de l'ADN polymérase, le complexe protéique hélicase-primase. Après réplication, environ 5% des génomes présents dans les nucléocapsides sont circularisés par juxtaposition entre les régions similaires DRR et DRL (Lindquester and Pellett, 1991). Certaines équipes font l'hypothèse d'une intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire (Luppi et al., 1999).

5-METHODES DE DIAGNOSTIC

5.1 Méthodes de diagnostic indirect : les méthodes sérologiques

5.1.1- Détection et dosage des IgG et IgM anti-CMVH

5.1.1.1 Les IgG anti CMVH

La technique la plus couramment utilisée est la mise en évidence des anticorps de type IgG ou des anticorps globaux par différentes techniques représentées par l'agglutination au latex et les tests immuno-enzymatiques (E.L.I.S.A.). Ces techniques permettent de différencier les sérums positifs des sérums négatifs en détectant les traces d'une infection ancienne, et ainsi de connaître le statut immunitaire des donneurs de sang ou d'organe et de leurs receveurs. Les anticorps dirigés contre la protéine de matrice (UL32) sont synthétisés chez près de 100% des patients infectés. Ainsi leur présence est un bon atout pour affirmer la séropositivité du patient vis à vis du CMVH. Les autres cibles de la réponse humorale sont constituées par les protéines de matrice (UL83 et UL99) mais également par des protéines de capside ou des protéines non structurales UL44 ou UL57. La technique d'agglutination de particules de latex sensibilisées est une technique intéressante permettant de déterminer le statut sérologique en urgence. Cependant sa lecture à l'oeil nu peut être subjective et sa sensibilité est relative (92%).

Les méthodes E.L.I.S.A. sont les plus utilisées en raison de leur caractère automatisable et adaptable aux grandes séries de laboratoire. Des progrès ont été réalisés en standardisant ces techniques du CMVH grâce à l'utilisation de substrats antigéniques recombinants (Kropff et al., 1993). Le diagnostic d'une infection récente par ces techniques est réalisé à partir d'une paire de sérum, prélevés à quelques jours d'intervalle, assurant la mise en évidence d'une séroconversion. L'élévation significative des anticorps sériques n'est attendue qu'en cas d'une primo-infection et manque dans la plupart des réactivations. Un titre élevé stable ne doit pas être considéré comme la preuve d'une infection récente. La détection par amplification génique du génome du virus chez des patients encore séronégatifs souligne la limite de ces méthodes pour réaliser un diagnostic précoce (Stanier et al., 1989).

La mesure de l'avidité des IgG est une technique récente permettant de mieux cibler la date de contagion avec le virus et de faire la distinction entre la réactivation et la primo-infection par le

CMVH. Elle repose sur une technique E.L.I.S.A. Après incubation du sérum avec l'antigène, une étape de dénaturation par l'urée est réalisée assurant une élimination des IgG les moins avides. L'index d'avidité des IgG correspond au rapport des densités optiques obtenues avec ou sans traitement à l'urée (Blackburn et al., 1991). Le développement de kits commerciaux présente un intérêt pour le diagnostic chez la femme enceinte (Lazzarotto et al., 1994). En pratique, un indice en IgG supérieur à 70-80% est indicateur d'une infection datant de plus de 3 mois alors qu'inférieur à 30% il ne permet pas d'exclure une primo infection dans les 3 derniers mois.

5.1.1.2 Les IgM anti-CMVH

La détection des IgM spécifiques par immunofluorescence indirecte, radio-immunofluorescence ou technique E.L.I.S.A. est envisagée comme moyen de diagnostic d'une primo-infection récente à CMVH à partir d'un prélèvement de sang unique. La protéine UL44 est la principale cible d'une réponse IgM précoce. En effet, la recherche de la séroconversion souffre souvent de l'absence ou de la discrétion des signes cliniques qui empêche de prélever à temps le premier sérum. Pour cette détection où les techniques immuno-enzymatiques restent les plus couramment utilisées, il est indispensable d'éliminer les IgG et le facteur rhumatoïde, les méthodes d'immunocapture sont utilisées. La présence des anticorps IgM anti-CMVH apparaît corrélée à la survenue des infections actives, tant dans le cadre des primo-infections que dans celui des réactivations. La présence d'IgM seule n'est donc pas suffisante pour pouvoir affirmer la primo-infection.

Les sérologies du CMVH apparaissent comme des méthodes simples, mais leur apport diagnostique est limité notamment par le caractère aléatoire de la réponse humorale chez les patients immunodéprimés et par la fréquence d'apports passifs d'anticorps (produits sanguins et greffe d'organe). Leur utilisation est indispensable pour déterminer le statut immunitaire de chacun des acteurs de la greffe avant sa réalisation et leur avenir réside dans la détermination d'épitopes immunogènes permettant une discrimination plus nette entre primo-infection, latence et réactivation du virus (Engelhard et al., 1991).

5.1.2 Détection et dosage des IgG et IgM anti-HHV6

Les deux principales techniques utilisées dans le cadre du sérodiagnostic d'HHV6 sont représentées par la technique d'immunofluorescence indirecte (IFI) (Robert et al., 1990) et les techniques immuno-enzymatiques ELISA avec une plus grande sensibilité (Luppi et al., 1995). Les méthodes par immunofluorescence permettent de détecter séparément les IgG et

les IgM grâce à l'anticorps conjugué utilisé. La recherche des IgM par technique immuno-enzymatique a été également mise au point (Braun et al., 1997). Actuellement, aucune méthode sérologique ne permet de faire la distinction de spécificité des anticorps anti-HHV6 vis-à-vis du variant A ou B. Comme pour le CMVH, des tests d'avidité sont en développement afin de pouvoir déterminer le caractère récent ou non de l'infection (Ward et al., 2001). La nécessité du recours à ce test, dans le cadre de l'infection à HHV6 apparaît moins essentiel dans ce contexte de séroprévalence élevée. Cependant ces tests sérologiques gardent toute leur importance dans un contexte épidémiologique afin de définir, rétrospectivement à instant précis, le statut d'un patient (exemple: contexte de la greffe). La présence d'IgM ou la multiplication par 4 du taux d'IgG est associée au diagnostic clinique chez l'immunocompétent (DesJardin et al., 1998). La présence d'IgM peut également être observé au cours des réactivations limitant l'intérêt de l'utilisation de ce test de façon isolé (sans diagnostic direct associé). Des études, associant leur recherche à celle du diagnostic direct, ont montré que les IgM anti HHV6 étaient retrouvées en dehors de tout contexte d'infection active confirmée (Yamanishi, 2001). Dans ce contexte la possibilité de réactions croisées se pose notamment entre les *Betaherpesvirinae* (Adler et al., 1993; Foa-Tomasi et al., 1996). Enfin, les résultats sérologiques chez les patients greffés, immunodéprimés manquent de valeur laissant une place importante au diagnostic direct, d'autant plus que l'administration d'immunoglobulines intraveineuses chez ces patients perturbent les résultats sérologiques.

5.2 Méthodes de diagnostic direct

Le diagnostic direct peut être envisagé à partir de très nombreux types de prélèvements pour le CMVH : le sang, différentes biopsies, les prélèvements de gorge, les liquides de lavage broncho-alvéolaire, les urines, les sécrétions vaginales, le sperme, le liquide céphalo-rachidien, les liquides intra-oculaires... Pour l'HHV6, les principaux échantillons pour rechercher le virus seront représentés par le sang, le liquide céphalo- rachidien, la salive pour l'essentiel. Dans certaines circonstances le virus pourra également être recherché sur des biopsies. A la différence du CMVH, le diagnostic direct de l'HHV6, et qui plus est en culture, ne fait pas partie des examens de routine.

5.2.1 Isolement par culture cellulaire

Les Herpesvirus dans leur ensemble sont des virus fragiles de part leur structure enveloppée leur conférant un pouvoir infectieux rapidement altéré par l'exposition à des agents physiques (comme la chaleur), ou chimiques (exemple : acidification). Ainsi, les prélèvements destinés à l'isolement viral doivent être recueillis dans un milieu de transport et acheminés rapidement au laboratoire. En cas d'inoculation retardée, l'échantillon, pourra jusqu'à 48 heures, être conservé à + 4°C et, au delà, congelé à -80°C. Les cycles de congélation/décongélation ne sont pas recommandés.

5.2.1.1 Culture du CMVH

-La culture avec détection de l'effet cytopathique : méthode de référence

La mise en culture est réalisée rapidement après l'obtention des prélèvements, en raison de la fragilité du CMVH. Le meilleur modèle *in vitro* de cellules permissives au CMVH sont les cellules embryonnaires fibroblastiques à subconfluence capables de supporter la production des virions à un titre élevé (cellules MRC-5). La technique classique repose sur la mise en évidence d'un effet cytopathogène apparaissant après plusieurs cycles de réplication virale. Les fibroblastes embryonnaires humains au départ fusiformes, après avoir été infectés, prennent la forme caractéristique de foyers à grandes cellules ovalaires, réfringentes observables au microscope à lumière inversée, disposées en travées parallèles en suivant le grand axe des fibroblastes. Le délai d'apparition de ces lésions recherchées, au début et après quelques jours, au microscope inversé est dépendant du titre infectieux de l'inoculum et est compris entre 8 et 30 jours (parfois il atteint 6 semaines).

La mise en évidence d'une virémie (culture positive d'un prélèvement sanguin) est le témoin d'une dissémination de l'infection à la suite d'une multiplication virale. L'isolement à partir des urines ou à partir d'autres sécrétions est moins significatif, pour dater l'infection, reflétant un phénomène d'excrétion qui est souvent prolongé.

Cette technique est la méthode de référence. Elle permet d'isoler des souches virales, de pouvoir réaliser des études épidémiologiques et de constituer des stocks de virus. Elle reste, cependant, très lourde en pratique quotidienne, très peu adaptée au diagnostic d'urgence et trop souvent interprétable lorsqu'une destruction précoce de la nappe cellulaire survient par des effets cytotoxiques engendrés par les urines, la libération d'enzymes des polynucléaires, par les hématies...

- La culture rapide : méthode utilisée en routine

Pour remédier à la lenteur de la première méthode d'isolement viral, dans le cadre du diagnostic d'urgence, des techniques rapides ont été développées. Elles consistent à détecter des antigènes viraux très précoces à partir du prélèvement inoculé sur des cellules fibroblastiques en microplaque. L'anticorps monoclonal utilisé (le plus courant E13, Argène) révèle un antigène très précoce synthétisé dès la deuxième heure d'infection, persistant pendant toute la durée du cycle de réplication, strictement nucléaire et présent dans les cellules infectées quelque-soit la souche. La révélation est réalisée le plus couramment par immunofluorescence indirecte en 24 à 48 heures ou par une réaction d'immunopéroxydase qui colore les noyaux infectés en brun. Cette technique présente une bonne sensibilité comprise entre 70% et 95%. Cette sensibilité est maximale pour les recherches de virus dans les urines, les lavages broncho-alvéolaires, mais n'échappe pas au problème de cytotoxicité induite par les prélèvements surtout lorsqu'ils sont d'origine sanguine. Une semi-quantification est envisageable à partir d'un inoculum standardisé et en numérant les cellules infectées (Paya et al., 1988).

L'association de ces deux techniques de culture est recommandée par de nombreux auteurs, cette combinaison ayant l'avantage de pouvoir mettre en évidence la présence d'autres virus qui resteraient indétectables par la méthode rapide.

5.2.1.2 Culture de l'HHV6

La méthode de culture de l'HHV6 remonte à sa découverte en 1986. En effet c'est en co-cultivant des lymphocytes périphériques (CMSP : cellules mononucléées de sang périphérique) de patients, en présence de lymphocytes de donneurs sains ayant été préalablement stimulés par de l'IL2 et de la phytohémagglutinine PHA, que le virus a été isolé. Les cellules mononucléées de sang de cordon peuvent également être utilisées (Yamanishi et al., 1988). La présence du virus se manifeste dans la majorité des cas, dans les 7 à 10 jours, par l'apparition d'un ECP caractéristique : ballonnisation et réfringence des cellules. Une observation régulière permettra de suivre son apparition.

Au cours du développement de l'exanthème subit, l'isolement par culture du virus à partir de CMSP du patient atteint 100% dans les 2 jours qui précèdent le rash, 82% le troisième jour, 20% le quatrième jour, 7% entre le cinquième et le septième jour pour devenir nulle à partir du huitième jour (Asano et al., 1991).

5.2.2 Détection des antigènes viraux

5.2.2.1 Détection des antigènes du CMVH

La détection d'antigènes viraux spécifiques, dans des cellules infectées, par immunofluorescence ou immunoperoxidase à l'aide d'anticorps monoclonaux est une technique de plus en plus utilisée à la fois précoce, sensible et spécifique. Des anticorps monoclonaux spécifiques des différentes protéines du CMVH permettent de suivre l'expression préférentielle de tel ou tel antigène selon les cellules.

La détection de la protéine virale ppUL83 (pp65), dans les polynucléaires circulants, grâce à l'utilisation d'un anticorps monoclonal, est réalisée en pratique courante (van der Bij et al., 1988). Cette technique d'antigénémie apparaît comme une méthode simplifiée pour évaluer une valeur approximative de la charge virale en déterminant le nombre de polynucléaires exprimant cet antigène. Un nombre de polynucléaires contenant l'antigène supérieur à 50 pour 200000 cellules est le témoin d'un haut niveau d'antigénémie (The et al., 1995)(Figure 7).

La mise en oeuvre de la technique nécessite, cependant, une grande rapidité du traitement de l'échantillon (la dégradation de l'antigène étant rapide) et est fastidieuse, quant au mode de lecture au microscope à fluorescence. Actuellement, des techniques de détection des antigènes viraux avec une quantification en cytométrie de flux sont développées permettant, entre autre, de s'affranchir de la lecture au microscope (Imbert-Marcille et al., 1997b; Poirier-Toulemonde et al., 2000).

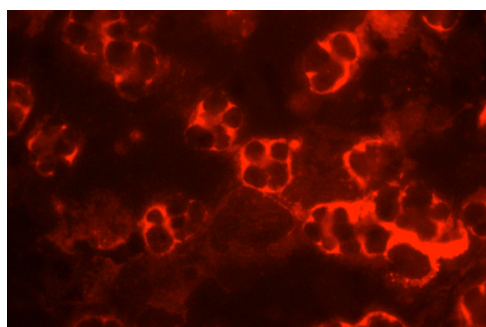


Figure 7a

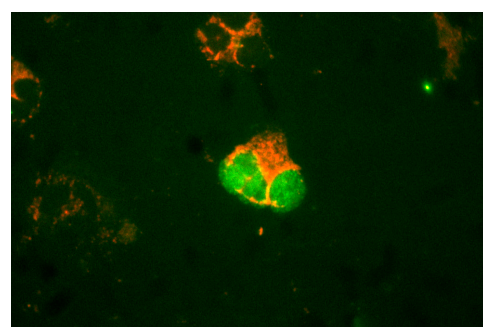


Figure 7b

Figure 7: Détection de l'antigénémie pp65 en immunofluorescence : polynucléaires non infectés (7a) et infectés (7b) (x100) (Cliché, Laboratoire de Virologie, CHU Nantes)

La détection de l'antigénémie, reflet d'une atteinte systémique, est souvent contemporaine ou antérieure à la virémie et persiste plus longtemps que celle-ci. Sa négativation est considérée comme un bon indicateur de l'efficacité de la thérapeutique.

5.2.2.2 Détection directe des antigènes viraux de l'HHV6

Le recours à l'utilisation d'une révélation de la présence d'antigènes cellulaires par l'utilisation d'anticorps monoclonaux est, parfois nécessaire, au cours des cultures cellulaires. L'ECP de l'HHV6 reste parfois, selon les souches et/ou les cellules, invisible ou très fugace (Singh and Carrigan, 1996). Des anticorps ont été développés, parmi lesquels, on distingue ceux capables de détecter les deux variants (Okuno et al., 1992) et ceux spécifiques de chaque variant (Aubin et al., 1993; Campadelli-Fiume et al., 1993). La culture rapide, comme pour le CMVH, est loin d'être de pratique courante, mais pourrait être envisagée afin de réaliser un diagnostic plus rapide. Par contre, une méthode proche l'antigénémie pp65 du cytomégalovirus a été mise au point pour rechercher l'expression de deux antigènes d'HHV6 dans les cellules mononucléées sanguines. Son évaluation, chez les greffés hépatiques, témoigne de l'intérêt de ces marqueurs pour le diagnostic de l'infection active (Lautenschlager et al., 2000b).

5.2.3 Détection des acides nucléiques viraux

Ces méthodes de biologie moléculaire utilisées depuis longtemps pour le CMVH apparaissent aujourd'hui pour l'HHV6 un recours, tout autant essentiel, dans le cadre du diagnostic au laboratoire.

5.2.3.1 Réalisation de techniques d'hybridation directe

-Pour la recherche du CMVH

Les techniques d'hybridation moléculaire en Dot-Blot ou Southern-Blot sont applicables à la mise en évidence de séquences virales dans un prélèvement. La sensibilité est très variable et d'une manière générale inférieure à la culture. L'exception réside dans son application aux urines où au moment de l'excrétion la charge virale est intense, cette technique permet alors de détecter le CMVH excrété avec une sensibilité comparable à la méthode de référence. Finalement ces techniques ont été abandonnées en raison de leur manque de sensibilité.

L'hybridation, *in situ*, réalisée sur des frottis cellulaires ou des coupes histologiques, permet d'identifier les cellules infectées et peut être combinée à des techniques d'immunocytochimie.

L'utilisation de sondes spécifiques des différents ARNm messagers permet d'envisager l'étude de la transcription cellulaire. Les renseignements apportés par ces techniques sont donc hautement qualitatifs, mais leur sensibilité reste modérée (Gleaves et al., 1989).

Plus actuelles, les techniques d'hybridation directe à révélation amplifiée sont représentées par la technique de capture d'hybride (HybridCapture™ system) et par la technique d'ADN branché (*bDNA*) (Figure 8) encore au stade de développement. La première consiste à détecter en chimiluminescence des hybrides formés entre l'ADN recherché dans un prélèvement et des sondes ARN-CMVH complémentaires. Le complexe ainsi formé est capturé à la surface de tubes tapissés d'anticorps. Les hybrides ainsi immobilisés sont révélés par un anticorps conjugué à une enzyme dont l'activité est mesurée par chimiluminescence après ajout du substrat. Cette technique autorise la réalisation d'une gamme étalon aidant à la quantification du génome. La technique *bDNA* permet également de quantifier directement l'ADN présent dans le prélèvement. La molécule d'ADN-branché, qui reconnaît le complexe formé entre l'ADN viral et des sondes spécifiques, présente de multiples sites de liaison pour une sonde marquée par un enzyme. Le complexe est ensuite détecté par chimiluminescence et le signal est cette fois aussi directement proportionnel à la quantité d'ADN. Des études comparatives avec l'antigénémie et la PCR ont été réalisées pour estimer leur sensibilité (Flood et al., 1997).

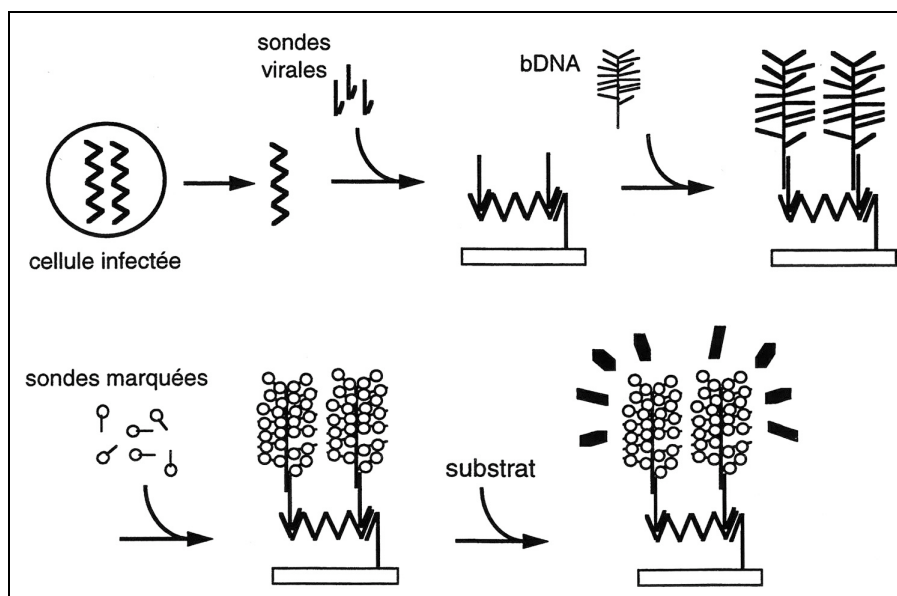


Figure 8 : Principe de la quantification génomique par la technique d'hybridation moléculaire par amplification de signal (*bDNA*), d'après (Bogard et Lamoril, 1998a)

-Pour la recherche de l'HHV6

Des techniques d'hybridation, *in situ*, ont été également développées pour la recherche directe de l'ADN de l'HHV6 par technique d'hybridation *in situ* (Fillet et al., 1996). Ces techniques très spécifiques, mais de sensibilité limitée, ne sont pas utilisées couramment

5.2.3.2 Réalisation des techniques d'amplification génique

L'amplification génique par polymérisation en chaîne (PCR pour *Polymerase Chain Reaction*) permet d'obtenir plusieurs millions de copies d'une séquence du génome viral, autorisant ainsi une détection très sensible au sein d'un produit biologique. La séquence amplifiée est choisie en se basant sur différents critères tels que sa spécificité et l'absence d'homologie avec des séquences d'autres génomes (surtout humain). La révélation des produits d'amplification utilise, le plus souvent, une technique semi-automatisée commercialisée telle que le DEIA (*DNA Enzym Immuno assay*, Diasorin). Il est important de tenir compte des modalités de réalisation de la réaction (pouvant être très variable) pour interpréter les résultats. Sa grande sensibilité peut, en théorie, aboutir à une mise en évidence du génome à l'état latent. Ce phénomène n'est pas recherché en diagnostic clinico-biologique, et il convient donc de le vérifier au cours du développement de la technique.

-L'amplification génique de l'ADN viral leucocytaire ou plasmatique du CMVH (ADNémie)

En pratique courante, l'étalonnage de cette technique est réalisé pour qu'elle ne soit positive qu'en cas de production active du CMVH même faible. Des études montrent que la PCR détecte le virus dans le sang d'une manière plus sensible que la virémie tout en restant significative d'une infection active (Drouet et al., 1993; Imbert-Marcille et al., 1995).

-L'amplification génique de l'ADN viral leucocytaire ou plasmatique de l'HHV6

De même que pour le CMVH, le développement de la PCR de l'HHV6 nécessite une grande rigueur dans le choix des amorces. Ainsi dans le cadre d'un diagnostic consensuel, il est recommandé de ne pas travailler dans la région des gènes très précoces, la plus variable entre l'HHV-6A et l'HHV-6B. Il est préférable, par exemple, de choisir des régions plus stables situées entre les blocs I et VII, en prêtant attention aux nombreuses homologies existantes entre HHV6 et HHV7. Plusieurs couples d'amorces ont été utilisés par les différents auteurs (Collandre et al., 1991; Cone et al., 1993b). Le recours à la PCR nichée, en prenant des précautions importantes, est également envisageable (Di Luca et al., 1994; Wilborn et al.,

1994b). Enfin, la PCR peut permettre de différencier rapidement les variants A et B soit en utilisant des amorces spécifiques de chaque variant (Aubin et al., 1994) ou bien en utilisant les mêmes amorces avec une hybridation distincte des souches A et B (Aubin et al., 1991).

- Les PCR quantitatives

Les PCR quantitatives sont basées sur les co-amplifications, au cours d'une même PCR d'un ADN sauvage dont on veut déterminer la quantité avec un ADN standard introduit à une concentration connue. Il existe de nombreuses variantes de cette méthodologie, dont le champ d'application en diagnostic clinique est en plein essor (Boeckh and Boivin, 1998; Imbert-Marcille et al., 1997b). Le développement des technologies en temps réel, type Taqman® (Perkin-Elmer) ou Lightcycler (Roche), participe largement à leur utilisation dans le cadre du suivi du traitement du CMVH chez les patients immunodéprimés (Najioullah et al., 2001; Schaade et al., 2000). Ces mêmes techniques sont en cours d'évaluation pour l'HHV6 (Collot et al., 2002; Gautheret-Dejean et al., 2002).

Succinctement, le principe de la technologie TaqMan® repose sur l'utilisation d'une sonde, directement ajoutée au milieu réactionnel qui contient les amorces, portant en 5' un fluorophore reporter et en 3' un fluorophore quencher (Figure 9). Ce dernier a la capacité de neutraliser la fluorescence du reporter lorsqu'ils sont tous deux à proximité. Au cours de la polymérisation, l'activité 5'exonucélasique de la *Taq polymérase* utilisée digère, au moment de l'élongation, la sonde TaqMan permettant à la fluorescence spécifique d'être libérée. Ainsi la mesure du signal de fluorescence, en continue, associée à une intégration informatique, permet de visualiser instantanément la formation des amplicons. Selon le même principe, en utilisant un fluorophore différent, un étalon standard peut être amplifié au cours de la même réaction, permettant la réalisation d'une gamme étalon pour réaliser la quantification en temps réel.

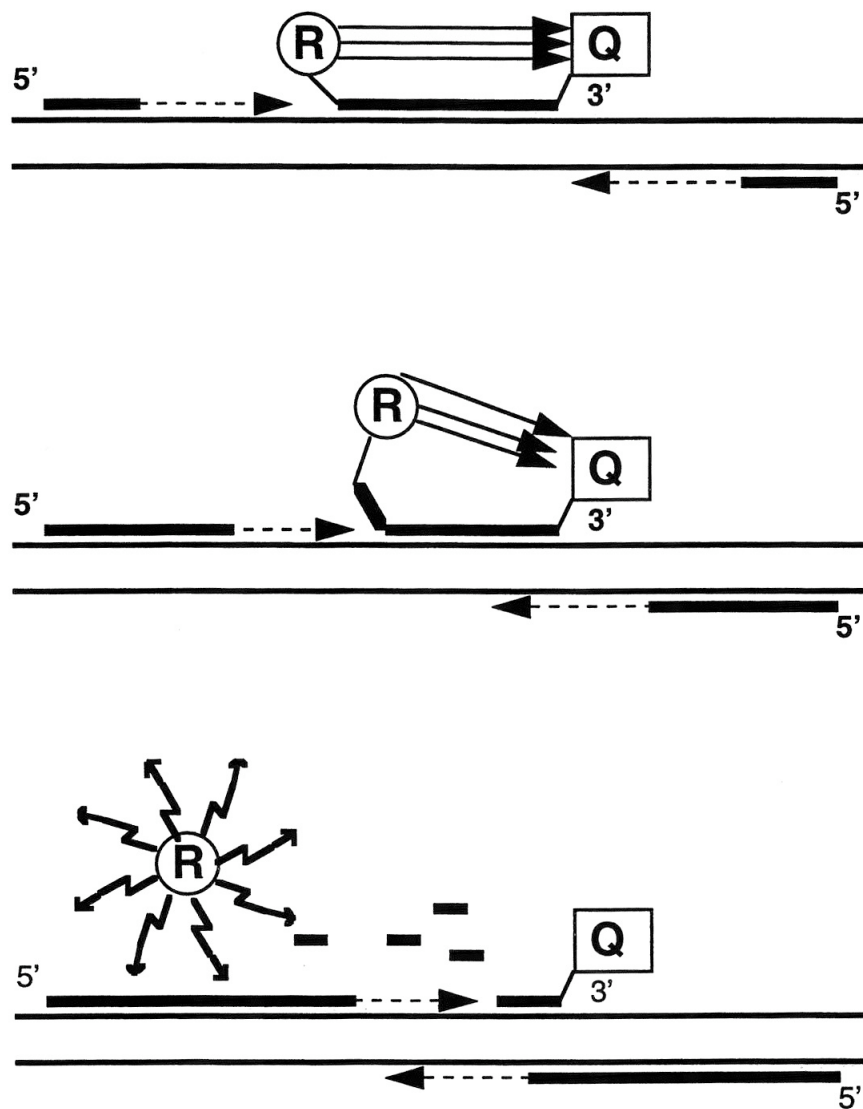


Figure 9 : Système TaqMan®, d'après (Bogard et Lamoril, 1998a)

La sonde reporter est marquée en 5' (R) et le quencher est marqué à la rhodamine (Q) en 3'.

-Détection des ARNm par amplification génique

Une deuxième application plus récente de ces techniques de PCR consiste à amplifier les messagers aussi bien très précoces, précoces et tardifs de gènes des *Betaherpesvirinae* après réalisation d'une transcription inverse. Ces techniques permettent de mieux suivre l'expression séquentielle des différents gènes. L'intérêt est porté sur la recherche des ARNm tardifs exprimés lors d'une répllication virale complète donc en cas d'infection productive.

Certains auteurs ont déjà démontré le caractère prédictif de ces nouveaux marqueurs par rapport au développement de la maladie à CMVH (Gaeta et al., 1997; Gozlan et al., 1993; Nelson et al., 1996). Ils seraient ainsi plus informatifs pour les cliniciens par rapport aux autres marqueurs biologiques tels que la virémie et l'antigénémie parfois positives chez des patients asymptomatiques. Une technique a été commercialisée pour la détection et la quantification du transcrit du gène UL65 codant pour la protéine de matrice pp67. Il s'agit de la trousse Nuclisens™ CMV pp67 (Organon tecknika) qui nécessite un équipement technologique particulier et qui repose sur la méthode NASBA (*Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*)(Figure 10). Dans ce cas l'ARN, mis en présence de deux amorces dont l'une comporte le promoteur de la T7 ARN polymérase, est soumis, après déstabilisation des structures secondaires, à une succession de cycles à une température constante de 41°C. L'action successive de trois enzymes une transcriptase inverse, une ribonucléase et une ARN polymérase du phage T7 assure la transcription concomitante de l'ARN en ADN et l'amplification de la séquence nucléotidique recherchée. Une quantification est réalisable grâce à l'utilisation de standards internes. La détection des produits amplifiés est réalisée par chimiluminescence. Le test Nuclisens™ CMV pp67 a été évalué chez des receveurs d'organe témoignant de sa bonne corrélation avec l'infection active (Blok et al., 2000) .

Concernant l'HHV6 les techniques *in vitro* "maison" sont en cours de développement pour la recherche des ARNm.

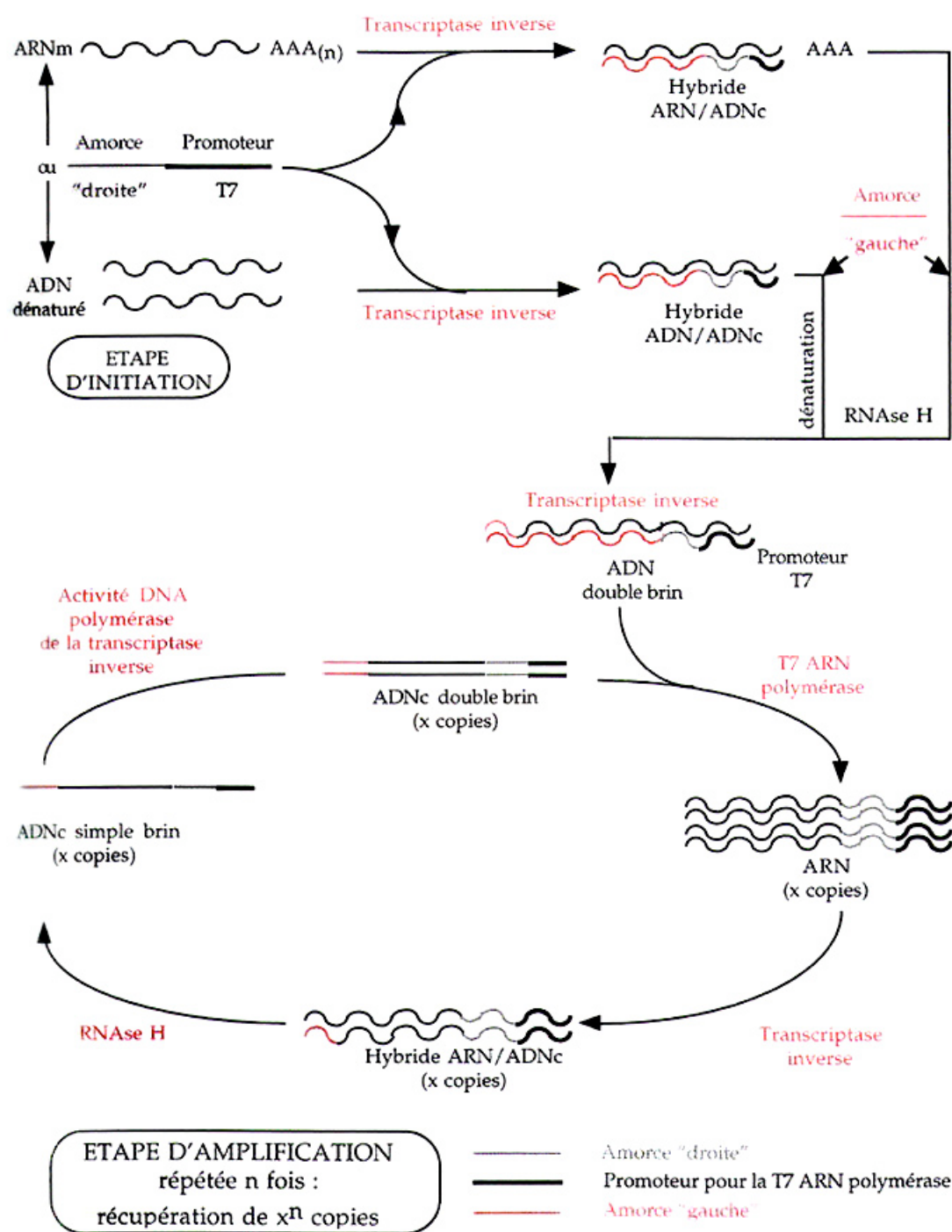


Figure 10 : Principe de la quantification de la charge virale plasmatique par la technique d'amplification isotherme NASBA, d'après (Kaplan et Delpech, 1995b)

5.3 Application des différentes méthodes de diagnostic

5.3.1 Dans le cadre du CMVH

Les nombreuses techniques, citées ci-dessus, détectent des marqueurs probablement complémentaires sans qu'il existe de véritable consensus quant à leur utilisation. La mise en évidence du CMVH ou de ses structures est le témoin de l'infection, mais pas nécessairement celui du rôle pathogène du virus. La conduite à tenir devant un marqueur d'infection à CMVH va dépendre des signes cliniques, du site au sein duquel il est retrouvé, mais également du terrain du patient chez lequel la recherche est effectuée.

5.3.1.1 Diagnostic chez l'adulte immunocompétent

En pratique courante, dans les formes simples, le diagnostic est souvent sérologique à partir de deux sérums réalisés à 10-15 jours d'intervalle entre lesquels une séroconversion ou une augmentation significative des anticorps est observée. La présence d'IgM en technique E.L.I.S.A. est alors pratiquement constante.

En cas de forme sévère, le virus sera détecté dans le sang, les urines et selon la localisation de la maladie dans le liquide broncho-alvéolaire, dans le LCR ou dans des biopsies. La détection du génome par PCR dans les leucocytes est plus sensible que la virémie. Pour le LCR, qui contient au départ peu de matériel, cette méthode est indispensable.

5.3.1.2 Diagnostic au cours de l'infection congénitale

-Diagnostic chez la femme enceinte et diagnostic prénatal (Ranger-Rogez et al., 1999)

En cas de suspicion clinique ou radiologique d'une infection à CMVH chez une femme enceinte, son statut immunitaire vis à vis du virus doit être établi. La différenciation entre l'infection primaire ou la réactivation est primordiale. Cependant une augmentation du taux des anticorps est d'interprétation délicate pour affirmer la primo-infection, elle peut résulter d'une activation polyclonale ou d'un rappel hétérologue. De même, la recherche des IgM est insuffisante, celles-ci pouvant manquer ou au contraire être présentes lors d'infections secondaires. L'intérêt de l'index d'avidité des IgG est d'aider à établir le caractère récent ou non de l'infection maternelle. Chez les femmes les plus exposées (femme ayant des enfants en crèche, personnel de crèche ou de collectivité d'enfants de moins de 3 ans), un dépistage sérologique au début de la grossesse et un suivi semestriel (voir mensuel) au cours de celle-ci, en cas de séronégativité, est de plus en plus réalisé par les praticiens. Ce suivi s'accompagne

de conseils d'hygiène rigoureux et parfois d'un arrêt de travail précoce au cours de la grossesse afin de limiter les risques de séroconversion.

Pour affirmer l'infection active chez une femme enceinte, l'antigénémie et la virémie seront plus informatives que la virurie. La détection du génome par PCR est également une méthode sensible.

L'infection fœtale doit être confirmée. La détection du virus dans le liquide amniotique (LA) recueilli par amniocentèse à partir de la 8ème semaine est la méthode de choix pour réaliser un diagnostic d'infection fœtale. Pour réaliser ce geste, il est nécessaire de s'assurer, auparavant, que l'ADNémie leucocytaire de la maman est bien indétectable, afin de ne pas prendre le risque d'inoculer au fœtus le virus au cours de l'amniocentèse. Parmi les différentes techniques, la détection de l'antigène précoce en 24-48 heures et la PCR sont les plus utilisées. L'étude du sang fœtal à partir de la 17ème semaine est moins performante que celle du LA, l'isolement viral et la recherche d'IgM restant parfois négatifs alors que le virus est détectable dans le LA (Nicolini et al., 1994). Enfin la détection du virus dans le LA ne constitue qu'une indication, l'évaluation de la gravité doit être réalisée sur des examens biologiques autres que virologiques ou des examens radiologiques.

- Diagnostic chez le nouveau-né

L'infection acquise *in utero* sera définie par l'isolement du CMVH au cours des deux premières semaines de la vie, essentiellement dans les urines, mais aussi dans les prélèvements de gorge. La recherche d'IgM spécifiques est un peu moins sensible que la virurie (positive dans 90% des cas où la virurie est positive). L'isolement au niveau urinaire à partir de la quatrième semaine de vie doit être considéré avec prudence, puisqu'il peut être lié à une infection périnatale souvent moins grave.

5.3.1.3 Diagnostic chez les greffés

L'examen sérologique est indispensable pour déterminer le statut immunitaire avant la greffe chez le donneur et le receveur. Il ne présente qu'un intérêt limité en diagnostic post-greffe. La montée des anticorps ou la séroconversion étant particulièrement retardée chez les greffés de moelle osseuse (un peu moins chez les greffés rénaux).

Le suivi des patients en post-greffe pourra être réalisé, une fois par semaine, par la recherche de la virémie avec détection rapide, par l'antigénémie et par l'ADNémie, éventuellement complétées par la détection d'une excrétion virale urinaire. La valeur prédictive de la culture sur la survenue d'atteinte viscérale des isollements du CMVH a été établie chez des receveurs

de greffe de moelle. Elle est variable selon l'origine du prélèvement atteignant 60% avec la virémie, 41% pour l'excrétion pharyngée, 40% pour la virurie et les autres sites d'excrétion.

La détection de l'ADN viral intra-leucocytaire par PCR reflète une infection active quand les modalités de sa mise en oeuvre ont été bien définies. Elle est plus précoce que la virémie et l'antigénémie, en les précédant d'une dizaine de jours. L'étude réalisée à Nantes sur 162 greffés de moelle osseuse démontre qu'une ADNémie positive a une sensibilité de 100% dans le diagnostic d'une maladie à CMVH alors que la virémie conserve elle une valeur prédictive supérieure aux deux autres techniques sur la survenue des atteintes viscérales (Imbert-Marcille et al., 1995).

Le diagnostic de la pneumopathie interstitielle à CMVH est particulièrement difficile. Le prélèvement de choix est le lavage broncho-alvéolaire, mais la signification clinique de cet examen est mal définie : sa valeur prédictive positive est faible par contre sa valeur prédictive négative est de 100%.

Pour améliorer le diagnostic d'atteinte viscérale chez les sujets greffés, la première voie de développement a été de quantifier la charge virale ADN du CMVH dans les leucocytes périphériques et les taux élevés d'ADN viral dans les leucocytes sont bien corrélés avec les infections symptomatiques (Drouet et al., 1993). L'autre voie moins développée est de rechercher les ARNm tardifs dans ces cellules sanguines, la corrélation étant également satisfaisante avec les infections symptomatiques chez les quelques patients greffés étudiés (Gaeta et al., 1997; Nelson et al., 1996).

5.3.1.4 Diagnostic au cours du SIDA

Au cours du SIDA, la situation est différente puisqu'une infection à CMVH de type chronique peut être observée lorsque le stade d'immunodépression est avancé. Ainsi, les virémies sont fréquentes chez des patients ayant un taux de CD4 inférieur à 100/mm³, mais associées (de façon inconstante) aux atteintes viscérales.

Devant une atteinte viscérale évoquant une infection à CMVH, les prélèvements sont réalisés au site de l'infection : lavage broncho-alvéolaire en cas d'atteinte respiratoire, liquide céphalorachidien en cas de localisation neurologique, biopsie tissulaire dans les formes digestives (Musso et al., 1996).

La méthode d'isolement, par technique rapide après centrifugation du prélèvement, est supérieure à l'isolement classique notamment pour les lavages broncho-alvéolaire et les leucocytes où deux fois plus de prélèvements sont retrouvés positifs. L'antigénémie pp65,

utilisée pour l'examen des leucocytes sanguins, est préconisée par plusieurs équipes et un seuil supérieur à 50 polynucléaires marqués pour 2.10^5 cellules est un marqueur précoce d'atteinte viscérale. L'ADNémie qualitative réalisée sur des leucocytes n'a pas d'intérêt, car trop peu spécifique d'une atteinte clinique. Pour surmonter cette difficulté, une analyse semi-quantitative du produit de PCR chez des sidéens montre qu'il existe une corrélation étroite entre la virémie, une quantité importante d'ADN CMVH leucocytaire (>800 équivalents pour 10^4 leucocytes) et l'existence de signes cliniques. Une étude de la recherche des ARN messagers viraux tardifs chez ces patients a donné des résultats concluant par rapport au développement d'atteinte viscérale (Gozlan et al., 1993).

5.3.2 Dans le cadre de l'HHV6

- Recherche d'une primo-infection

La mise en évidence d'une primo-infection à HHV6 est rarement objectivée par un diagnostic biologique étant donné l'âge souvent très précoce de la survenue de l'exanthème subit et le caractère généralement bénin de la pathologie. Néanmoins, une séroconversion entre deux prélèvements pratiqués à 15 jours d'intervalle et, dans le cas idéal, une détection des seules IgM spécifiques dans le premier prélèvement, associées aux IgG pour le deuxième, permettent clairement de l'affirmer. La mise en évidence, par une méthode directe, d'une virémie ou d'une ADNémie à la phase aiguë de l'infection chez un patient séronégatif est également un argument de valeur (Chiu et al., 1998).

-Recherche d'une infection active

Tout, comme pour le CMVH, il n'existe actuellement pas de méthode consensuelle pour faire le diagnostic des infections virales actives à HHV6 chez les patients immunodéprimés. Dans ce cadre, les méthodes sérologiques ne semblent pas les plus indiquées en raison des perturbations immunologiques chez ces patients bien que certains auteurs retiennent, comme critère d'indication d'une infection active, une augmentation significative du titre des IgG spécifiques (Miyoshi et al., 2001; Yoshikawa et al., 1998). Les techniques les plus fiables pour affirmer l'infection active à HHV6 et donc pour pouvoir l'incriminer en clinique chez l'immunodéprimé sont, avant tout, les méthodes directes. L'isolement viral est intéressant, mais son rendement global est trop faible et la technique reste lourde (Agut and Aubin, 1994; Drobyski et al., 1993b; Frenkel et al., 1994). La technique d'antigénémie leucocytaire semble, sur les premières évaluations, une méthode intéressante (Lautenschlager et al., 2002). Les méthodes, les plus utilisées dans ce cadre, sont représentées par les techniques de biologie

moléculaire. Les différentes stratégies mises au point pour poser le diagnostic d'infection active sont notamment représentées par la quantification virale qui commence à être évaluée (Collot et al., 2002; Gautheret-Dejean et al., 2002) et la recherche des ARN messagers tardifs qui en est au stade de développement.

PARTIE EXPERIMENTALE

La partie expérimentale rapporte les travaux débutés en 1998 concernant l'étude de la réplication virale de deux *Betaherpesvirinae*, le CMVH et l'HHV6, au sein du système hématopoïétique. Ce travail est scindé en deux parties faisant l'objet de trois articles différents. Les articles, précédés pour chacune des parties, d'une revue de la littérature sont ensuite brièvement commentés.

Dans un premier temps, des moyens d'investigation performants pour l'étude et le suivi de la multiplication virale de ces deux herpesvirus ont été mis au point. Ce développement a été réalisé successivement pour les deux virus. Pour le CMVH, ayant à notre disposition au laboratoire une technique de cytométrie de flux pour la détection des antigènes viraux, notre travail s'est donc orienté vers la biologie moléculaire. L'objectif a été de développer des techniques de RT-PCR sensibles et spécifiques pour permettre la détection d'ARN messagers parmi lesquels un ARNm d'un gène tardif, témoin d'une réplication totale du virus. Le développement et l'apport de ces nouveaux marqueurs chez des patients greffés rénaux dans le cadre du suivi de l'infection active à CMVH est présenté dans le premier article : "Andre *et al.*, *Diagnostic Microbiologic Infectious Disease* , 1999 ;34 : 287-291".

Pour l'HHV6, les données disponibles de la littérature sont plus récentes et par conséquent plus limitées. Le laboratoire ne dispose alors que d'une technique de PCR pour détecter l'ADN génomique. La culture cellulaire de l'HHV6 mise en place, nous avons développé une RT-PCR à la recherche de transcrits ainsi qu'une technique de cytométrie de flux pour la détection antigénique. Le deuxième article "Andre-Garnier et al ; *Journal of Virological Methods* 2003 ;108 : 213-222 " rapporte l'ensemble de ces développements et leur validation au cours de la réalisation d'une cinétique d'infection *in vitro* de souches d'HHV6-B.

La deuxième partie est consacrée à l'évaluation de la réplication des deux *Betaherpesvirinae* au cours de la différenciation, *in vitro*, de progéniteurs hématopoïétiques. Ces travaux seront exposés lors d'une communication orale (" *9th International Cytomegalovirus Workshop & 1th International Betaherpesvirus Workshop*" ; Maastricht 20-25 Mai 2003) et font l'objet d'une publication actuellement soumise à *Blood*.

1-DEVELOPPEMENT DES MARQUEURS DE SUIVI DE L'EXPRESSION VIRALE DU CMVH ET DE L'HHV6

L'étude des virus en phase de multiplication est requise pour mieux comprendre certains aspects de la physiopathologie des infections qu'ils provoquent. Le développement d'outils permettant d'aborder la réplication virale autorise non seulement une analyse pertinente des interactions virus/cellules, mais permet également d'envisager, notamment pour les virus de découverte récente, une évaluation adaptée de leur pouvoir pathogène.

1.1 Les différents marqueurs de la multiplication virale

En raison du caractère latent des Herpesvirus, état auquel est associée une persistance de l'ADN viral dans certains systèmes cellulaires, la seule détection du génome viral se révèle souvent insuffisante pour évaluer leur état réplcatif. Dans ce contexte, le recours à la mise en évidence de l'expression virale est indispensable. Celle-ci comporte un ensemble d'évènements qui font suite à la pénétration du génome viral dans le cytoplasme, puis dans le noyau cellulaire. La première étape de l'expression virale est représentée par la transcription nucléaire des messagers viraux (ARNm), suivie de leur traduction au niveau des ribosomes cytoplasmiques. Ces étapes de transcription/traduction se déroulent, dans le cas des Herpesvirus, selon trois phases, qui aboutissent à la synthèse des protéines non structurales (notamment enzymes indispensables à la réplication du génome et à la régulation du cycle) ou structurales. La phase ultime de l'expression virale est l'assemblage et la libération des particules virales infectieuses.

Il est donc possible d'utiliser plusieurs marqueurs complémentaires:

- l'identification des virus en microscopie électronique
- l'isolement des virions en culture
- l'analyse de l'expression des protéines virales au niveau des cellules infectées
- la détection des transcrits viraux au cours des différentes étapes de la multiplication virale

1.1.1 La microscopie électronique

Elle permet, par une technique de coloration négative de réalisation délicate, la visualisation des virus au sein d'un échantillon (culture virale, prélèvements effectués chez des patients). Pour être réalisable, cette technique nécessite la présence de virus en quantité importante, la concentration requise étant estimée à 10^6 particules virales /ml. Dans les autres cas, il est possible d'envisager de pratiquer une concentration préalable des virus ou d'avoir recours à la mise en contact avec un sérum du prélèvement : le virus apparaît alors sous une forme complexée qui facilite sa visualisation (immunomicroscopie électronique). Elle est utile pour détecter des virus non cultivables comme les virus des gastro-entérites (rotavirus, calicivirus, astrovirus). Cette technique ne permet pas de différencier morphologiquement deux virus de la même famille, mais peut être utilisée afin de vérifier la présence et l'intégrité des particules virales après avoir réalisé une technique de concentration dans l'objectif, par exemple, de se constituer un stock viral titré (Figure :11). Cependant, cette technique reste relativement lourde, nécessitant l'accès à un microscope électronique, ainsi que du personnel très compétent. Son intérêt pour l'étude de la réplication virale est donc très limitée (Petric and Szymanski, 2000).

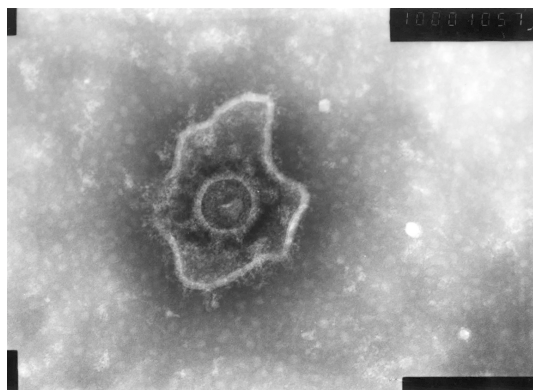


Figure 11a



Figure 11b

Figure 11: Détection en microscopie électronique, après coloration négative de particules virales de CMVH (11a) et d'HHV6 (11b)(x 100000)

(Cliché, Dr C Mollat, Laboratoire de Virologie, CHU Nantes)

1.1.2 Isolement viral en culture

1.1.2.1 Principes généraux

La culture des virus, parasites intracellulaires obligatoires, ne peut être réalisée que sur des cellules vivantes. En théorie trois sources de cellules vivantes peuvent être utilisées pour le diagnostic en virologie. Les animaux, intéressants comme modèles expérimentaux et indispensables pour la multiplication de certains virus (souriceaux nouveau-nés pour les coxsackie virus A), ne peuvent être compatibles avec un usage en routine. Les œufs de poule embryonnés, s'ils ont été très utilisés dans le passé (virus grippaux, poxvirus...) ne sont plus retrouvés en diagnostic. Ils restent en revanche nécessaires pour la production de vaccins ou de stocks importants de virus (exemple : la grippe). En pratique, le recours à l'inoculation de cultures cellulaires est par conséquent le procédé le plus souvent utilisé pour l'isolement des virus.

La culture de virus exige un environnement bien équipé permettant le respect des règles de sécurité vis à vis de l'agent infectieux. La viabilité des virus présents dans le prélèvement devant être préservée, il est indispensable de respecter des conditions de prélèvement et de transport rigoureuses, sous peine d'un résultat faussement négatif.

Dans la mesure où il n'existe pas un type cellulaire permissif à tous les virus cultivables, trois types de cellules sont donc retrouvés au laboratoire. Les cellules primaires sont issues des cellules d'un organe ou de sang humain (exemple : les cellules mononucléées sanguines périphériques pour la réalisation de co-cultures), de tissus d'un organe animal (rein de singe). Leur difficulté d'obtention limite leur emploi. Les cellules en lignées continues sont des cellules transformées, caractérisées par leur capacité de prolifération infinie. Elles peuvent être d'origine humaine (hela : adénocarcinome du col de l'utérus, KB : carcinome du plancher de la bouche, Hep-2 : carcinome du larynx, MT4 : lymphocytes transformés), simienne (Vero, BGM : cellules transformées), ou d'autres espèces (cellules transformées de rein de chien : MDCK). Elles ont l'avantage de permettre un nombre quasiment infini de subcultures. Les cellules fibroblastiques embryonnaires humaines représentent la troisième catégorie. Il s'agit de cellules diploïdes issues de tissus fœtaux pulmonaires et rénaux dont le nombre de passage est limité. Elles permettent la réplication d'un grand nombre de virus pathogènes pour l'espèce humaine et constituent les seules cellules permettant l'isolement du cytomégalo virus.

Ces techniques de culture classiques sont parfois longues, et nécessitent un personnel qualifié et une surveillance rapprochée parfois fastidieuse. Elles manquent pour certains virus ou certains prélèvements de sensibilité par rapport à d'autres techniques basées notamment sur l'amplification génique. Elles restent, malgré tout, la référence en virologie, représentant un outil nécessaire pour l'épidémiologie, l'étude de la sensibilité aux antiviraux et la mise en évidence de nouveaux virus (Figure 12) (Landry and Hsiung, 2000).



Figure 12 a

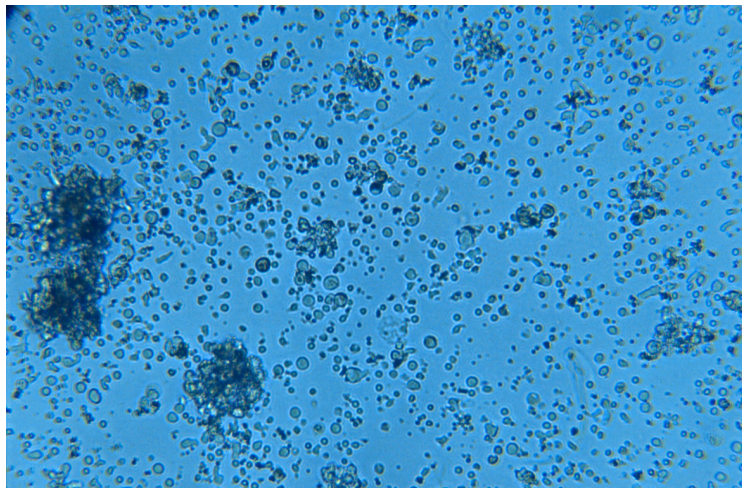


Figure 12b

Figure 12: Effets cytopathogènes (ECP) du CMVH sur cellules fibroblastiques embryonnaires humaines (12a) et de l'HHV6 sur cellules mononucléées sanguines périphériques (12b) (x100) (Cliché, Laboratoire de Virologie, CHU Nantes)

1.1.2.2 Isolement du CMVH en culture

Dans notre travail, la culture du CMVH a été utilisée afin de multiplier des souches de référence (AD 169 souche ATCC VR977, Towne : souche virale atténuée : vaccinale, Toledo : souche clinique possédant des ORF supplémentaires), ainsi que des souches de patient. L'impact des variations génétiques entre les différentes souches, conduit à une modification du tropisme cellulaire de plus en plus étayée (Bolovan-Fritts and Wiedeman, 2002; Hahn et al., 2003). D'un point de vue physiopathologique, ces mutations semblent s'accompagner d'une modification de la qualité de la réponse cellulaire T (Retiere et al., 1998). L'intérêt de disposer au laboratoire de plusieurs souches est de pouvoir envisager secondairement des études d'infection *in vitro*. Dans ce travail, elles ont été nécessaires pour la préparation de stocks de virus titrés et l'évaluation de la sensibilité de nos techniques de biologie moléculaire (Annexe 1). Toutes ces cultures ont été réalisées sur des cellules embryonnaires fibroblastiques diploïdes MRC-5. Ces cellules permissives supportent la production de virion à un titre relativement élevé. Après quelques jours de culture de ces cellules dans des conditions favorisant leur croissance, les cellules fusiformes sont à confluence et prêtes à être inoculées. Les souches de référence et les souches de patients sont conservées à -80°C en présence d'un agent cryoprotecteur. Une fois mise en culture et après quelques passages, les souches peuvent être multipliées sur un nombre important de flasques autorisant secondairement la préparation de stocks de virus. Leur multiplication est visualisée au microscope inversé avec l'apparition de l'effet cytopathogène caractéristique constitué de foyer de cellules augmentées de volume et réfringentes apparaissant lentement le long d'un grand axe des fibroblastes. Les virions restent attachés aux cellules infectées et se transmettent de cellule à cellule, nécessitant de faire éclater les cellules afin de récupérer les virions. Le titrage des souches de CMVH obtenues après ultracentrifugation est réalisé en $\text{DITC}_{50}/\text{ml}$ en plaque 24 puits en utilisant la méthode de la culture rapide (Annexe 1, Figure 12a).

1.1.2.3 Isolement de l'HHV6 en culture

L'isolement de l'HHV6 au cours d'une co-culture lymphocytaire est la technique de référence qui a d'ailleurs été à l'origine de la découverte du virus à partir d'un prélèvement sanguin. La salive constitue l'autre type de prélèvement dans lequel le virus peut être recherché en culture.

Depuis la découverte de l'HHV6 en 1986 chez des patients séropositifs pour le VIH, des souches rapidement classées en variant A et B ont été isolées chez ces patients et sont devenues pour certaines d'entre elles des souches de référence transmises entre les laboratoires. Parmi les souches de variant A, sont ainsi identifiées la souche GS isolée chez les premiers patients (Salahuddin et al., 1986), la souche U1102 isolée chez un enfant atteint d'exanthème subit (Downing et al., 1987). Pour le variant B, la souche Z-29 a été isolée chez un patient zaïrois séropositif vis à vis du VIH (Lopez et al., 1988) et la souche HST isolée chez un enfant japonais atteint d'exanthème subit (Yamanishi et al., 1988).

Les cellules mononucléées sanguines périphériques (CMSPs) de patients, activées *in vitro*, constituent le support cellulaire le plus couramment utilisé pour rechercher ce virus lymphotrope (Figure 12b). Des essais de culture de l'HHV6 sur des lignées continues (Molt-3, HSB2, MT4) ou sur des cellules fibroblastiques ont également été réalisés. Les résultats obtenus sur ces différents types cellulaires sont variables avec des différences de permissivité observées selon la nature du variant A ou B, en particulier sur le modèle fibroblastique qui conviendrait mieux pour la culture de l'HHV-6A. Toutefois, il ne s'agit pas d'un modèle idéal car il ne permet pas une forte multiplication virale. De plus l'ECP étant inexistant, ce modèle implique une détection des antigènes viraux par technique d'immunofluorescence ou d'immunopéroxydase (Robert et al., 1990). La culture sur lignée présente l'avantage de ne pas dépendre des donneurs de lymphocytes ou de prélèvements de sang de cordon parfois difficiles à obtenir.

Nous disposons au laboratoire de la lignée cellulaire MT4, issues de cellules lymphoïdes T transformées par le virus HTLV et de la souche HST, mises à notre disposition par le laboratoire de virologie du Pr H Agut (laboratoire de virologie, hôpital de la Pitié Salpêtrière). La co-culture lymphocytaire nous a été utile pour la recherche et l'isolement de souches virales de patients. Par la suite, le passage sur la lignée a représenté une autre alternative plus facile pour la production de virus (réalisation de stocks viraux titrés, entretien de la souche de référence). Un prélèvement sanguin périphérique, réalisé chez un enfant de 2 ans hospitalisé en oncologie pédiatrique, a été à l'origine de l'isolement de la souche GUI. Cet enfant avait présenté une fièvre prolongée. L'ADNémie positive constituait l'argument biologique laissant envisager une infection active à HHV6. Après isolement de cellules mononucléées par gradient de Ficoll, la co-culture a été démarrée avec une apparition d'un ECP en 4 jours caractéristique de l'HHV6, et confirmée par IF (anticorps 7C7). La souche typée B grâce à notre PCR, a ensuite été entretenue et conservée (Annexe 2).

1.1.3 La recherche des antigènes viraux

La mise en évidence de l'expression d'antigènes viraux par les cellules permissives pour le virus constitue une deuxième approche de détection de l'expression virale. Il convient de distinguer deux grands types de technique : l'immunocytodiagnostic par immunofluorescence ou immunoperoxydase et la détection des antigènes par cytométrie en flux (CMF).

1.1.3.1 Immunocytodiagnostic par IF ou IP

Il consiste à visualiser directement en microscopie la présence d'antigènes viraux dans des cellules infectées à l'aide d'un anticorps, le plus souvent monoclonal, spécifique du virus à rechercher. Dans le cas de l'IF le marqueur fluorescent peut être directement associé à l'anticorps spécifique (IF directe) ou associé dans le cas de l'IF indirecte à un deuxième anticorps polyvalent. Lorsque le marqueur fluorescent est remplacé par la peroxydase, l'addition d'un substrat spécifique de cette enzyme entraîne alors une coloration des cellules au niveau du site de fixation de l'anticorps : c'est la technique d'immunoperoxydase.

1.1.3.2 Détection des antigènes viraux par cytométrie en flux (CMF)

Cette technique largement implantée dans les laboratoires de biologie clinique, en particulier en hématologie et en immunologie, est en cours de développement en virologie avec différentes applications, parmi lesquelles la détection et la quantification d'antigènes viraux (Alvarez-Barrientos et al., 2000; Poirier-Toulemonde et al., 2000).

Cette méthode écarte le problème de la subjectivité de la lecture au microscope et permet un contrôle exact du nombre de cellules techniques.

Principe et appareillage (Figure 13)

La CMF est basée sur l'étude des interactions de particules (cellules, micro-organisme...) avec un faisceau de lumière incidente. Après interception de cette lumière, la particule émet un certain nombre de signaux, qui pourront être corrélés avec des propriétés de la particule. Ainsi peuvent être étudiées la lumière diffusée dans différentes directions (« *scattering* »), la lumière absorbée et/ou celle émise par la particule (fluorescence).

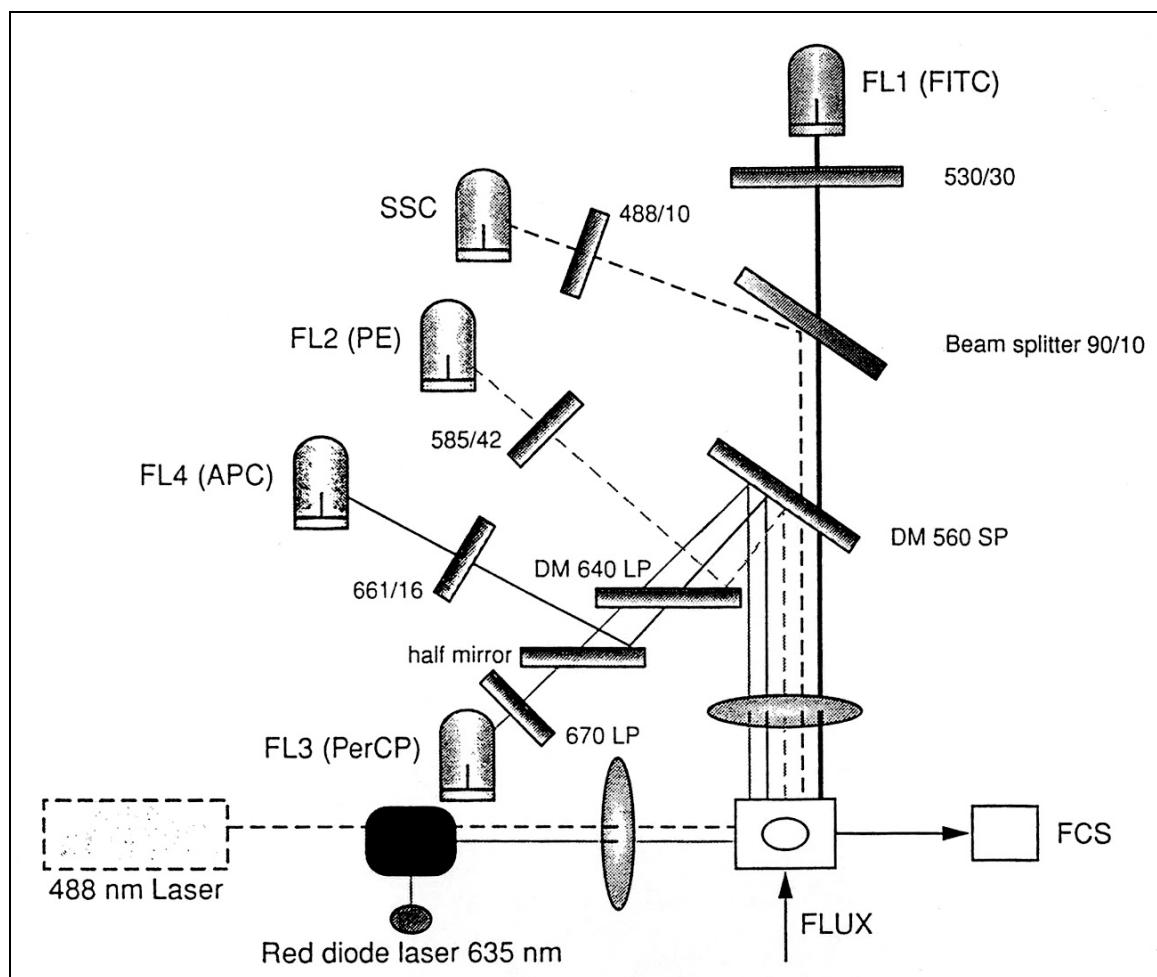


Figure 13 : Système optique d'un cytomètre analyseur (BECTON DICKINSON, France)

Les particules, en suspension dans une gaine liquide, arrivent dans la chambre d'analyse où elles sont interceptées par un laser (488nm) ou par deux lasers (diode laser 635nm, puis laser 488nm), choisis en fonction de la longueur d'onde d'excitation du ou des fluorochromes utilisés. La lumière diffusée aux petits angles (Forward Scatter, FCS) ou aux grands angles (Side Scatter, SSC) est récupérée soit directement par une photodiode (FCS), soit par un photomultiplicateur (SSC), après réflexion par la plaque de déviation du faisceau (Beam Splitter) et sélection de la longueur d'onde excitatrice par un filtre passe-bandes (488-10). Pour les paramètres de fluorescence, un jeu de miroirs dichroïques (DM) et de demi-miroirs (Half Mirror) permet de réfléchir et/ou de transmettre jusqu'à 4 fluorescences de longueurs d'onde différentes, sur 4 photomultiplicateurs différents (FL1 : isothiocyanate de fluorescéine ; FL2 : phycoérythrine ; FL3 : PerCP ; FL4 : allophycocyanine), après sélection finale par un filtre passe-bande spécifique. Pour les autres fluorochromes, la détection de la lumière émise se fait à d'un des 4 photomultiplicateurs, en fonction de la longueur d'onde d'émission du fluorochrome sélectionné.

Un cytomètre de flux comporte différents modules qui fonctionnent en étroite collaboration :

- le système fluidique assure un centrage hydrodynamique des particules, en suspension, monodispersées. Elles sont injectées au centre d'une veine liquide qui les aligne, puis conduites jusqu'à la chambre d'analyse où elles rencontrent le faisceau lumineux.

- le circuit optique regroupe la source lumineuse, la chambre d'analyse et les systèmes de sélection et de collecte des signaux. Le choix des sources, type laser à ions Argon ou à Hélium/néon conditionne les fluorochromes utilisables. Le système de sélection des signaux est constitué de miroirs qui permettent d'acheminer les longueurs d'ondes émises aux photomultiplicateurs, avec une sélection finale par un filtre passe-bande. Après transformation en signal électrique, ce dernier est amplifié, mesuré et enfin numérisé et traité par le système informatique.

- le système informatique, en perpétuel perfectionnement, assure l'analyse multiparamétrique (histogrammes) ou bi-paramétrique (*dot plot*).

– Problématique et application en virologie

Comme en IF classique, la spécificité du signal de fluorescence obtenu dépendra de la spécificité de reconnaissance de l'antigène par l'anticorps. Le bruit de fond, pouvant être produit par une fixation non spécifique des réactifs sur des cellules « négatives » comme la fixation des anticorps via les récepteurs Fc présents à la surface de beaucoup de cellules (monocytes/macrophages, lymphocytes, polynucléaires), peut être annulé par l'addition au cours du marquage dans les réactifs d'un sérum humain normal. Les anticorps apportés par le sérum se fixent sur tous les antigènes de la cellule, excepté sur l'antigène cible sur lequel la liaison de l'anticorps spécifique hautement affiné se fait préférentiellement.

Pour s'assurer de la spécificité de la fluorescence détectée, le meilleur moyen est d'introduire rigoureusement à chaque étape des contrôles qui vont contribuer à l'évaluation de la performance des réactifs, la qualité de la préparation des cellules... le contrôle négatif le plus utilisé est le contrôle isotypique qui consiste à remplacer l'anticorps utilisé par un marquage par une autre immunoglobuline de même isotype, qui ne reconnaisse aucun des antigènes exprimés par la cellule cible. Les contrôles positifs permettent de s'assurer que le réactif utilisé est capable de reconnaître correctement sa cible.

La recherche des composants antigéniques viraux requiert une perméabilisation préalable des cellules afin que les anticorps puissent pénétrer et rejoindre leur cible intra-cytoplasmique ou nucléaire. De nombreuses procédures techniques de fixation/perméabilisation sont étudiées en virologie reposant le plus souvent sur l'utilisation de paraformaldéhyde, puis le méthanol

et/ou l'éthanol. Parmi les critères de choix, la nécessité de conserver la morphologie ou l'expression de certains antigènes membranaires nécessaires à l'individualisation de la population cellulaire étudiée est importante. La possibilité de garder les cellules perméabilisées et fixées pour différer le marquage et/ou l'analyse est également à envisager au cours du développement.

1.1.4 La recherche des ARN messagers par RT-PCR

1.1.4.1 Généralités sur les ARNm et les techniques de RT-PCR

L'ARN messenger provient de la transcription de l'ADN. Il sert de matrice pour la traduction en protéines au niveau des ribosomes. Comme tous les ARN, il se distingue de l'ADN par son sucre, le ribose, et diffère d'une base pyrimidique, l'uracile (U) au lieu de la thymine (T) de structure chimique voisine et s'appariant à l'identique à l'adénine (A). La synthèse d'un ARNm à partir d'un ADN s'effectue toujours dans le sens 5'→3', de manière antiparallèle et complémentaire par rapport à la portion d'ADN copiée. La transcription nécessite l'action d'une enzyme, l'ARN-polymérase, dépendante de la présence de nucléosides triphosphatés et d'un environnement riche en sels de magnésium. Il existe des signaux de polyadénylation (séquence type 5'AATAAA 3') sur le brin sens annonçant la terminaison du gène. Une fois synthétisés, les ARN messagers sont clivés dans leur partie 3' à une vingtaine de bases en aval de cette séquence. Après cette coupure, une enzyme nucléaire, la polyA polymérase, fixe un nombre variable de bases A. Cette queue poly-A semble jouer un rôle dans la stabilisation des messagers et l'initiation de la traduction.

Le phénomène d'épissage est le mécanisme d'excision des séquences introniques du transcrit primaire et de raboutage des exons survenant au cours de la maturation des transcrits. Le premier élément dans la connaissance des mécanismes d'épissage complexe fut la mise en évidence de séquences nucléotidiques, appelées séquences consensus retrouvées aux extrémités des introns. Ces dinucléotides sont GU en 5' et AG en 3' de l'intron (règle de Chambon). Dans une unité complexe intra-nucléaire, désignée spliceosome, l'épissage aboutit à la production de l'ARNm avec les deux extrémités des exons associées et de l'intron libéré en lasso. Certains messagers sont susceptibles d'épissages différentiels correspondant à l'existence de plusieurs schémas d'épissage d'un transcrit primaire aboutissant à la formation de différents ARNm et pouvant donner lieu à la synthèse de plusieurs protéines différentes: l'épissage peut alors être également qualifié d'alternatif (Kaplan and Delpuch, 1995a).

La détection de ces ARNm est possible *in vitro* en utilisant des techniques de biologie moléculaire, notamment de polymérisation en chaîne, adaptées à l'amplification des ARN en ajoutant une étape préalable de transcription inverse (RT) pour transformer l'ARN en ADN complémentaire (ADNc) avant son amplification par PCR. Dans ce cadre le choix d'ARNm issu d'un épissage permet de différencier aisément l'amplification de l'ADN génomique de l'ARNm sur la simple différence de taille de l'amplicon. Cette démarche est donc intéressante pour se garantir de résultats faussement positifs susceptibles d'être obtenus en RT-PCR. L'inconvénient est qu'elle limite le choix des ARNm notamment en ce qui concerne les messagers du CMVH et de l'HHV6 partiellement identifiés.

1.1.4.2 Extraction des ARNs totaux

La recherche des ARN messagers, à partir d'extraits d'ARN totaux, est une méthode fréquemment utilisée. Les ARN messagers ne représentant qu'environ 1 à 5% de l'ARN cellulaire total, ces méthodes se doivent donc d'être sensibles.

Précautions requises

L'extraction des ARNs est relativement délicate en raison de la grande vulnérabilité et de la dégradation facile de ces acides nucléiques, notamment sous l'action de ribonucléases (RNases) ubiquitaires. Des précautions particulières sont donc à respecter (matériel stérile, port de gants...). Les échantillons à extraire doivent être conservés à -80°C . Même après avoir subi un choc thermique, ces RNases sont capables de se renaturer, ce qui justifie l'addition de bêta-mercaptoéthanol, agent réducteur, qui aide à la conservation de ces RNases à l'état dénaturé. Etant présentes dans les cellules, leur neutralisation est donc indispensable dès l'étape de lyse cellulaire à l'aide d'agents comme le thiocyanate de guanidinium (GTC). Par la suite le travail sur la glace limite leur activité.

Principe de l'extraction

A l'instar de l'extraction d'ADN, trois étapes successives sont nécessaires pour obtenir un ARN purifié : lyse, extraction, précipitation/élution.

- La lyse :

La lyse cellulaire peut être réalisée en tampon salin et en présence de protéinase K et d'un détergent (sodium dodécyl sulfate). L'autre possibilité consiste à utiliser une association d'un agent dissociant type thiocyanate de guanidinium et d'un agent réducteur comme le bêta-mercaptoéthanol capables de dissocier les protéines, de les lyser, d'inactiver les RNases (Chomczynski and Sacchi, 1987; Hill et al., 1991).

- L'extraction :

L'extraction peut être réalisée en milieu liquide en phénol-chloroforme. Cette technique est basée sur la précipitabilité différentielle de l'ARN et de l'ADN en fonction du pH. Dans des conditions acides, l'ARN reste en solution aqueuse, l'ADN et les protéines sont à l'interphase. L'absorption réversible des acides nucléiques sur des colonnes recouvertes d'un support poreux type silice est une autre méthode. Les substances contaminantes (protéines, ions...) sont éliminées au cours de lavages successifs (Boom et al., 1990).

-La précipitation/purification

La technique s'achève soit par une précipitation éthanolique, soit par une élution des ARNs retenus sur la colonne de silice.

Un inhibiteur des RNases est souvent ajouté dans l'extrait final (Rnasin : inhibiteur isolé de pancréas de bovin). L'extrait doit être conservé à -70°C en évitant les étapes de congélation/décongélation.

- Principe de quelques techniques commercialisées

Le recours à l'utilisation de l'agent dissociant GTC associé au bêta-mercaptoéthanol est fréquent notamment dans les techniques commercialisées basées sur une technique d'extraction en phase liquide (RNA-PLUS™, Bioprobe, Qiagen).

La technique Qiagen utilisant une membrane recouverte de silice incluse dans une micro-colonne de centrifugation repose sur la méthode de Boom et est intéressante de part sa facilité, sa rapidité et son moindre risque de toxicité pour le manipulateur.

Au cours de la réalisation des techniques, l'absence de contamination par de l'ADN, n'est pas toujours garantie ou au moins reproductible. La présence éventuelle d'ADN est susceptible d'être gênante, en particulier lors la recherche d'ARNm non épissés. Un traitement de l'extrait par une Dnase avant la transcription inverse peut ainsi être recommandé. Ce traitement doit être réalisé avec précaution afin de ne pas altérer le matériel ARN. Les méthodes sur colonne d'extraction associées à un traitement à la DNase sont satisfaisantes : rapides, faciles, n'entraînant pas de perte de matériel (Kaplan and Delpéch, 1995b).

L'extraction des ARN messagers peut être également réalisée spécifiquement. Des techniques relativement onéreuses ont été développées et commercialisées par différentes sociétés. En effet, l'ARN messenger comportant une queue poly (A), il peut être purifié par chromatographie d'affinité ou en utilisant des billes magnétiques recouvertes d'oligo (dT). L'expérience semble démontrer qu'il est préférable d'extraire l'ARN total plutôt que les ARN polyA.

1.1.4.3 Les techniques de RT-PCR

Par rapport à la classique réaction de polymérisation en chaîne (PCR), permettant l'amplification spécifique d'une séquence d'ADN en plusieurs millions d'exemplaires, l'amplification de l'ARN nécessite une étape préalable de transcription inverse (RT) (Figure 14). Une enzyme, la transcriptase, transforme l'ARN messager ou autre (ribosomal, viral...) en son ADN complémentaire. L'évolution des techniques a vu le passage de la RT-PCR en deux temps, puis celui de l'avènement de la RT-PCR en un tube et plus récemment des RT-PCR en temps réel.

1.1.4.3.1 Les amorces

Comme l'ADN polymérase, la RT a besoin d'une amorce pour synthétiser le brin complémentaire. Trois types d'amorces peuvent être utilisés pour synthétiser l'ADNc d'un ARNm :

- _ Les oligo (dT), composés uniquement de desoxythymidine (environ 12 à 18 dTTP) sont capables de s'hybrider en 3' sur les queues poly-A des ARNm, permettant d'amorcer leurs transcriptions inverses. Cette technique est très largement utilisée.

- _ Les amorces random hexanucléotides : il s'agit d'un mélange de plusieurs amorces très courtes de 6 pb, comprenant toutes les combinaisons des 6 nucléotides (4⁶). Grâce à cette grande diversité certains oligonucléotides s'hybrident à l'ARNm pour servir d'amorces. En cas d'ARN riche en GC, ce type d'amorce paraît intéressant. De plus pour les ARN très longs cette technique diminue les problèmes de calage de la transcriptase au niveau des structures secondaires grâce à un amorçage s'effectuant un peu partout le long de l'ARN.

- _ L'amorce spécifique de séquence complémentaire de l'ARN à amplifier représente la troisième solution. Cette dernière possibilité est la seule envisageable dans le cas des RT-PCR réalisées en une seule étape (Figure 14).

L'utilisation des amorces oligo (dT) et hexonucléotides permet, de se constituer, lors de la réalisation de la réaction de RT, un aliquot d'ADNc totaux à partir de l'extrait. Elle n'est envisageable que lors des réactions de RT-PCR en deux tubes. Cet ADNc total conservé à -20° C peut servir à la réalisation de différentes PCR. Les techniques plus récentes en un tube ne permettent pas leur usage, c'est donc l'amorce anti-sens qui est utilisée.

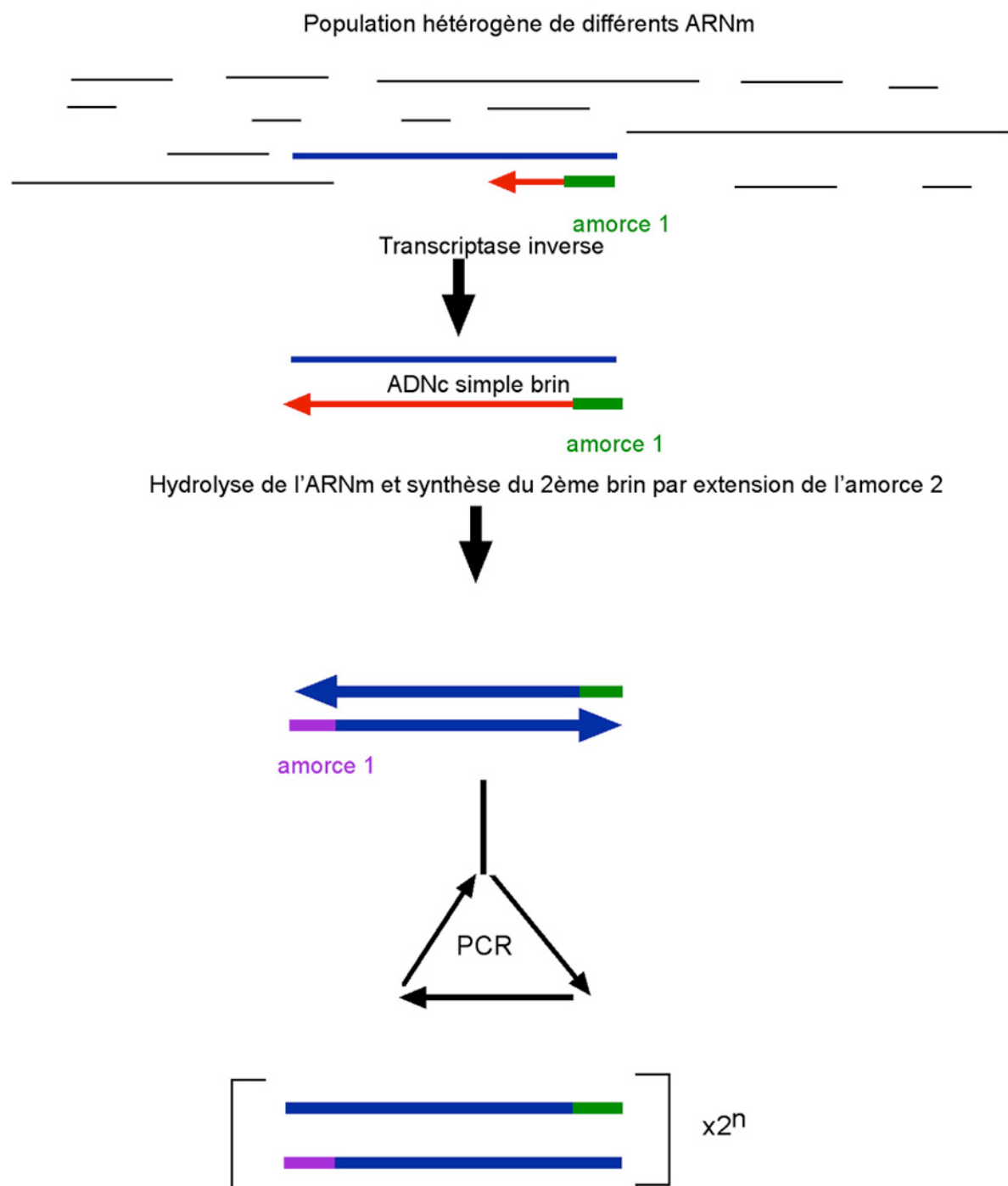


Figure 14: Amplification d'un ARN messenger cible par la méthode de RT-PCR, en un seul tube, d'après (Kaplan et Delpech, 1995b)

1.1.4.3.2 Réaction de RT-PCR

La réaction de transcription inverse est particulièrement délicate. Elle nécessite l'utilisation d'une enzyme particulière : la RT ou transcriptase inverse. Parmi les RT, l'AMV (*Avian Myeloblastosis Virus*) est extraite de cellules infectées par du virus de myéloblastose aviaire. En plus de son activité ADN polymérase, elle est douée d'une activité Rnase. L'enzyme MMLV (*moloney murine leukemia virus*), isolée à partir de cellules de souris transformées par ce virus Moloney, possède une activité Rnase plus faible que la première et même nulle sous sa nouvelle forme commercialisée (Superscript™ Rnase (-)). La matrice ARN n'étant pas détruite dans ces conditions, l'enzyme agira avec un meilleur rendement.

Les ARNs simples brins peuvent former des structures secondaires et diminuer l'efficacité de conversion de l'ARN en ADNc (Persing, 1993). Pour éviter ce phénomène, l'ARN est généralement dénaturé (5 minutes à 65 ou 95° C) avant la réaction et conservé sur la glace. Des agents dénaturants (DMSO, DTT) sont fréquemment ajoutés dans le tampon réactionnel. Une autre possibilité consiste à réaliser la transcription inverse à une température élevée (entre 50° C et 70° C) avec une enzyme thermostable telles que la ThermoScript™ (Life Technologies), la C.Therm.Polymerase (Roche Diagnostic) ou la *Tth* ADN polymérase. Par ailleurs, pour éviter la dégradation de l'ARN, un inhibiteur de RNases (Rnasin) est systématiquement ajouté le mélange réactionnel.

En pratique, une RT-PCR peut être réalisée :

– En deux étapes (deux tubes, deux réactions) : après la transcription inverse, un aliquot de l'ADNc synthétisé (environ un dixième du volume de la réaction de RT) est transféré dans un nouveau tube contenant le mélange réactionnel de la PCR.

– En deux étapes (un tube, deux réactions) : les deux réactions (RT et PCR) sont successivement réalisées dans le même tube. Après la RT qui se déroule en présence de fortes concentrations en MgCl₂ (pour l'AMV et la Mu-MLV) ou en Mn²⁺ (pour la *Tth* ADN polymérase), le produit de RT est ensuite redilué (environ au cinquième) par ajout du tampon et des autres réactifs nécessaires pour la PCR (Myers and Gelfand, 1991).

– En une étape (un tube, une réaction) : les deux réactions sont réalisées dans les mêmes conditions sans réouverture des tubes. De nombreuses études ont abouti à la mise en place de kits commerciaux reposant sur cette troisième méthode, particulièrement attractive ("Titan™ one tube RT-PCR system" Boehringer-Manheim, "Superscript™ One step™ RT-PCR system " Gibco-BRL) (Figure 14).

Une autre possibilité est de rechercher à amplifier plus spécifiquement les ARN messagers. Un tel système est notamment commercialisé par la société japonaise TakaRa sous la forme du produit "mRNA selective PCR kit (AMV) ". Le principe repose sur l'utilisation d'analogues nucléotidiques particuliers (dNTPs*) permettant une dénaturation non plus à 94° C mais à 85° C. Ainsi après la transcription inverse seul l'ADNc peut être dénaturé à 85° C et donc successivement amplifié. L'ADN, contaminant éventuellement présent, restant sous sa forme bicaténaire, ne peut donc être amplifié par la réaction de PCR. De plus cette méthode a l'avantage de pouvoir être réalisée en une seule réaction (Auer et al., 1996).

1.1.4.3.3 Révélation

Visualisation en gel de polyacrylamide et hybridation sur membrane

Qu'elle soit en une ou deux étapes, la RT-PCR conduit à l'accumulation de nombreuses copies en ADN de la cible ARN de départ. Les produits d'amplification (amplicons) peuvent être visualisés, après migration électrophorétique, sur un gel d'acrylamide ou d'agarose à l'aide d'un agent intercalant, le bromure d'éthidium. Intercalé entre les bases, ce composé présente une fluorescence orangée sous lumière ultra-violette (U.V.). L'épissage, qui aboutit à l'élimination des introns, lors de la maturation des ARNm, est facilement visualisé sur ces gels par l'obtention de fragments de taille différente en fonction de la nature du produit amplifié (ADN ou ADNc).

La spécificité des bandes obtenues peut être contrôlée dans un second temps en réalisant un transfert sur membrane de nitrocellulose par application d'un champ électrique. Après dénaturation, la membrane est ensuite incubée en présence de la sonde spécifique du fragment recherché marquée à la digoxigénine. Après une nuit d'incubation, et deux lavages dans des conditions stringentes, la révélation des hybrides est réalisée par chimiluminescence grâce à un anticorps couplé à une phosphatase alcaline. L'incubation après de nouveaux lavages avec le substrat de chimiluminescence, aboutit à la formation par déphosphorylation du produit à un signal lumineux visualisé par impression d'un film photographique (Apaire-Marchais et al., 1994).

Hybridation sur plaque : DNA enzyme Immuno Assay (DEIA)

Le DEIA est une technique de révélation basée sur l'hybridation de l'ADN amplifié (préalablement dénaturé par la chaleur) avec une sonde ADN simple brin marquée à la biotine et fixée sur les parois des puits de plaques de microtitration cotées à la streptavidine. Les hybrides formés sont détectés par un anticorps monoclonal anti-ADN, qui ne réagit qu'avec l'ADN double brin : élément constituant l'originalité du kit. La suite de la réaction s'apparente

à une réaction immunoenzymatique classique, expliquant la possibilité d'automatisation à ce stade de la manipulation. L'anticorps anti-double brin est en effet révélé par un deuxième anticorps marqué par une peroxydase. L'addition ultime d'un substrat chromogène (tétraméthyl benzidine) conduit alors à l'apparition d'une coloration. La densité optique (DO) est lue à 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, donnant un résultat qualitatif de la présence ou non de l'amplicon recherché au départ (seuil de positivité évalué à une $DO > 0.3$). Cette révélation peut facilement être semi-automatisée. Cette technique est donc particulièrement indiquée pour une utilisation en routine dans un laboratoire. Elle est réalisée à partir des réactifs des laboratoires Sorin Biomedica et est bien maîtrisée dans notre laboratoire (Ferre-Aubineau et al., 1995)(Figure 15).

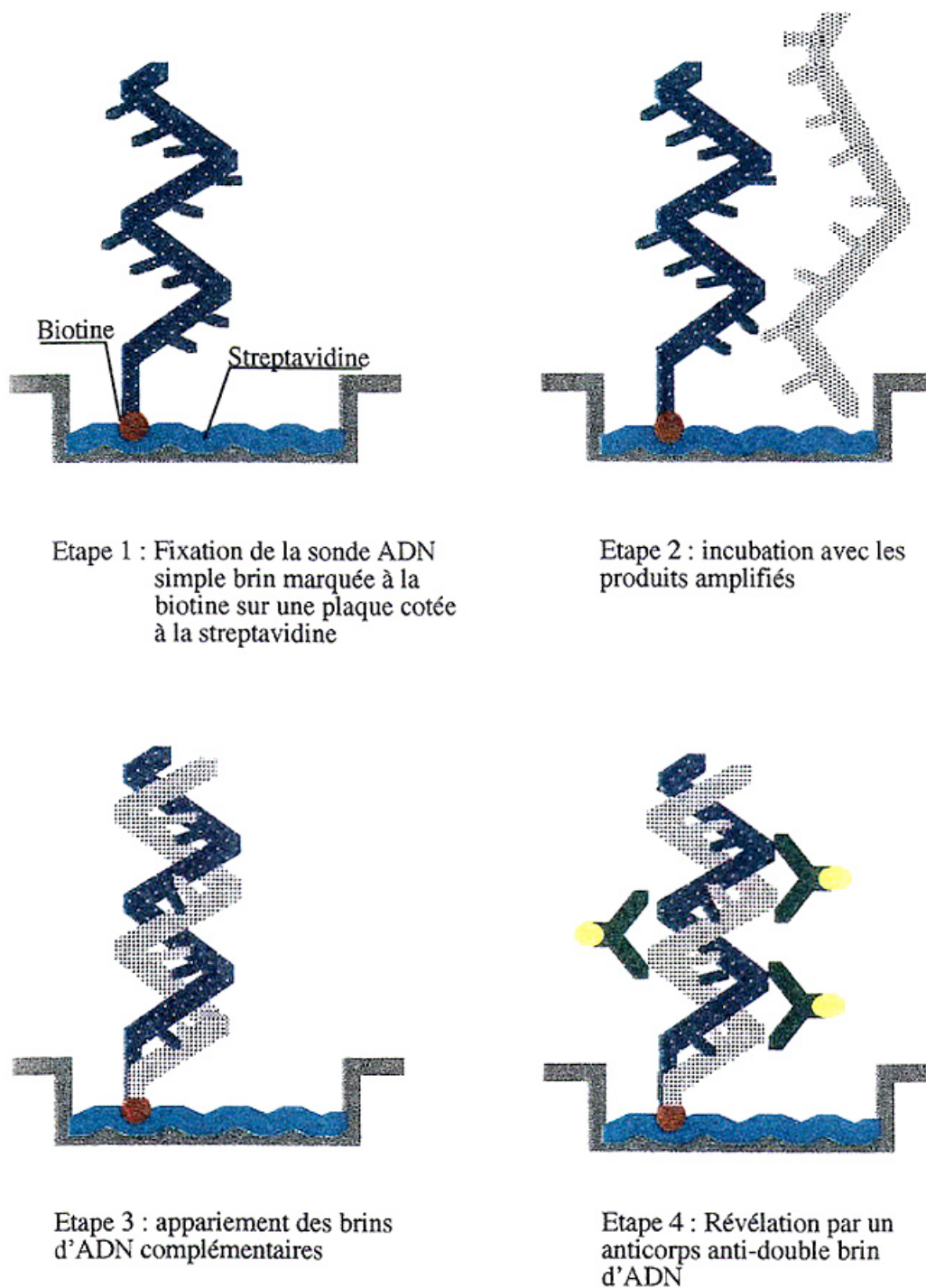


Figure 15 : Principe de l'hybridation en plaque des produits de PCR (DEIA)

1.2 Marqueurs moléculaires de la réplication du CMVH

Le développement et l'évaluation d'outils moléculaires permettant d'étudier les différentes phases du cycle de réplication du CMVH ont fait l'objet du premier article présenté dans cette thèse.

Ces travaux ont été initiés en 1997, dans un contexte de développement technologique très actif, notamment à la recherche de marqueurs virologiques permettant de prévoir le risque de survenue de maladies à CMVH au cours des infections actives. Etaient en particulier en cours de développement et d'évaluation pour le CMVH, une PCR compétitive permettant de quantifier la charge virale leucocytaire (Poirier-Toulemonde et al., 1997) et une méthode de recherche des antigènes viraux par cytométrie de flux (Imbert-Marcille et al., 1997b).

La possibilité de rechercher certains transcrits du CMVH devait, dans ce contexte, permettre de compléter nos études en situation clinique, par l'utilisation d'un marqueur différent. Elle offrait surtout la possibilité de promouvoir par la suite, des travaux plus fondamentaux d'analyse des interactions du CMVH avec des cellules du système hématopoïétique.

1.2.1- Article I

Utilisation d'une RT-PCR couplée avec une hybridation sur microplaque pour détecter un ARN messager tardif du CMVH dans les polynucléaires de sujets receveurs d'une greffe rénale

"Use of reverse transcription ploymerase chain reaction with colorimetric to detect a cytomegalovirus late spliced mRNA in polymorphonuclear leukocytes from renal transplant patients. "

E. Andre, B.M. Imbert-Marcille, D. Cantorovich, B. Besse, V. Ferre-Aubineau, and S. Billaudel. Diagn. Microbiol. Infect. Dis.(1999). **34** : 287-291.

Use of Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction with Colorimetric Plate Hybridization to Detect a Cytomegalovirus Late Spliced mRNA in Polymorphonuclear Leukocytes from Renal Transplant Patients

Elisabeth Andre, Berthe-Marie Imbert-Marcille,
Diego Cantarovich, Bernard Besse,
Virginie Ferre-Aubineau, and
Sylviane Billaudel

Human cytomegalovirus replication was evaluated in polymorphonuclear leukocytes from ten renal transplant recipients. Three new reverse transcription polymerase chain reactions with plate hybridization suitable for automation were developed for the detection of immediate-early spliced U_L123

mRNA, early-late pp65 mRNA, and late spliced U_L22 mRNA. The presence of U_L22mRNA was found to be significantly associated with the occurrence of cytomegalovirus (CMV) disease. © 1999 Elsevier Science Inc.

INTRODUCTION

Human CMV is a major cause of mortality and morbidity in immunodepressed patients, and particularly in transplant recipients. One current issue is the choice of one or more biological markers, present in blood and indicative of tissue invasion during active infection, which might contribute to the improved management of antiviral treatment. Among such

markers, the finding of viral gene transcripts, particularly late transcripts in peripheral leukocytes, seems to be associated with the development of CMV disease in HIV-seropositive (Gozlan et al., 1993: J Clin Microbiol 31:1943–1945) and transplant patients (Gaeta et al., 1997: J Med Virol 53:189–195; Nelson et al., 1996: J Virol Methods 56:139–148). These studies have focused either on the abundantly transcribed unspliced U_L86 mRNA, which necessitates elimination of DNA, or on the less abundant U_L22 spliced mRNA using a nested polymerase chain reaction, which increases the risk of false-positive results. We present here a sensitive technique that we have developed for detecting spliced U_L22 mRNA in polymorphonuclear leukocytes, using one-step amplification after transcription with revelation by plate hybridization, which would be suitable for routine laboratory use. The presence of

From the Virology Laboratory (EA, BMI-M, BB, VF-A, SB) EA1156, Biology Institute, Nantes University Hospital; and the Institute for Transplantation and Research in Transplantation (DC), Nantes University Hospital, Nantes, France.

Address reprint requests to Berthe-Marie Imbert-Marcille, Virology Laboratory, EA1156, Biology Institute, Nantes University Hospital, 9 quai Moncousu, 44093 NANTES cedex 01, France.

Presented in part at the 5ème congrès de la société française de microbiologie, Lille, 27–29 April 1998.

Received 21 December 1998; accepted 29 March 1999.

U_L22 mRNA was compared with that of immediate early spliced U_L123 mRNA and unspliced early-late pp65 mRNA (U_L83). These data were then analyzed in terms of their correlation with the results of more standard tests for CMV (viremia, qualitative leukocyte DNAemia, and pp65 antigenemia) and with CMV-related symptoms occurrence in patients receiving renal transplants.

The reverse transcription polymerase chain reactions (RT-PCRs) we used to detect U_L123, U_L22, and U_L83 mRNA were developed using RNA extracts obtained from human cytomegalovirus (CMV) reference strain AD 169, propagated on MRC-5 fibroblasts (BioMérieux, Lyon, France) for 12 h (U_L123) or 96 h (U_L83 and U_L22). RNA pellets were obtained from 1×10^6 cells using an RNAzol RNA extraction system (Bioprobe, Montreuil sous bois, France) as previously described by Chomczynski and Sacchi (1987) and were then resuspended in 20 μ L water with RNasin 1 μ g/ μ L (Promega, Charbonnière, France). Primers and probes sequences (Table 1) were redesigned from published data (Maciejewski et al. 1992; Nelson et al. 1997; Ruger et al. 1987). cDNA was synthesized as previously described (Apaire-Marchais et al. 1994) using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (MMLV-RT; Gibco BRL, Cergy-pontoise, France), and either oligodT15 for U_L123 mRNA or anti-sense primer for U_L83 and U_L22. Amplification was performed in a total volume of 25 μ L containing 4 μ L cDNA, 2.5 μ L $10\times$ buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M of each dNTP, 1 μ M of each primer, and 0.625U *Taq* polymerase (Pharmacia, Upsala, Sweden). After one 5-min cycle at 94°C, 40 cycles were run as follows: 30 s at 94°C, 60 s at 75°C, 65°C, or 63°C for U_L123, U_L83, and U_L22 respectively, and 60 s at 72°C. The efficacy of RNA isolation was assessed by the successful amplification of human glucose 6 phosphate deshydrogenase mRNA, de-

tected as described previously (Soderberg et al. 1993), and the efficacy of amplification by carrying out PCRs (same cycle conditions as RT-PCR) on DNA extracts obtained using a rapid-thaw boiling technique (Imbert-Marcille et al. 1997) from AD169-infected fibroblasts.

Development by means of 9% polyacrylamide gel electrophoresis (Figure 1) showed amplified products of 309 bp for U_L123 cDNA and 594 bp for U_L123 DNA, 222 bp for U_L22 cDNA and 304 bp for U_L22 DNA, and 154 bp for both U_L83 DNA and cDNA. Plate hybridization was performed as previously described using GEN-ETI-K™ DEIA kit (Diasorin, Saluggia, Italy) (Ferré-Aubineau et al. 1995). First, biotinylated probes (100 μ L of 50 ng/mL solution) were immobilized overnight on a streptavidin-coated microtiter plaque (GEN-ETI-K™ DEIA; Diasorin) at 4°C. After five washings, 100 μ L of hybridization buffer and 10 μ L of denatured RT-PCR products were incubated for 1 h at 50°C. After five washings, 100 μ L of standard monoclonal antibody preparation (Anti-dsDNA) was added to each well. Revelation was realized after washings by a peroxidase-labeled rabbit anti-mouse. Finally, after washing, peroxidase activity was visualized by colorimetric reaction. DEIA detection confirmed the specificity of amplifications (Table 2).

The detection limits of the three RT-PCRs were estimated by amplifying ten-fold serial dilutions of RNA extracts obtained from 2×10^6 MRC-5 cells infected with two AD169 virus doses. After hybridization, U_L123 and U_L22 mRNA were detectable down to a dilution of 10^{-4} (OD = 1.058) for infections of 0.01 MOI and down to a dilution of 10^{-5} (OD = 0.924) for infections of 0.1 MOI. U_L83 mRNA was detectable at a greater dilution (10^{-5} for 0.01 MOI and 10^{-6} for 0.1 MOI). Hybridization, as compared with gel electrophoresis, increased the detec-

TABLE 1 Human Cytomegalovirus Primer and Probe Sequences

Gene (Protein)	Name	Melting Temperature	Sequence	Position ^a
U _L 123 (early protein IE1)	Primer A1	78°C	5'agcatgtgtccttgattctatgccgcaccatgtcc3'	172168–177203
	Primer A2	83°C	5'ggattatcagggtccatcttctctggcagagga3'	172725–172760
	Probe exon Ae	64°C	5'atagtctgcaggaaacgtcgtg3'	172536–172556
	Probe intron Ai	73°C	5'tcgctatctcgatgcccccgct3'	172278–172298
U _L 83 (pp65 early late protein)	Primer B1	72°C	5'gctcgtgtgaggtaaaagccacatcc3'	120137–120162
	Primer B2	71°C	5'ggatcgtcaggtctctctccac3'	120267–120290
	Probe exon Be	64°C	5'cacaacacgtaagcgtt3'	120211–120231
U _L 22 (unknown late protein)	Primer C1	77°C	5'tatgatcttgagcttactagccgtgaccttgacg3'	27121–27155
	Primer C2	78°C	5'ggagtatgacgttttgattacagcggagatggcag3'	27391–27426
	Probe exon Ce	58°C	5'gcgctgatggtagtaatacc3'	27303–27322
	Probe intron Ci	67°C	5'aacgtgattgtgaacgcggt3'	27241–27260

^a Position on the complete AD169 strain human CMV genome (Genbank no. X17403).

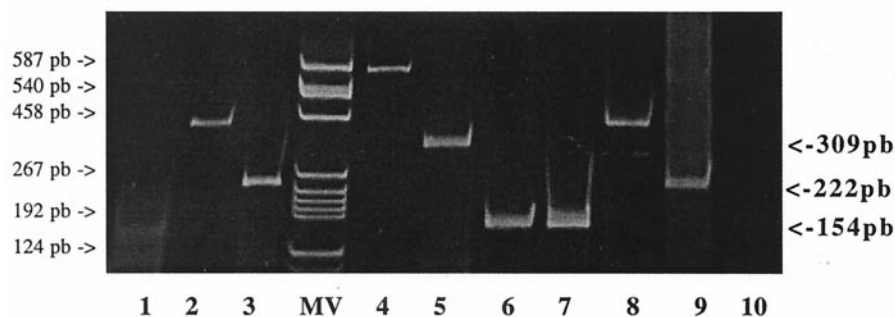


FIGURE 1 Electrophoresis gel analysis of PCR products of RNA and DNA extracts obtained from AD169 infected fibroblasts. Lanes 1 and 10: negative controls; lanes 2 and 3: G6PD DNA and cDNA; lane M: marker V (Boehringer); lanes 4 and 5: U_L123 DNA and cDNA; lanes 6 and 7: U_L83 DNA and cDNA; lanes 8 and 9: U_L22 DNA and cDNA.

TABLE 2 Results of Colorimetric Microtiter Plate Hybridization with Intron and Exon Probes on DNA and RNA Extracts from AD169-infected Fibroblasts

Extract Type	OD ₄₅₀ Values after Hybridization with Corresponding Gene Probes ^a				
	Spliced U _L 123 Gene		Unspliced U _L 83 Gene Probe Be	Spliced U _L 22 Gene	
	Exon Probe Ae	Intron Probe Ai		Exon Probe Ce	Intron Probe Ci
DNA	2.46	2.05	1.81	1.82	2.57
cDNA	1.36	0.07	1.61	2.70	0.02

^a positivity cut-off = 0.100.

tion limit by one dilution in all cases, as previously noted (Ferré-Aubineau et al. 1995).

Using a single 40-cycle amplification, without any loss of specificity thanks to the long primers used (Arnal et al. 1998), our method allows detection of immediate early spliced U_L123 and late spliced U_L22 mRNA, both at similar thresholds. The lower detection threshold for U_L83 mRNA most probably reflects the more abundant transcription of this gene (Revello et al. 1992). Partial contamination by residual traces of DNA cannot be completely excluded, however, as we omitted DNase treatment (to avoid a further manipulation that could itself add to the risks of contamination). The absence of hybridization with the intron probes for the spliced genes U_L123 and U_L22 (Table 2) nevertheless confirms that the RNAzol extracts were free of contamination with viral DNA (Gozlan et al. 1992). This method would therefore seem eminently adaptable to routine laboratory use, especially in view of its rapidity and its automated development process.

We next evaluated the potential contribution of this method to the clinical situation (Table 3). In ten patients receiving renal transplants, 20 tests for the three types of mRNA were carried out on RNA extracts from 10⁶ polymorphonuclear leukocytes, separated from EDTA whole blood using dextran (Poirier-Toulemonde et al. 1997). RNA extraction and PCR were performed as described for AD169

infected fibroblasts. CMV syndrome (leukopenia and/or fever) and CMV disease (syndrome plus thrombocytopenia or CMV pneumonitis or CMV hepatitis), were assessed and followed up, as previously described, in terms of viremia and qualitative leukocyte DNAemia (Imbert-Marcille et al. 1997). pp65-Antigenemia was also tested in eight patients (Gerna et al. 1992). Results were statistically analyzed with the parametric Fisher test to investigate correlation between each CMV test and CMV disease.

In the three patients (1, 2, and 3) not theoretically at risk of developing CMV infection (donor and recipient both being CMV seronegative), the four samples tested with all techniques remained negative (Table 3). Of the other 16 samples (Table 3), 7 of 13 were positive for viremia, 8 of 9 were positive for antigenemia, 13 of 16 were positive for U_L123 mRNA (patients 5 through 10), 9 of 16 were positive for U_L83 mRNA (patients 4, 6, 7, 8, 9, and 10) and 5 of 16 were positive for U_L22 mRNA (patients 7 through 10). Viremia was positive in three symptomatic patients (patients 7, 8, and 10), in one patient without association with CMV-related symptoms (patient 4) and negative in one symptomatic patient (patient 9). There is independence between viremia and CMV disease ($p = 0.486$). Detection of U_L123 mRNA always coincided with both positive

TABLE 3 Comparison of Viremia, pp65 Antigenemia, and DNAemia Detection with mRNA Expression in Polymorphonuclear Leukocytes of Ten Renal Transplant Recipients

No. of Patients (Serologic status/CMV)	Day after Graft	Viremia	Antigenemia ^a	DNAemia (Us8)	mRNA			Clinicals Symptoms ^c
					U _L 123 ^b (IE1)	U _L 83 ^b (pp65)	U _L 22 ^b	
Patient 1 D-/R-	53	-	0	-	-	-	-	None
Patient 2 D-/R-	56	nd	0	-	-	-	-	None
Patient 3 D-/R-	28	-	0	-	-	-	-	None
	35	-	0	-	-	-	-	None
Patient 4 D-/R+	49	-	nd	-	-	+	-	None
	59	+	0	-	-	+	-	None
	69	-	10	-	-	+	-	None
Patient 5 D+/R+	42	-	30	+	+	-	-	I
Patient 6 D-/R+	39	nd	nd	+	+	-	-	None
	49	nd	nd	+	+	+	-	I
	54	nd	nd	+	+	-	-	None
Patient 7 D+/R-	39	+	nd	+	+	-	-	None
	43	+	nd	+	+	+	+	II
	54	+	nd	+	+	-	-	I
Patient 8 D+/R+	49	+	231	+	+	+	+	II
Patient 9 D+/R+	35	-	57	+	+	+	+	II
	49	-	1	+	+	-	-	I
Patient 10 D+/R-	57	+	151	+	+	-	-	I
	69	+	74	+	+	+	+	II
	84	-	3	+	+	+	+	II

^a Antigenemia expressed as number of positive cells/ 2×10^5 polymorphonuclear leukocytes.

^b All specimens were suitable for mRNA analysis since spliced G6PD mRNA was always detected.

^c CMV disease grades: I: syndrome (leukopenia and fever); II: disease = syndrome + thrombocytopenia or CMV pneumonitis or CMV hepatitis.

^d D, donor; R, recipient; nd, not done; -, negative; +, positive.

DNAemia and antigenemia when additionally determined, and was associated either with active infection alone, CMV syndrome, or CMV disease. These findings confirm the equivalent value of the two markers, DNAemia and U_L123 mRNA in the diagnosis of active CMV infection (Parmjeet et al. 1994; Vezling et al. 1994) and underline the limitations of this very early mRNA as a marker of the severity of CMV-related symptoms ($p = 0.076$ for both tests). The presence of detectable U_L83 mRNA seems to correlate with the occurrence of disease in the majority of patients, with the exception of patient 4. For this patient, who was treated with ganciclovir from day 40 after the graft, U_L83 mRNA alone was found, suggesting on these results that it has either a greater detection sensitivity or more prolonged expression. Correlation with CMV disease is also not significant for this parameter ($p = 0.076$).

The finding of late spliced U_L22 mRNA was associated with a positive result for all the other markers tested, except in one case without viremia, and in all cases with the occurrence of CMV disease. Thus

U_L22 mRNA significantly correlates with disease ($p = 0.005$). These results show that our new technique makes it possible to detect this mRNA without recourse to a nested PCR (Nelson et al. 1996) and without having to use more than 40 cycles (Lam et al. 1997). They also confirm results obtained with another late but unspliced mRNA in HIV-seropositive patients (Gozlan et al. 1993) and organ transplant recipients (Gaeta et al. 1997), both of which conclude that the finding of such transcripts is of predictive value with regard to the disease. Finally, our results may confirm the disputed presence of complete virus replication in the polymorphonuclear cells of renal transplant patients (Von Laer et al. 1995). This phenomenon may coexist with the recently proven virus phagocytosis by polymorphonuclear cells (Revello et al. 1998).

The results of this study, which was performed in a limited number of patients, highlights the potential value of testing for spliced U_L22 mRNA, using the method we have developed, as a marker of the occurrence of tissue invasion during active infection.

REFERENCES

- Apairé-Marchais V, Ferre-Aubineau V, Colonna F, Dubois F, Ponge A, Billaudel S (1994) Development of semi-nested PCR for detection of hepatitis A virus in stool in epidemic conditions. *Mol Cell Probes* 8:117-124.
- Arnal C, Ferre-Aubineau V, Besse B, Billaudel S (1998) Simplified reverse transcription polymerase chain reaction procedure with detection by microplate hybridization for routine screening of hepatitis A virus. *Can J Microbiol* 44:298-302.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Ferre-Aubineau V, Imbert-Marcille BM, Raffi F, Besse B, Loirat R, Billaudel S (1995) Colorimetric microtiter plate hybridization assay using monoclonal antibody for detection of an amplified immunodeficiency virus target. *J Virol Methods* 55:145-151.
- Gaeta A, Nazzari C, Angeletti S, Lazzarini M, Mazzei E, Mancini C (1997) Monitoring for cytomegalovirus infection in organ transplant recipients: Analysis of pp65 antigen, DNA and late mRNA in peripheral blood leukocytes. *J Med Virol* 53:189-195.
- Gerna G, Revello MG, Percivalle E, Morini F (1992) Comparison of different immunostaining techniques and techniques and monoclonal antibodies to the lower matrix phosphoprotein (pp65) for optimal quantification of human cytomegalovirus antigenemia. *J Clin Microbiol* 123:1237.
- Gozlan J, Caburet F, Tancrede C, Petit JC (1992) A reverse polymerase chain reaction method for detection of human cytomegalovirus late transcripts in cells infected in vitro. *J Virol Methods* 40:1-10.
- Gozlan J, Salord JM, Chouaid C, Duvivier C, Picard O, Meyohas MC, Petit JC (1993) Human cytomegalovirus (HCMV) late-mRNA detection in peripheral blood of AIDS patients. *J Clin Microbiol* 31:1943-1945.
- Imbert-Marcille BM, Cantarovich D, Ferre-Aubineau V, Richet B, Souillou JP, Billaudel S (1997) Usefulness of DNA viral load quantification for cytomegalovirus disease monitoring in renal and pancreas/renal transplant recipients. *Transplantation* 63:1476-1481.
- Lam KMC, Oldenburg N, Khan MA, Gaylore V, Mikail G, Stouhal PD, Middeldorp JM, Banner N, Yacoub M (1997) Significance of reverse transcription polymerase chain reaction in the detection of human cytomegalovirus gene transcripts in thoracic organ transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 17:555-565.
- Maciejewski JP, Bruening EE, Donahue RE, Morarski ES, Young NS, St-Jeor SC (1992) Infection in hematopoietic progenitor cells by human cytomegalovirus. *Blood* 80:170-178.
- Nelson PN, Rawal BK, Boriskin YS, Mathers KE, Powles RL, Steel HM, Tryhorn YS, Butcher PD, Booth JC (1996) A polymerase chain reaction to detect a spliced late transcript of human cytomegalovirus in blood of bone marrow transplant recipients. *J Virol Methods* 56:139-148.
- Parmjeet RS, Manez R, Frye B, Ehrlich GD (1994) Circulating immediate-early mRNA in patients with cytomegalovirus infections after solid organ transplantation. *J Infect Dis* 170:1264-1267.
- Poirier-Toulemonde AS, Imbert-Marcille BM, Ferre-Aubineau V, Besse B, Le Roux MG, Cantarovich D, Billaudel S (1997) Successful quantification of cytomegalovirus DNA competitive PCR and capillary electrophoresis. *Mol Cell Probes* 11:11-23.
- Revello MG, Percivalle E, Di Matteo A, Morini F, Gerna G (1992) Nuclear expression of the lower matrix protein of human cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes of immunocompromised viraemic patients. *J Gen Virol* 73:437-442.
- Revello MG, Percivalle E, Arbustini E, Pardi R, Sozzani S, Gerna G (1998) In vitro generation of human cytomegalovirus pp65 antigenemia, viremia, and leukoDNAemia. *J Clin Invest* 12:2686-2692.
- Ruger B, Klagues S, Walla B, Albrecht J, Fleckenstein B, Tomlinson P, Barrell B (1987) Primary structure and transcription of the genes coding for the two virion phosphoproteins pp65 and pp71 of human cytomegalovirus. *J Virol* 61:446-453.
- Soderberg C, Larsson S, Bergstedt-Lindqvist S, Moller E (1993) Definition of a subset of human peripheral blood mononuclear cells that are permissive to human cytomegalovirus infection. *J Virol* 67:3166-3175.
- Vezling J, Robtharth PH, Kroes AC, Quint WG (1994) Detection of cytomegalovirus mRNA and DNA encoding the immediate early gene in peripheral blood leukocytes from immunocompromised patients. *J Med Virol* 42:164-169.
- Von Laer D, Serr A, Meyer-Konig U, Kirste G, Huffert FT, Haller O (1995) Human cytomegalovirus immediate early and late transcripts are expressed in all major leukocyte populations in vivo. *J Infect Dis* 172:365-370.

1.2.1- Commentaires Article n°1

La première étape a visé à sélectionner les gènes cibles de la RT-PCR, avec pour objectif de détecter de façon spécifique et sensible un transcrit d'un gène précoce et au moins un transcrit d'un gène tardif, seuls témoins d'une répllication complète. Pour assurer une spécificité optimale, les critères idéaux de sélection des gènes du virus étaient que leur transcrits soient issus d'un épissage (distinction facile entre l'amplification de l'ADN et de l'ARNm) et qu'ils codent pour une protéine connue. Le gène UL123 codant pour la protéine très précoce IE1 (Akriegg et al., 1985) remplissant ces deux conditions a été choisi. Pour la mise au point de la RT-PCR du transcrit tardif, deux gènes ont été sélectionnés : UL22 (encore dénommé dans la littérature R27080s (Rawlinson and Barrell, 1993), ou UL21.5 (Bresnahan and Shenk, 2000)) et UL83. Le gène UL83 de la protéine majoritaire du tégument pp65 présentait l'inconvénient, comme la grande majorité des gènes tardifs des Herpesvirus, d'être dépourvu d'intron (Gozlan et al., 1992). Le gène tardif UL22 de découverte beaucoup plus récente (Rawlinson and Barrell, 1993), dont la protéine n'était alors pas connue, présentait l'avantage de posséder un intron de 83 pb dans sa structure. Pour constituer à la fois un témoin d'extraction (exprimé dans toutes les cellules humaines) et de transcription inverse efficace, le transcrit épissé du gène de la Glucose-6-Phosphate-Deshydrogénase (G6PD) humaine a été utilisé (Soderberg et al., 1993).

Les extractions des ARN totaux ont été conduites selon la méthode RNAlplus®, précédemment validée au sein du laboratoire pour la détection de l'ARN génomique du virus de l'hépatite A (Apaire-Marchais et al., 1994; Arnal et al., 1998). Cette méthode, dérivée de celle de Chomczynski (Chomczynski and Sacchi, 1987), est relativement simple, permettant en théorie une extraction sélective des ARNs ne laissant pas de trace d'ADN (Gozlan et al., 1992).

Des témoins ont été préparés en réalisant des extraits d'acides nucléiques à partir de fibroblastes infectés. Les RT-PCR ont toutes été développées en deux étapes en utilisant soit l'amorce oligo (dt) soit l'amorce anti-sens. Pour l'étape de transcription inverse, l'utilisation de l'oligo dt pour les gènes IE1 et G6PD présentait l'avantage d'effectuer une seule réaction de synthèse d'ADNc pour rechercher deux messagers. Ce système n'était pas souhaitable pour le transcrit de UL83 en raison du partage de son signal de polyadénylation de son gène avec celui du gène UL82 (pp71) situé en aval qui aboutirait à la transcription d'un gène de 4 kb (Ruger et al., 1987). Pour les gènes tardifs, les transcriptions inverses ont donc été réalisées à

l'aide de l'amorce anti-sens de chaque couple d'oligonucléotides nécessitant donc deux RT différentes, mais autorisant théoriquement une augmentation de la sensibilité (Kawasaki, 1990). Le recours aux techniques de nested-PCR, très souvent décrite dans la littérature pour amplifier des transcrits, (Nelson and Demmler, 1997; Soderberg et al., 1993) n'a pas été envisagé dans un premier temps. L'objectif étant d'utiliser facilement ces techniques en routine au laboratoire, il convenait donc de limiter au maximum les risques de contamination par des produits d'amplification. Nous avons préféré faire le choix d'amorces longues (entre 35 et 40 bases) pour assurer une plus grande spécificité et autoriser un grand nombre de cycles d'amplification : 40 cycles (Arnal et al., 1998). Le deuxième aspect pour assurer une grande sensibilité a été d'optimiser chacune des RT-PCR. Leurs mises au point ont été effectuées sur des fibroblastes, seul modèle *in vitro* de cellules permissives au virus, en les inoculant avec des souches de référence (la souche AD169 n°ATCC VR977 et la souche TOWNE) pour lesquelles nous avons préparé des stocks de virus titrés.

Après avoir réalisé pour chaque RT-PCR une technique d'hybridation sur membrane afin de confirmer la spécificité de l'amplification, nous avons développé une méthode d'hybridation avec révélation immunoenzymatique en microplaque, rapide et plus simple. Les essais d'hybridation croisée, avec les sondes situées dans la zone exonique (ADN et ARN) ou intronique (ADN), entre produits d'amplification ADN ou ARN des transcrits épissés UL123 et UL22 des témoins, ont permis de conclure à la spécificité des produits d'amplification obtenus. La méthodologie ainsi développée, de part sa relative facilité de réalisation, est apparue compatible avec une utilisation en routine.

La dernière étape de ce premier travail a visé à évaluer l'apport potentiel de la recherche des transcrits, en particulier ceux exprimés tardivement dans les leucocytes du sang périphérique de patients immunodéprimés. Quelques études précédemment publiées avaient montré un lien entre la présence de transcrits tardifs dans les leucocytes et la survenue d'une maladie grave à CMVH chez des patients sidéens ou transplantés (Gaeta et al., 1997; Gozlan et al., 1996; Nelson et al., 1996). L'évaluation préliminaire a été réalisée à partir de 20 échantillons sanguins périphériques de 10 patients greffés rénaux ayant bénéficié d'un suivi par plusieurs marqueurs. Les résultats des RT-PCR comparés aux méthodes classiques de suivi de l'infection (virémie, ADNémie, antigénémie) ont apporté les informations suivantes. La présence d'ARNm UL123 très précoce, est bien corrélée à l'infection active, définie par une ADNémie leucocytaire positive (Meyer-Konig et al., 1995; Randhawa et al., 1994). Elle est cependant peu prédictive de la survenue d'une maladie à CMVH, ce qui illustre parfaitement son caractère d'expression précoce au cours du cycle, en particulier lors des infections non

productives (Taylor-Wiedeman et al., 1994) . La valeur de l'ARNm UL83, même si sa présence était bien corrélée avec la maladie pour la majorité des patients, nous est apparu plus discutable. Sa détection chez un patient traité par ganciclovir et chez lequel les autres marqueurs s'étaient négativés, suggérait son expression prolongée et constituait une limite à son utilisation en diagnostic d'infection active. De plus ce choix d'un transcrit non épissé ne permettait pas d'écarter la possibilité d'une contamination par de l'ADN génomique, en dépit de contrôles sur le modèle *in vitro* avec les transcrits épissés plutôt en défaveur d'une contamination intercurrente. Enfin, les résultats préliminaires obtenus avec l'ARNm UL22, sans avoir recours à une nested-PCR (Nelson et al., 1996) et en évitant un trop grand nombre de cycles d'amplification (Lam et al., 1998), ont démontré son intérêt comme marqueur prédictif d'une atteinte tissulaire. Ces résultats, dans le cadre du diagnostic clinico-biologique, sont en accord avec ceux obtenus avec le transcrit non épissé de la MCP du virus chez des patients VIH ou des greffés d'organe solide (Gozlan et al., 1996) (Gaeta et al., 1997).

Enfin, sur un plan plus fondamental, nos travaux ont conduit à tenter d'expliquer la présence de transcrits tardifs du virus au sein des polynucléaires. Même si une contamination par des cellules mononucléées ne peut être totalement exclue lors de la réalisation de dextran, notre expérience en cytométrie en flux et celle d'autres équipes (Gaeta et al., 1997; Gerna et al., 1992; Revello et al., 1998) témoignent de la qualité de la technique pour isoler les polynucléaires avec une pureté >95%. Dès lors, nos résultats obtenus sans avoir recours à la nested-PCR, sont peu compatibles avec la détection de transcrits produit dans des macrophages ou cellules endothéliales contaminantes. L'hypothèse alors la plus probable, en fonction des données de la littérature disponibles à cette période, était celle de la réalisation d'un cycle de multiplication complet du CMVH au sein des polynucléaires, confirmant les études d'autres groupes (Dankner et al., 1990; Gaeta et al., 1997; Gozlan et al., 1993; von Laer et al., 1995b).

1.3 Marqueurs moléculaires et antigéniques de l'HHV6

Ce deuxième article présente les travaux initiés en 1999, visant à disposer de moyens d'investigation de la multiplication de l'HHV6.

L'expérience acquise en matière d'évaluation de la réplication du CMVH (Andre et al., 1999) a facilité un développement rapide de marqueurs complémentaires, tout en intégrant de nouvelles techniques aux performances accrues. Dans un premier temps, il a été nécessaire d'acquérir la maîtrise de la délicate culture de l'HHV6, alors très peu développée au sein du laboratoire. Ceci a permis d'entreprendre ensuite la mise au point de techniques de RT-PCR à la recherche de transcrits de l'HHV6 et de détection d'antigènes tardifs viraux par cytométrie en flux. Ce dernier développement a bénéficié de l'expérience méthodologique de l'équipe, acquise lors d'étude menées sur le CMVH (Imbert-Marcille et al., 1997a) et le virus d'Epstein-Barr (Imbert-Marcille et al., 2000a)

1.3.1 Article n°2

Développement d'une technique de RT-PCR, en une seule étape, et d'une méthode de cytométrie en flux comme marqueurs spécifiques de l'évaluation de la réplication de l'Herpes humain de type 6.

"A one-step RT-PCR and a flow cytometry method as two specific tools for direct evaluation of human herpesvirus-6 replication."

E. Andre-Garnier, N. Robillard, M. Costa-Mattioli, B. Besse, S. Billaudel and B.M. Imbert-Marcille. Journal of Virological Methods 108 (2003) 213-222.

A one-step RT-PCR and a flow cytometry method as two specific tools for direct evaluation of human herpesvirus-6 replication

E. Andre-Garnier^a, N. Robillard^b, M. Costa-Mattioli^{a,b,c}, B. Besse^a, S. Billaudel^a,
B.-M. Imbert-Marcille^{a,*}

^a Virology Laboratory EA-1156, Institute of Biology, Nantes University Hospital, 9 quai Moncousu, F-44093 Nantes cedex, France

^b Flow Cytometry Department, Institute of Biology, Nantes University Hospital, 9 quai Moncousu, F-44093 Nantes cedex, France

^c Department of Biochemistry, McGill University, McIntyre Medical Building, Montreal, Quebec, Canada H3A2K6

Received 3 October 2002; received in revised form 12 December 2002; accepted 13 December 2002

Abstract

In order to confirm the occurrence of active Human herpesvirus-6 (HHV-6) infection, two optimal procedures were developed to detect directly replicating virus. MT4 cells and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) infected with two different strains (HST and a patient strain GUI) were used. The first method consisted of a one-step reverse transcription PCR amplifying a part of the late alternatively spliced U100 gene which encode the gp 82–105 viral glycoprotein. Two extraction methods and two RT-PCR kits were evaluated, leading to the selection of TaKaRa mRNA selective PCR kit. The second procedure consisted in a flow cytometry method to analyze the expression of two late viral HHV-6 antigens using 7C7 and 10G6 monoclonal antibodies. Four fixation permeabilization procedures were compared and the preparation of cells with paraformaldehyde (PFA) 4% was found to be optimal. Evaluation of these methods was then realized during a sequential culture of HST strain on MT4 cells. This kinetic study confirmed that Mabs recognized late antigens and demonstrate that the U100 gene splicing starts at a late stage of multiplication whereas unspliced forms are detectable earlier in the cycle.

© 2003 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: HHV-6; Replication; RT-PCR; Cytometry

1. Introduction

Human herpesvirus-6 (HHV-6) was first isolated from immunocompromised patients with lymphoproliferative disorders (Salahuddin et al., 1986). HHV-6 is divided into two subgroups, HHV-6A and HHV-6B, on the basis of reactivity with monoclonal antibodies HHV-6 specific T-cell clones and restriction enzyme cleavage patterns (Ablashi et al., 1991). Variant B is predominant. HHV-6 is thought to infect most individuals at an early age, and persists throughout life, like other HHVs. HHV-6 is a causative agent of exanthem subitum (Yamanishi et al., 1988). Reactivations of HHV-6 occur in patients with impaired cellular immune response,

leading to a variety of direct and indirect effects. Such consequences have been studied, for the main part, in patients receiving allogeneic or autologous hematopoietic stem cell transplantation (Dockrell and Paya, 2001). Active HHV-6 infection is associated with pneumonitis, encephalitis, cutaneous rashes and myelosuppressive effect (Imbert-Marcille et al., 2000b; Yoshikawa et al., 2002). Evaluations carried out on solid organ transplant recipients produced more conflicting data: active infection was associated, particularly in liver transplant recipients, with hyperthermia, acute rejection episodes and the development of opportunistic infections, e.g. fungal invasive disease, HHV-7 and CMV active infections (Caserta et al., 2001; Humar et al., 2002). Discrepancies observed between studies may be attributable to the methods used for detecting active infection. Among these, serology often lacks sensitivity in immunocompromised patients and virus culture is difficult to adapt for routine laboratory use. Most studies use

* Corresponding author. Tel.: +33-2-4008-4123; fax: +33-2-4008-4139.

E-mail address: bmimbert@sante.univ-nantes.fr (B.-M. Imbert-Marcille).

home-made qualitative PCR to detect viral DNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), which are known to represent the main target of both latent and replicating virus (Dockrell and Paya, 2001). Qualitative PCR, according to the sensitivity of the test, may detect the latent genome. To overcome such limits, there is clearly a need to use a more specific test, which could be more reliable for assessing the detection of true active infection. Some authors propose the use of quantitative PCR or the detection of viral DNA in plasma (Gautheret-Dejean et al., 2002). Other methods, adapted previously with success for CMV, consist of detecting the products of the transcription or of the translation of late viral genes, which assess directly the occurrence of a complete multiplication cycle (Andre et al., 1999).

The aim of this study was to develop two complementary methodologies to detect replicating virus in PBMCs and in MT4 cell line. The first is an original reverse transcription PCR allowing selective detection of mRNA from the late alternatively spliced U100 gene encoding the viral envelope glycoprotein gp 82–105 (Pfeiffer et al., 1993). The second consists of the detection of two other late viral HHV-6 antigens by flow cytometry, using specific monoclonal antibodies (Robert et al., 1998). Subsequent evaluation of these two methods on a sequential culture of HHV-6 strain confirmed their late pattern of expression. U100 gene splicing begins at the late phase of multiplication, whereas unspliced forms are detectable at all stages of the cycle.

2. Materials and methods

2.1. Virus culture

2.1.1. Cell culture

PBMCs, obtained from healthy subjects purified through ficoll gradient centrifugation, were stimulated first with 1 µg/ml PHA for 48 h and cultured subsequently at 2×10^6 cells per ml in RPMI-1640 medium (Life technologies, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% heat inactivated fetal calf serum and antibiotics (penicillin 10^3 U/ml, colymicin 2500 U/ml, streptomycin 10 mg/ml) and interleukin 2 (20 UI/ml). Cells were maintained at 37 °C in a 5% CO₂ incubator. The medium was replaced every 4 days and 5×10^5 cells were added once a week.

The MT4 cell line derived from a patient with a HTLV transformed T cell leukaemia (Miyoshi et al., 1982). They were cultivated at 10^6 cells per ml in RPMI-1640 medium (Life technologies) supplemented with 10% heat inactivated fetal calf serum and antibiotics (penicillin 10^3 U/ml, colymicin 2500 U/ml, streptomycin 10 mg/ml) at 37 °C in 5% CO₂. The medium was

changed every 4 days and cell concentration was adjusted to 10^6 cells per ml.

2.1.2. Viral cultures

Two HHV-6B strains were used: the reference Japanese HST strain and the GUI strain, isolated in our laboratory from PBMCs obtained from a 3-year old immunosuppressed patient with active HHV-6 infection. Both strains were cultivated on PBMCs and then adapted for growth on MT4 cell line. The virus was recovered from culture supernatants and stored at –80 °C until use. HST virus stocks were obtained from infected MT4 cells and titrated by end point dilution using 10-fold serial dilutions and quadruplicate assays per dilution (Robert et al., 1996). The observation of cytopathic effect allowed the calculation of TCID₅₀ value (50% tissue infection dose) according to the Reed and Muench method. Viral stocks attained up to 10^5 TCID₅₀ per ml.

2.1.3. Kinetic HST multiplication

MT4 cells were infected with HST at a low multiplicity of 0.03MOI. After 2 h of incubation at 37 °C in the presence of 5% CO₂, cells were resuspended in culture medium at a final concentration of 10^6 cells per ml and grown at 37 °C in 5% CO₂. At each stage of the follow-up (0, 2, 7, 24, 48, 72 h post infection (pi) and 4, 5, 7, 8 days pi), cultures were observed for cytopathic effects and 2×10^6 cells were harvested for subsequent determination of DNA by PCR, mRNA by RT-PCR and antigens by flow cytometry.

2.2. Molecular biology

2.2.1. Primers and probes

Primers and biotinylated probes were synthesized by Genosys (Sigma, Genosys, London, England). Degenerated primers (P1 and P2) were designed on U100 gene, allowing amplification of both A and B variants in a region spanning a site of alternative splicing (Pfeiffer et al., 1995) (Table 1). Two biotinylated probes were also used to assess specific discrimination between spliced mRNA (S1) and unspliced mRNA or DNA (S2) (Table 2).

2.2.2. DNA extraction and amplification

DNA was extracted from 5×10^5 cells using the QIAamp® viral DNA extraction kit (QIAGEN, Chatsworth, CA) following instructions provided by the manufacturer. Purified DNA was eluted in a final volume of 200 µl and stored at –80 °C.

The PCR mix consisted of 2.5 µl $10 \times$ buffer, 2 mM MgCl₂, 200 µM of each dNTP, 1 µM of each primer, 0.625 U Taq polymerase (Promega, Carboneière, France) and 4 µl of DNA extract. After one 5 min cycle at 94 °C, 35 cycles were run as follows: 30 s at 94 °C,

Table 1
Primers used for RT-PCR of U100 gene and splice junction site

Name	Position	Séquence degenerated primers	Splice junction
PE1	HHV-6B: 151173–151195 ^a	5'GGACAAAAGCTATCGCCGTCAT3' 5'GGACA[R]AAGCTATCGCCGTCAT3'	151396–151528
	HHV-6A: 1030–1008 ^b	5'GGACAGAAGCTATCGCCGTCAT3'	
PE2	HHV-6B: 151601–151579 ^a	5'AGAAGACATCCTGAACTACGCCA3' 5'AG[M]AGAC[M]TCCTGAACTACGCC[R]3'	151396–151528
	HHV-6A: 734–756 ^b	5'AGCAGACCTCCTGAACTACGCCG3'	

[R]: A and G; [M]: A and C.

^a Nucleotide positions based on HHV-6B (HST) strain genome (Isegawa et al., 1999) Genbank access no. AB021506.

^b Nucleotide positions based on the HHV-6A mRNA gp 82–105 (Pfeiffer et al., 1995) Genbank access no. U23467.

40 s at 58 °C, 95 s at 72 °C and a final elongation during 5 min at 72 °C (one cycle).

2.3. RNA extraction and amplification

2.3.1. Extraction

Two commercially available RNA extraction methods were evaluated on pellets of 10⁶ cells pellets, technical procedures were carried out as specified by the manufacturer.

Using the RNA-PLUSTM system (Bioprobe Systems, Montreuil-sous-bois, France), based on the method of Chomczynski and Sacchi (1987), cells were mixed with 1 ml of RNA-PLUSTM and extracted with 200 µl chloroform. The RNA containing aqueous phase was precipitated with 500 µl isopropanol and 20 µg glycogen (Boehringer, Mannheim, Germany). The RNA pellet was washed with 75% ethanol, then resuspended in 40 µl sterile de ionized water with 2 µl RNasin (Promega) and stored at –80 °C.

Using a QIAamp viral RNeasy[®] extraction kit (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France), cells were first resuspended in 350 µl lyse buffer and ethanol 70%. Then the samples were treated on silica-gel-based membranes according to manufacturer recommendations. During the extraction, the easy RNase-free DNase set protocol (Qiagen S.A.), was applied to the column (during 30 min at 37 °C). Purified RNA was eluted in a final volume of 50 µl DNA water free. Aliquots were stored at –80 °C with 2 µl of RNasin.

2.3.2. Amplification

Two commercially available one-step RT-PCR systems were evaluated, technical procedures were undertaken as specified by the manufacturer.

SuperscriptTM one-step RT-PCR using platinum[®] taq (Invitrogen, Life technologies). RT-PCR was carried out in a volume of 25 µl including 4 µl RNA extract 0.5 µM of PE1 and PE2, 12.5 µl 2 × buffer, 1 µl of RT/Platinum taq mix. Amplification conditions were 45 min reverse transcription at 50 °C, denaturation for 5 min at 94 °C and then 40 amplification cycles (94 °C for 30 s, 67 °C for 30 s and 72 °C for 60 s). Finally a 5 min extension cycle at 72 °C was performed.

A specific system for the amplification mRNA was also used: mRNA selective PCR kit (AMV) (TakaRa-Biomedicals distributed by Biowhittaker, Europe). It was composed for a total volume of 25 of 12.5 µl 2X buffer II, 5 mM MgCl₂, 0.5 µM of PE1 et PE2, 1 mM of each dNTPs, 0.4 U of RNasin (40 U/µl), 0.5 U of AMV Rtas XL (5 U/µl) and 0.5 U of AMV-Optimized taq. The RT-amplification was carried out as follows: 30 min at 50 °C for the reverse transcription, denaturation for 5 min at 85 °C and then a succession of 40 cycles as follows: 30 s at 85 °C, 40 s at 65 °C, and 90 s at 72 °C. Amplification took place after 5 min at 72 °C.

Both methods were evaluated directly on RNA extracts or after denaturation (10 min at 65 °C). Influence of the T4 gene 32 protein (Amersham Pharmacia Biotech, Orsay France) addition (2 µg by amplification reaction) was also tested.

Table 2
Probes used for RT-PCR amplification products of U100 gene

Name	Genome position	Sequence probes	Target
S1	Variant B ^a : 151529–151544/151391–151394 Variant A ^b : 797–812	5'CAGAGGCACGCATCAT/GTTC3'	cDNA
S2	Variant B ^a : 151442–151458	5'GTTATCTCGGCGGATTC3'	DNA

^a Nucleotide positions based on HHV6-B (HST) strain genome (Isegawa et al., 1999) Genbank access no. AB021506.1.

^b Nucleotide positions based on the HHV6-A mRNA gp 82–105 (Pfeiffer et al., 1995) Genbank access no. U23467.

2.3.3. Analysis of PCR products

Aliquots (5 µl) of PCR and RT-PCR products were analyzed by electrophoresis on a 9% polyacrylamid gel (37.5–1) in TBE buffer at 130 V for 1 h. The amplified DNA fragments were visualized following staining with ethidium bromide using a UV transilluminator. Sizes of fragments (296 bp for cDNA, 397 or 429 bp for DNA from strain A or B, respectively) were determined by comparison with DNA molecular weight marker V (Roche, Meylan, France).

Specificity of amplification was assessed by colorimetric plate hybridization, using GEN-ETI-K™ (Diasorin, Sulluggia, Italy) (Ferre-Aubineau et al., 1995). Briefly, each of the S1 and S2 biotinylated probes were diluted at 10 ng/ml final concentration in the hybridization buffer. One hundred microliter of each solution was immobilized on a streptavidin-coated microtiter plate and 5 µl of denatured RT-PCR products (95 °C 10 min) were incubated for 1 h at 50 °C. After five washings, 100 µl of standard monoclonal antibody preparation (Anti-dsDNA) was added to each well. After washings, staining was shown by an enzyme tracer-solution. Finally, after washings, peroxidase activity was visualized by colorimetric reaction (positivity cut off 0.4)

2.4. Flow cytometry

2.4.1. Monoclonal antibodies

Two Mabs 7C7 and 10G6 (Argene Biosoft, Varilhles France), IgG1 isotype, reacting both with variant A or B strains, were used for the detection of the HHV-6 antigen expression (Robert et al., 1998). 7C7 MAb detected a nuclear pair of 109 and 116 kDa proteins corresponding to a nuclear complex, the target of 10G6 is unknown. Fluorescein isothiocyanate (Fab')₂ goat anti-mouse IgG (Bioatlantic, Nantes, France) was used as secondary antibody. Isotype IgG1 (Catlab/Tebu, Marnes la Coquette, France) was used as control.

2.4.2. Fixation and permeabilization

Four procedures for fixation and permeabilization of cells were evaluated, all performed on aliquots of 5×10^5 cells.

Paraformaldehyde–methanol (PFA/M) and Paraformaldehyde–Tween 20 (PFA/T) methods were performed as previously described for CMV (Imbert-Marcille et al., 1997) and EBV (Imbert-Marcille et al., 2000a). Briefly, aliquots were incubated for 15 min in 1% paraformaldehyde (PFA) (Merck, Nogent-sur-Marne, France), washed, and then kept at least 1 h in 80% methanol at –20 °C or incubated overnight at 4 °C in 1% PFA supplemented with 0.2% Tween 20 (Sigma–Aldrich, St Quentin Fallavier, France).

The third method was available commercially: Intraprep (Immunotech/Coulter, Marseille, France) and manufactory recommendations were followed.

The last method used PFA 4% alone (Manichanh et al., 2000). Cells were collected and washed with a phosphate buffer saline (PBS) and fixed with PBS containing 4% PFA during 15 min at room temperature.

2.4.3. Staining of cultured cells

Fixed and permeabilized cells were washed in PBS and incubated for 1 h at 37 °C with a saturating amount (1–5 µg) of each anti HHV-6 Mab or IgG1 isotype control. The cells were then washed and incubated for 30 min at 4 °C with FITC-F(ab')₂ goat anti-mouse IgG (Bioatlantic, Nantes, France) diluted at 1/100. All steps involving incubation were performed in media supplemented with 20% human AB serum to limit non-specific labeling. Incubation media varied according to the procedure used to prepare the cells: they were, respectively, PBS for the PF 4% and PF/M methods, PBS supplemented with 0.2% Tween 20 for PF/T method, and the reagents provided in the kit for the Intraprep method as specified by the manufacturers. Mock-infected cells and infected cells incubated with isotype IgG1 were used as negative controls

2.4.4. Flow cytometry analysis

Samples were analyzed on a FACS calibur flow cytometer (Becton Dickinson, Mountain view, Calif.). At least 10 000 cells were gated by light scattering and collected in a list mode manner. Percentages of cells expressing HHV-6 antigens and mean fluorescence intensity were determined on FITC histogramms or dot blots, using a region defined according to the isotype control analysis.

3. Results

3.1. The development of a technical procedure to detect U100 mRNA

The method consisted of the choice of an adequate extraction and amplification procedure, allowing a sensitive and totally specific detection of mRNA, without any amplification of DNA targets which could interfere by giving false positive results for the detection of unspliced transcripts. Assays were performed on RNA extract (pure or diluted in sterile water) from 10^6 PBMCs infected with HST strain (control 1) and/or GUI strain (control 2), with a 30% cytopathic effect. RNA extracts of mock PBMCs were used as negative control. All assays were run in duplicate, in two independent experiments.

The first step was a comparison between RNA-PLUS™ method and Quiagen. Extractions were performed on control 1 and amplifications were run using Superscript® kit on 10-fold dilutions of RNA extracts. Both methods gave similar results, with a positive signal

Table 3

Results of DEIA hybridization performed on RT-PCR and PCR amplification products of HST-infected PBMCs RNA extracts

Extraction technique	Amplification	Probe	Mean OD ₄₅₀ values after hybridization				
			RNA extracts dilutions				
			Undiluted	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
RNA plus®	RT-PCR	S1 ^a	> 3.5	> 3.5	2.6	1.5	< 0.4
	PCR	S2 ^b	2.5	1.8	0.7	0.5	< 0.4
Qiagen	RT-PCR	S1 ^a	> 3.5	> 3.5	2.6	1.5	< 0.4
	PCR	S2 ^b	< 0.4	< 0.4	< 0.4	< 0.4	< 0.4

^a Probe specific of spliced U100 mRNA.^b Probe specific of U100 DNA and U100 unspliced mRNA.

obtained for 10⁻³ dilution of extracts (Table 3). On extracts obtained with the RNA-PLUSTM method, DNA amplification was detected by hybridization with the S2 probe for all dilutions except 10⁻⁴, whereas no residual DNA was amplified from extracts prepared with the Quiagen method, including non diluted extract (Table 3). This extraction method was thus selected for subsequent assays.

The second step consisted of increasing the sensitivity of amplification. The two RT-PCR kit, mRNA selective PCR kit TakaRa and the classical RT-PCR system SuperscriptTM, were performed in parallel on 10⁻³ and 10⁻⁴ dilution of RNA-PLUSTM extract obtained from control 1 and 2. Using SuperscriptTM system, no amplification signal was obtained on 10⁻⁴ dilutions of both controls, whereas 10⁻³ dilutions were amplified. Prior RNA denaturation (10 min at 65 °C) or T4 gen 32 protein addition did not improved sensitivity. Conversely, 10⁻⁴ dilutions of both controls were amplified using TakaRa, when T4 gene 32 protein was added in the mix. Prior RNA denaturation did not increase sensitivity (data not shown).

Selective and sensitive detection of U100 mRNA was, therefore, achieved using TakaRa system and T4 gene protein, on RNA extracted with Quiagen method. This procedure was thus selected for subsequent evaluations.

3.2. Development of procedure to detect HHV-6 antigens by flow cytometry

Assays were undertaken on MT4 or PBMCs infected with HST strain or GUI strain. Cultures were harvested for cytometry when cytopathic effect reached between 20 and 30% of cells and aliquots of 5.10⁵ cells were prepared.

Adequate concentrations of the two MAb 7C7 and 10G6 were determined on HST-infected MT4 cells prepared with PFA 4%: the optimal quantities for 5 × 10⁵ cells were 2 µg for 7C7 Mab and 1 µg for 10G6 Mab, respectively (data not shown).

Four protocols for the fixation and permeabilization of cells were then compared by running them in parallel

on GUI infected MT4 cells. Levels of antigen expression were first assessed with the 2 µg 7C7 Mab (Fig. 1). The four methods gave similar results when only percentages of cells expressing 7C7 related Ag were observed (from 27 to 32.5%). Comparison of mean fluorescence intensities were more informative, especially for cells prepared with PFA 4%, leading to high fluorescence intensity and thus allowing the best discrimination between positive and negative cells. These observations were confirmed with HST-infected MT4 cells and for 10G6 Mab, and PFA 4% was selected as the best procedure to prepare cells.

Experiments were then carried out on HST-infected PBMCs, to assess the feasibility of the method to detect antigen directly on PBMCs from patients with active infection. A positive staining was obtained after incubation of HST-infected PBMCs with 7C7 or 10G6 Mab, producing mean fluorescence intensities ranging in the same level as those observed for MT4 infected cells. No nonspecific labeling occurred. The stability of antigen expression was also evaluated on HST MT4 infected cells prepared with PFA 4% and conserved at 4 °C during 8 days. No modification of antigen expression level was noted. This demonstrates the possibility of delaying staining with Mab, which may be interesting for an application in routine laboratory use.

3.3. Evaluation of technique performance

In order to verify the performance of the methods developed and to determine the time course of transcription and translation of the selected late genes, MT4 cells were infected with HST and evaluated at different times pi, for DNA, U100 mRNA and antigens (Table 4). Uninfected MT4 cells served as negative controls.

U100 DNA was detected by PCR as soon as HST was added to cultures, whereas no amplification was observed in uninfected MT4 (Fig. 2a).

U100 mRNA was detected as unspliced form from 7 h to 8 days pi (Fig. 2b). Effectively spliced transcripts were not detected in the first 48 h after infection, and were associated afterwards with the co-expression of un-

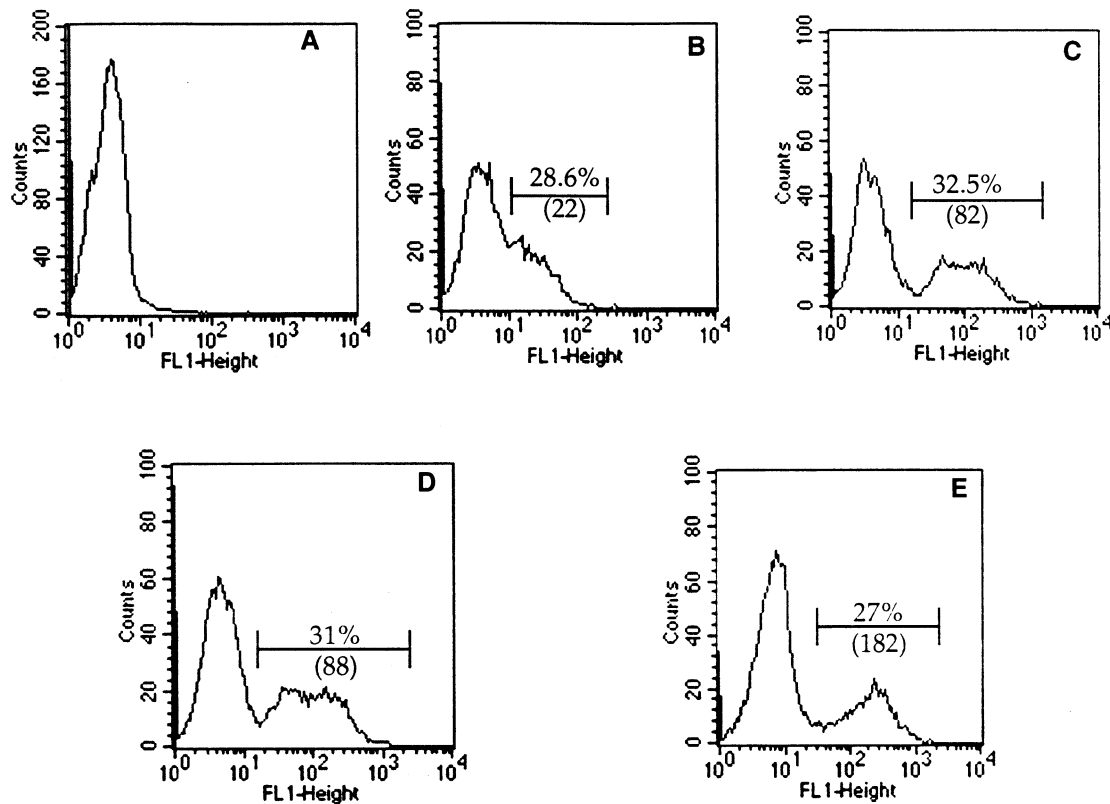


Fig. 1. Fluorescence histograms of MT4 infected with GUI strain, prepared with different fixation/permeabilization methods and stained with 7C7 Mab. A, IgG1 isotype control; B, cells prepared with PFA/M; C, cells prepared with Intraprep; D, cells prepared with PFA/T; E, cells prepared with 4% PFA. Percentage identified cells expressing 7C7-related antigen, mean fluorescence intensities are presented in brackets, the bars represent the proportion of positive cells.

spliced form until the end of the follow-up. Specificity of amplification was assessed by hybridization (Table 4). No mRNA was amplified from extracts of mock-infected cells and HST titrated supernatant used for

the infection. Moreover, the absence of mRNA detection on extracts from cells harvested at 2 h pi whereas DNA was amplified, demonstrates the specificity of our RT-PCR method.

Table 4
Kinetic of HST multiplication on infected MT4 cells

Identification sample	Time pi	Cytopathic effect ^a	DNA U100 ^b	Transcripts U100 OD ₄₅₀ values after hybridization ^c		Antigenemia by flow cytometry ^d	
				S2: unspliced	S1: spliced	10G6 mab	7C7 mab
No. 0	<i>t</i> = 0 h	No	—	< 0.4	< 0.4	< 0.5	< 0.5
No. 1	<i>t</i> = 2 h	No	+	< 0.4	< 0.4	< 0.5	< 0.5
No. 2	<i>t</i> = 7 h	No	+	2.7	< 0.4	< 0.5	< 0.5
No. 3	<i>t</i> = 24 h	No	+	3.2	< 0.4	< 0.5	< 0.5
No. 4	<i>t</i> = 48 h	No	+	3.4	3.2	< 0.5	3(100)
No. 5	<i>t</i> = 72 h	< 10%	+	3.6	3.4	4.5 (101)	9 (140)
No. 6	<i>t</i> = 4 d	5–10%	+	3.4	3.3	8 (110)	11 (150)
No. 7	<i>t</i> = 5 d	5–10%	+	3.3	3.3	15 (120)	16 (145)
No. 8	<i>t</i> = 7 d	15–20%	+	3.3	3.2	19 (140)	18 (160)
No. 9	<i>t</i> = 8 d	15–20%	+	3.3	3.3	23 (170)	25 (165)

pi, Post infection; h, hours; d, day.

^a Percentage of cells demonstrating a cytopathic effect.

^b —, Negative; +, positive.

^c positiv cut off = 0.4.

^d Expressed as the percentage of positive cells after deducting relative isotype control data (mean fluorescence intensity).

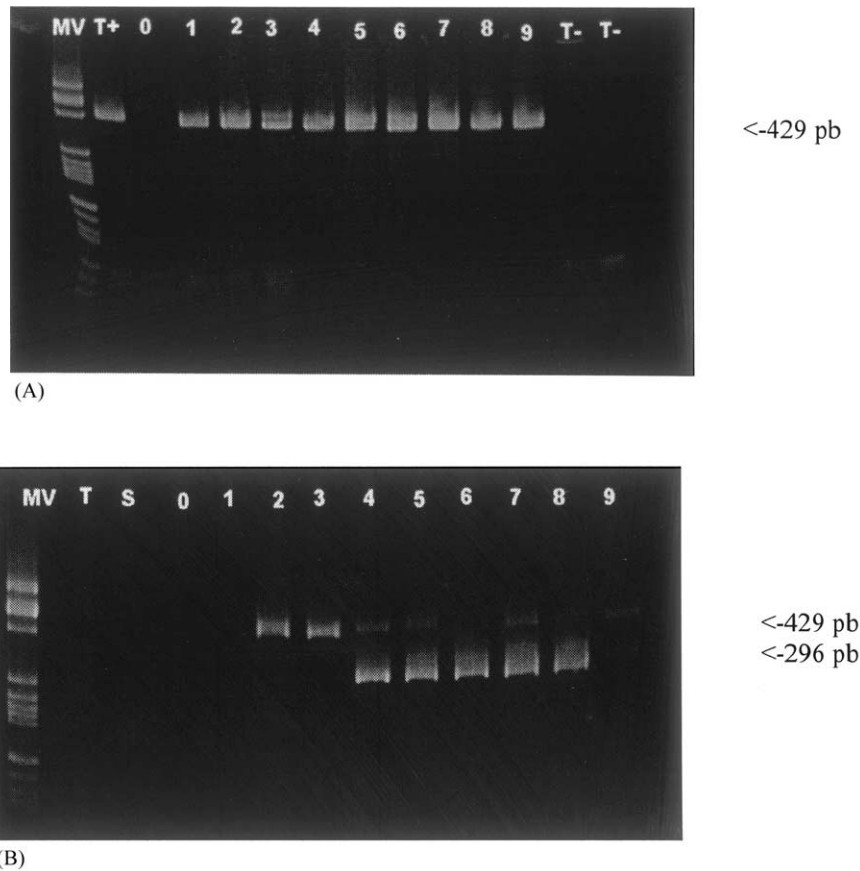


Fig. 2. Amplification results of U100 gene on extracts obtained with Qiagen method from HST-infected MT4 cells, at different times pi. (a) Amplification of DNA by PCR; lane MV, size marker; lane T, uninfected MT4 cells; lane S, supernatant; lane 0, MT4 before infection; lane 1, 2 h pi; lane 2, 7 h pi; lane 3, 24 h pi; lane 4, 48 h pi; lane 5, 72 h pi; lane 6, 4 days pi; lane 7, 5 days pi; lane 8, 7 days pi; lane 9, 8 days pi. (b) Amplification of mRNA by RT-PCR (TaKaRa); lane MV, size marker; lane T, uninfected MT4 cells; lane S, supernatant; lane 0, MT4 before infection; lane 1, 2 h pi; lane 2, 7 h pi; lane 3, 24 h pi; lane 4, 48 h pi; lane 5, 72 h pi; lane 6, 4 days pi; lane 7, 5 days pi; lane 8, 7 days pi; lane 9, 8 days pi.

Antigen production was first detected by flow cytometry at 48 h pi using 7C7 Mab and only from 72 h pi with 10G6 Mab (Table 4, Fig. 3), before CPE appearance. The percentage of cells expressing HHV-6 related

antigen then increased gradually, and reached a maximum of 25% of positive cells on day 7; mean fluorescence intensities also increased during the kinetic.

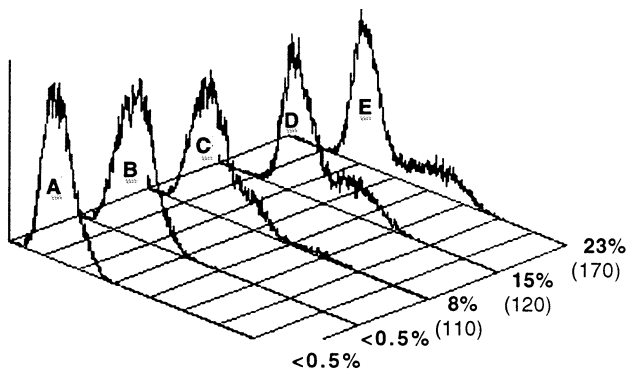


Fig. 3. Fluorescence histograms of HST-infected MT4 cells, prepared with 4% PFA and stained with 10G6 Mab. Antigen expression is evaluated at different time of the kinetic: 0 h (A), 24 h (B), 4 days (C), 5 days (D) and 8 days (E). Percentages represent the proportion of cells expressing the related antigen. Mean fluorescence intensities are mentioned in brackets.

4. Discussion

Determination of the related pathogenicity for new persistent viruses, especially herpesviruses, needs clearly the use of biological markers of viral replication. Such approaches have been developed with success for the cytomegalovirus, in particular by the laboratory, showing that the use of direct markers (mRNA or antigens) or indirect markers (viral load quantification) allow the risk of the occurrence of tissue invasion during active infection to be determined (Boeckh and Boivin, 1998; Andre et al., 1999). In the case of HHV-6, an accurate evaluation of viral replication is particularly important because cellular targets are the same during the latency and active infection, and are represented by PBMCs (Kondo et al., 1991). In this context, the qualitative detection of DNA viral in lymphocytes is not sufficient to

affirm the detection of an 'active' virus. This may explain in part difficulties in exactly assessing the direct or indirect effects of active infection in immunosuppressed patients (Caserta et al., 2001).

In order to provide direct markers of viral replication for future clinical applications, two methods were developed for a sensitive and specific detection of transcription (mRNA) and translation (antigens) viral gene products. Late gene products were chosen, the only ones demonstrating a complete lytic cycle. Developments were performed using in vitro cellular culture on two types of cells infected by two different HHV-6B strains (predominant in immunodepressed patients (Carrigan and Knox, 1994)): a reference strain (HST) and a strain isolated in our laboratory (GUI). Viral cultures were carried out on PBMCs, the cellular target in vivo, and on MT4 cell line, allowing us to be free of the technical restrictions of PBMC culture (donor availability, IL2 stimulation, high cost).

The first replication marker was RNAemia, which consisted of the detection of a gene transcription product. From the late viral genes described previously (Mirandola et al., 1998), we selected the U100 gene encoding for a glycoprotein complex envelop gp 82-105 specific to HHV-6 (Dominguez et al., 1999) and neutralized in vivo by antibodies (Pfeiffer et al., 1995). Furthermore, this gene has the original feature of being highly spliced (11 exon), thus a good differentiation between cDNA (obtained from mRNA target) and DNA products is possible, due to their differences in size and sequence. In addition, amplification were carried out in a region spanning the exons 3 and 4, in which the intron differs of 33 bp (Isegawa et al., 1999), according to the strain (A or B), thus allowing a rapid distinction between the two types.

RT-PCR conditions were developed in order to obtain a selective amplification of viral mRNA in a single step, in order to avoid nested-PCR (Norton et al., 1999). The choice of degenerated primers on exon 3 and 4 ensured, in theory, an equivalent detection of strain A and B variant transcripts. This point remains to be verified through assays on variant A strain, which is not available in our laboratory.

Out of the two techniques evaluated for RNA extraction, the Qiagen column extraction system with silica-gel-membrane had the advantage of being more rapid and easier than the RNA-PLUSTM and method based on the Chomczynski and Sacchi (1987) reference technique. It also offers the possibility to perform a selective DNase treatment during the Qiagen manipulation, a good way of ensuring the total elimination of viral DNA. Concerning amplification, the interest was demonstrating of using the original mRNA selective amplification TakaRa, which consists of incorporating nucleotide analogs during RT. With such analogs, Tm declines and denaturation at low temperature (85 °C)

becomes possible: only cDNA is denaturated and amplified, whereas DNA is not, as assessed during the kinetic by DEIA hybridization (sample obtained 2 h after infection). This procedure is thus particularly attractive due to its rapidity and ease in relation to more complex methodologies developed for the same purpose (Joo et al., 2002). Moreover it allowed us to obtain better sensitivity than with the SuperscriptTM kit for detecting mRNA U100. Lastly, an better sensitivity was obtained by adding T4gene 32 protein (ssDNA binding and dsDNA helicase protein), confirming our observations on RNA viruses (Monpoeho et al., 2000).

Results obtained during the follow-up of U100 gene transcripts expression allowed a better understanding of alternative splicing, as mentioned in other studies. (Dominguez et al., 1999; Pfeiffer et al., 1995). The expression of non spliced mRNA started from the 7th h pi which gave it an early character. The spliced mRNA detected from 48 h pi was a secondarily expressed late marker. This suggests that the alternative splicing was linked to a maturation phenomenon during the transcription, as described previously for the U16/U17 immediate early HHV-6 gene (Flebbe-Rehwaldt et al., 2000). It may thus be possible to consider, as in the case of U16/U17, the spliced form of U100 as a late marker of viral replication, whereas the unspliced form is expressed under early conditions. This may have a potential clinical utility using a single marker for the entire replication cycle, instead of using three different gene products (Van den Bosch et al., 2001).

The second marker selected was the antigenemia which consisted of the direct research of viral gene translation product in PBMCs. This technique is used widely for CMV infections diagnostics. HHV-6 antigenemia, with slide reading has demonstrated previously its feasibility in liver transplant recipients (Lautenschlager et al., 2000). It was interesting to develop and adapt such methodology to flow cytometry, in order to avoid the subjectivity of microscope readings. Two commercially available monoclonal antibodies directed against late protein were selected, the 10G6 and the 7C7 used previously for in vitro evaluation of antiviral drugs (Manichanh et al., 2000). Based on experiment in flow cytometry applied to other herpesviruses (Imbert-Marcille et al., 2000a, 1997; Poirier-Toulemonde et al., 2000), four fixation/permeabilization procedures were selected and evaluated. Each method used PFA, by itself with a strong dose (4%), or associated with several different reagents in three of the four methods (tween, methanol or saponine). The best results were obtained with the PFA 4% method. This choice was based on its capacity to allow good discrimination between positive and negative cells, confirming results obtained by Manichanh et al. (Manichanh et al., 2000). The PFA/M method which was optimal for the detection of CMV IE antigens (Imbert-Marcille et al., 1997) and EBV

antigens (Imbert-Marcille et al., 2000a) was less efficient for the detection of these late HHV-6 antigens. Moreover the PFA 4% method has the advantage of being inexpensive, quicker for routine laboratory use and of allowing a conservation of antigen expression at least 1 week before staining. The kinetic of antigens expression was fairly similar and the evaluation of the percentage of positive cells for the related antigens was also alike. However, 7C7 Mab was able to detect the multiplication a little earlier, thus the 10G6 Mab target, at the present time unknown, was expressed a little later than the nuclear proteins of 116 and 109 kDa recognized by 7C7 Mab (Robert et al., 1998).

As from now, with the diagnostic tools developed in this study, two markers of viral HHV-6 replication could be used for routine laboratory investigation. It is now necessary to evaluate their real benefits in a clinical situation during a prospective study. This study will allow the estimation of the marker's performances, particularly in terms of sensitivity and to define more exactly the direct and indirect consequences of HHV-6 active infections in immunocompromised patients. It will also be possible to determine the respective benefits of these markers, particularly in relation to viral load quantification, an indirect marker of replication.

References

- Ablashi, D.V., Salahuddin, S.Z., Josephs, S.F., Balachandran, N., Krueger, G.R., Gallo, R.C., 1991. Human herpesvirus-6 (HHV-6) (short review). *In Vivo* 5 (3), 193–199.
- Andre, E., Imbert-Marcille, B.M., Cantarovich, D., Besse, B., Ferre-Aubineau, V., Billaudel, S., 1999. Use of reverse transcription polymerase chain reaction with colorimetric plate hybridization to detect a cytomegalovirus late spliced mRNA in polymorphonuclear leukocytes from renal transplant patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 34 (4), 287–291.
- Boeckh, M., Boivin, G., 1998. Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. *Clin. Microbiol. Rev.* 11 (3), 533–554.
- Carrigan, D.R., Knox, K.K., 1994. Human herpesvirus 6 (HHV-6) isolation from bone marrow: HHV-6-associated bone marrow suppression in bone marrow transplant patients. *Blood* 84 (10), 3307–3310.
- Caserta, M.T., Mock, D.J., Dewhurst, S., 2001. Human herpesvirus 6. *Clin. Infect. Dis.* 33 (6), 829–833.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162 (1), 156–159.
- Dockrell, D.H., Paya, C.V., 2001. Human herpesvirus-6 and -7 in transplantation. *Rev. Med. Virol.* 11 (1), 23–36.
- Dominguez, G., Dambaugh, T.R., Stamey, F.R., Dewhurst, S., Inoue, N., Pellett, P.E., 1999. Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A. *J. Virol.* 73 (10), 8040–8052.
- Ferre-Aubineau, V., Imbert-Marcille, B.M., Raffi, F., Besse, B., Loirat, R., Billaudel, S., 1995. Colorimetric microtiter plate hybridization assay using monoclonal antibody for detection of an amplified human immunodeficiency virus target. *J. Virol. Methods* 55 (1), 145–151.
- Flebbe-Rehwaltdt, L.M., Wood, C., Chandran, B., 2000. Characterization of transcripts expressed from human herpesvirus 6A strain GS immediate-early region B U16-U17 open reading frames. *J. Virol.* 74 (23), 11040–11054.
- Gautheret-Dejean, A., Manichanh, C., Thien-Ah-Koon, F., Fillet, A.M., Mangeney, N., Vidaud, M., Dhedin, N., Vernant, J.P., Agut, H., 2002. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of human herpesvirus-6 infection and application to bone marrow transplant patients. *J. Virol. Methods* 100 (1–2), 27–35.
- Humar, A., Kumar, D., Caliendo, A.M., Moussa, G., Ashi-Sulaiman, A., Levy, G., Mazzulli, T., 2002. Clinical impact of human herpesvirus 6 infection after liver transplantation. *Transplantation* 73 (4), 599–604.
- Imbert-Marcille, B.M., Robillard, N., Poirier, A.S., Coste-Burel, M., Cantarovich, D., Milpied, N., Billaudel, S., 1997. Development of a method for direct quantification of cytomegalovirus antigenemia by flow cytometry. *J. Clin. Microbiol.* 35 (10), 2665–2669.
- Imbert-Marcille, B.M., Coste-Burel, M., Robillard, N., Foucaud-Gamen, J., Billaudel, S., Drouet, E., 2000a. Sequential use of paraformaldehyde and methanol as optimal conditions for the direct quantification of ZEBRA and rta antigens by flow cytometry. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7 (2), 206–211.
- Imbert-Marcille, B.M., Tang, X.W., Lepelletier, D., Besse, B., Moreau, P., Billaudel, S., Milpied, N., 2000b. Human herpesvirus 6 infection after autologous or allogeneic stem cell transplantation: a single-center prospective longitudinal study of 92 patients. *Clin. Infect. Dis.* 31 (4), 881–886.
- Isegawa, Y., Mukai, T., Nakano, K., Kagawa, M., Chen, J., Mori, Y., Sunagawa, T., Kawanishi, K., Sashihara, J., Hata, A., Zou, P., Kosuge, H., Yamanishi, K., 1999. Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B. *J. Virol.* 73 (10), 8053–8063.
- Joo, C.H., Lee, H., Kim, E., Lee, B., Cho, Y.K., Kim, Y.K., 2002. Differential amplifying RT-PCR: a novel RT-PCR method to differentiate mRNA from its DNA lacking intron. *J. Virol. Methods* 100 (1–2), 71–81.
- Kondo, K., Kondo, T., Okuno, T., Takahashi, M., Yamanishi, K., 1991. Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. *J. Gen. Virol.* 72 (Pt 6), 1401–1408.
- Lautenschlager, I., Linnavuori, K., Hockerstedt, K., 2000. Human herpesvirus-6 antigenemia after liver transplantation. *Transplantation* 69 (12), 2561–2566.
- Manichanh, C., Grenot, P., Gautheret-Dejean, A., Debre, P., Huraux, J.M., Agut, H., 2000. Susceptibility of human herpesvirus 6 to antiviral compounds by flow cytometry analysis. *Cytometry* 40 (2), 135–140.
- Mirandola, P., Menegazzi, P., Merighi, S., Ravaioli, T., Cassai, E., Di Luca, D., 1998. Temporal mapping of transcripts in herpesvirus 6 variants. *J. Virol.* 72 (5), 3837–3844.
- Miyoshi, I., Ohtsuki, Y., Fujishita, M., Yoshimoto, S., Kubonishi, I., Minezawa, M., 1982. Detection of type C virus particles in Japanese monkeys seropositive to adult T-cell leukemia-associated antigens. *Gann* 73 (6), 848–849.
- Monpoeho, S., Dehee, A., Mignotte, B., Schwartzbrod, L., Marechal, V., Nicolas, J.C., Billaudel, S., Ferre, V., 2000. Quantification of enterovirus RNA in sludge samples using single tube real-time RT-PCR. *Biotechniques* 29 (1), 88–93.
- Norton, R.A., Caserta, M.T., Hall, C.B., Schnabel, K., Hocknell, P., Dewhurst, S., 1999. Detection of human herpesvirus 6 by reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 37 (11), 3672–3675.
- Pfeiffer, B., Berneman, Z.N., Neipel, F., Chang, C.K., Tirwatnapong, S., Chandran, B., 1993. Identification and mapping of the gene encoding the glycoprotein complex gp82-gp105 of human herpesvirus 6 and mapping of the neutralizing epitope recognized by monoclonal antibodies. *J. Virol.* 67 (8), 4611–4620.

- Pfeiffer, B., Thomson, B., Chandran, B., 1995. Identification and characterization of a cDNA derived from multiple splicing that encodes envelope glycoprotein gp105 of human herpesvirus 6. *J. Virol.* 69 (6), 3490–3500.
- Poirier-Toulemonde, A.S., Milpied, N., Cantarovich, D., Morcet, J.F., Billaudel, S., Imbert-Marcille, B.M., 2000. Clinical relevance of direct quantification of pp65 antigenemia using flow cytometry in solid organ and stem cell transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.* 38 (9), 3143–3149.
- Robert, C., Aubin, J.T., Visse, B., Fillet, A.M., Huraux, J.M., Agut, H., 1996. Difference in permissiveness of human fibroblast cells to variants A and B of human herpesvirus-6. *Res. Virol.* 147 (4), 219–225.
- Robert, C., Massonneau, V., Pothier, P., Clement, A., Hejblum, G., Hubert, P., Aubin, J.T., Agut, H., 1998. Selection and characterization of two specific monoclonal antibodies directed against the two variants of human herpesvirus-6. *Res. Virol.* 149 (6), 403–411.
- Salahuddin, S.Z., Ablashi, D.V., Markham, P.D., Josephs, S.F., Sturzenegger, S., Kaplan, M., Halligan, G., Biberfeld, P., Wong-Staal, F., Kramarsky, B., et al., 1986. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science* 234 (4776), 596–601.
- Van den Bosch, G., Locatelli, G., Geerts, L., Faga, G., Ieven, M., Goossens, H., Bottiger, D., Oberg, B., Lusso, P., Berneman, Z.N., 2001. Development of reverse transcriptase PCR assays for detection of active human herpesvirus 6 infection. *J. Clin. Microbiol.* 39 (6), 2308–2310.
- Yamanishi, K., Okuno, T., Shiraki, K., Takahashi, M., Kondo, T., Asano, Y., Kurata, T., 1988. Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet* 1 (8594), 1065–1067.
- Yoshikawa, T., Asano, Y., Ihira, M., Suzuki, K., Ohashi, M., Suga, S., Kudo, K., Horibe, K., Kojima, S., Kato, K., Matsuyama, T., Nishiyama, Y., 2002. Human herpesvirus 6 viremia in bone marrow transplant recipients: clinical features and risk factors. *J. Infect. Dis.* 185 (7), 847–853.

1.3.2 Commentaires Article n°2

Le développement d'outils de suivi de la réplication de l'HHV6 a nécessité une maîtrise préalable de la culture virale de virus, qui nécessite l'utilisation de cellules mononucléées humaines (CMPS de donneurs sains ou cellules mononucléées de la lignée MT4). Parmi les deux souches de référence mises à notre disposition, la souche SIE de variant A et de la souche HST variant B, seule la souche HST a pu être entretenue avec succès, témoignant des difficultés de culture de ce virus. Ainsi l'ECP parfois fugace ou même invisible et les problèmes d'altération des virions liés à la phase de congélation-décongélation sont deux éléments identifiés comme source d'échec de la culture virale. Ces essais ont également montré l'intérêt d'inoculer le surnageant de culture, riche en particules virales infectieuses. La souche GUI, de type B, isolée chez un jeune patient au sein du laboratoire a également été cultivée. Par rapport à la culture classique en CMPS, l'entretien de la souche de référence HST et de la souche GUI sur la lignée MT4 a été plus aisée, permettant de s'affranchir des contraintes d'approvisionnement en CMSP. La culture sur MT4 a permis d'obtenir des stocks importants des virus pour réaliser ensuite les mises au point de RT-PCR à la recherche de transcrits et d'une méthode de CMF pour la recherche d'antigènes viraux.

Le choix d'un ARNm cible a été effectué grâce à la première publication des cartes des transcrits de l'HHV6, établie sur une souche de variant A (Mirandola et al., 1998). Nous avons sélectionné, en raison de son caractère multi-épissé (11 exons dans sa structure) et de son expression tardive, le gène U100, codant pour la glycoprotéine d'enveloppe gp82-105. Ces travaux ont, en outre, suggéré que ce gène a la particularité de ne subir un épissage qu'à la phase tardive du cycle de multiplication. Bien que sa transcription n'ait pas été encore étudiée, ce gène est également présent au sein du génome des souches de type B, dont l'incidence est prédominante en pathologie humaine. Ceci nous a conduit, en tenant compte des divergences sur les séquences parentales entre les variants A et B (76% d'identité dans cette région) (Isegawa et al., 1999) ou Z-29 (Dominguez et al., 1999), à développer une RT-PCR permettant d'amplifier et de décrire les transcrits des variants B. Des amorces dégénérées permettant une amplification des deux variants ont été dessinées. Elles ont été choisies respectivement sur l'exon 3 et l'exon 4 du gène, de part et d'autre de l'intron 2. Après avoir réalisé un séquençage respectif de l'ADN et l'ARN, amplifiés à partir d'extraits de CMSP infectées par la souche de référence B HST, il a été montré que l'intron 2, dont la taille est de 101 paires de bases pour la souche A U1102 (Mirandola et al., 1998), est plus

long de 32 paires de bases pour la souche HST. Ceci autorise une distinction aisée des deux variants, représentant un atout supplémentaire dans la sélection du gène U100 comme cible de l'amplification. La souche GUI a ainsi été classée parmi les variants de type B.

En raison des progrès technologiques survenus depuis la mise au point des RT-PCR du CMVH, nous avons évalué les performances de nouvelles méthodes, en les comparant à celles sélectionnées dans le premier article. Concernant l'étape d'extraction, les méthodes Qiagen sur colonne de silice étaient alors majoritairement utilisées en routine. Sans avoir recours aux méthodes d'extraction sélectives des ARNm, en cours de développement et très coûteuses, le kit Qiagen RNeasy® a été évalué par rapport à la technique RNA-PLUS™. Nous avons également envisagé l'intérêt d'effectuer un traitement additionnel au cours de la phase d'extraction par la DNase, garantissant en théorie une élimination de l'ADN viral contaminant.

La réaction de RT-PCR du gène U100 a tout d'abord été développée en une seule étape, grâce à l'utilisation de mélange réactionnel de la Superscript™One step RT-PCR (Invitrogen). La possibilité de réaliser la RT-PCR en une seule étape, associée aux mêmes précautions que celles respectées pour le CMVH, limitait ainsi considérablement les risques de contaminations par d'éventuels amplicons présents dans l'environnement. Cependant, l'apparition de deux bandes après amplification de certains extraits traités par la DNase, dont les tailles correspondaient respectivement à l'amplicon de l'ADN et/ou de l'ADNc du gène non épissé et à celui de l'ARNm épissé, nous a conduit à mettre en doute l'efficacité de cette enzyme. Nous avons, dès lors, utilisé une technique d'amplification sélective des ARNm (TaKara), basée sur l'utilisation de nucléotides autorisant une dénaturation à 85° C (Auer et al., 1996). Cette technique a apporté une garantie supplémentaire par rapport au risque de contamination par l'ADN parental. L'évaluation comparative des deux techniques de RT-PCR, en ajoutant dans les milieux réactionnels la T4 gen 32 protéine a permis de conclure à une sensibilité supérieure la technique TaKara™, nous conduisant à la sélectionner pour amplifier les transcrits U100.

Parallèlement au développement de la RT-PCR, nous nous sommes intéressés à la recherche de l'expression des antigènes viraux, produits de la traduction des gènes viraux et constituant, à ce titre, un marqueur complémentaire de la multiplication virale. Une technique d'antigénémie sur lame avait été récemment développée et évaluée avec succès chez les transplantés de foie (Lautenschlager et al., 2000a). Notre objectif était, à l'instar des travaux effectués pour le CMVH, de détecter les antigènes viraux de l'HHV6 par cytométrie en flux. Cette méthode assure en effet une lecture plus objective qu'au microscope à fluorescence,

autorisant une quantification précise de l'antigénémie. Les seules données disponibles dans la littérature rapportaient l'étude de l'efficacité de différents antiviraux sur l'HHV6 (Manichanh et al., 2000), utilisant les anticorps monoclonaux 7C7 et 8C8 (Robert et al., 1998). Nous avons donc évalué différentes techniques de fixation/perméabilisation et les Ac commercialisés 10G6 et 7C7, capables de reconnaître des antigènes tardifs exprimés par les deux variants (Argène). L'utilisation d'une solution de paraformaldéhyde à 4%, méthode rapide et permettant une conservation des cellules ainsi fixées pendant 8 jours avant la réalisation de marquage, a constitué la technique de choix parmi les 4 techniques évaluées. Les essais, effectués dans un premier temps sur cultures de cellules MT4 infectées, ont été reproduits sur cultures lymphocytaires infectés par l'HHV6. Ils démontrent la faisabilité de cette technique pour détecter l'antigénémie HHV6 chez des sujets infectés.

Enfin, ces mises au point ont été complétées par l'évaluation de ces deux méthodes au cours de la réalisation d'une cinétique d'infection *in vitro* de cellules MT4. Nous avons confirmé que les anticorps monoclonaux 7C7 et 10G6 ont pour cibles des protéines tardives, avec une expression un peu plus précoce des protéines nucléaires de 116 kDa et de 109 kDa, reconnues par le 7C7 (Robert et al., 1998). Ces essais ont également montré que le gène U100 des variants B subit un épissage alternatif, les formes épissées n'étant produites qu'au cours de la phase tardive, comme cela avait été précédemment suggéré pour le variant A (Mirandola et al., 1998; Pfeiffer et al., 1995). Ce phénomène d'épissage alternatif a été décrit pour d'autres gènes de l'HHV6, notamment pour le gène U16-U17, où la situation est inversée, la forme épissée étant transcrite très précocement et la forme non épissée apparaissant plus tardivement (Flebbe-Rehwaltd et al., 2000). Ces données ont également démontré l'efficacité de notre procédure technique d'extraction/amplification pour détecter sélectivement les ARNm, sans amplification concomitante de l'ADN parental.

2-CMVH, HHV6 ET CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏÉTIQUES

Cette deuxième partie rapporte les essais conduits sur l'étude de la réplication du CMVH et de l'HHV6 au cours de la différenciation *in vitro* des progéniteurs hématopoïétiques. Elle est précédée d'un bref rappel bibliographique concernant l'hématopoïèse, la culture et l'administration thérapeutique de cellules souches hématopoïétiques et enfin les interactions des *Betaherpesvirinae* avec ce système complexe.

2.1 Etat des connaissances scientifiques

2.1.1 Les cellules souches hématopoïétiques

La moelle osseuse, localisée dans les os plats chez l'adulte, est à l'origine de la production des cellules sanguines, caractérisées par leur durée de vie limitée et leur incapacité d'auto renouvellement. Ce tissu semi-solide donne lieu à l'hématopoïèse qui se déroule au sein d'une matrice extracellulaire représentée par la trame osseuse constituée notamment d'ostéoblastes, ostéoclastes et fibroblastes et le stroma médullaire, comprenant en particulier de cellules réticulaires, des adipocytes, des macrophages et des lymphocytes T. Les cellules stromales et de la matrice extracellulaire interagissent avec les cellules hématopoïétiques par la production locale de facteurs diffusibles (les cytokines), mais également par des mécanismes de contacts directs entre ces différentes cellules.

2.1.1.1 Physiologie de l'hématopoïèse normale

Le système hématopoïétique est formé de plusieurs compartiments cellulaires aux capacités d'auto-renouvellement et de prolifération variable selon le niveau de différenciation. Très minoritaires en nombre, les cellules souches pluripotentes (1/10 000 cellules médullaires mononucléées) sont définies par leur grande capacité d'auto-renouvellement, leur totipotence, leur capacité d'engagement dans la différenciation. Elles sont majoritairement quiescentes. A partir de ces cellules sont générées les progéniteurs engagés irréversiblement dans la différenciation. Les progéniteurs précoces pluripotents génèrent des cellules de toutes les lignées alors que les progéniteurs tardifs, encore dénommés précurseurs et identifiables morphologiquement, sont engagés vers un seul type de lignée (myelo-monocytaire,

érythroïde, ou thrombopoïétique) Ils sont dotés d'une activité mitotique intense. Essentiellement localisées dans la moelle, les cellules souches sont également retrouvées à un pourcentage très faible dans le sang normal (cellules souches périphériques ou CSP) et dans le sang de cordon.

L'engagement dans une phase de différenciation est marqué par l'acquisition d'antigènes spécifiques. Ainsi, les cellules souches sont principalement caractérisées par leur marqueur antigénique glycoprotéique CD34 jusqu'au stade de progéniteurs précoces. Dans ce compartiment, l'expression du CD34 diminue au fur et à mesure que les cellules se différencient, alors qu'apparaissent le CD38 et les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (DR), puis les antigènes spécifiques de chacune des lignées. La marque la plus précoce de l'engagement myéloïde est l'apparition du CD33. La détermination ultérieure engendrera, selon la lignée, le CD71, puis la glycophorine A pour les érythroblastes, le CD13, puis le CD15 pour les granuleux et le CD14 pour les monocytes. A ce stade, le CD34 et le CD38 ont été perdus et le CD33 est faiblement ou non exprimé.

Récemment, de nouvelles cellules souches, isolées notamment au niveau sanguin, ont été identifiées. Elles sont caractérisées par le marqueur antigénique CD133 et n'expriment pas l'antigène CD34. Il s'agirait d'une forme encore plus précoce de cellules souches capables de générer, *in vitro*, non seulement des cellules de l'hématopoïèse, mais également des cellules nerveuses (Kuci et al., 2003; Uchida et al., 2000).

La différenciation hématopoïétique (Figure 16) est régulée par des facteurs solubles qui contrôlent la production cellulaire à plusieurs niveaux. Ces cytokines sont des molécules protéiques ou glycoprotéiques synthétisées localement, par les cellules stromales ou par les cellules dites accessoires (monocytes, lymphocytes). Ces facteurs peuvent être stimulants (CSF : *colony stimulating factor*) ou inhibiteurs. L'interleukine 1 (IL-1), l'interleukine 6 (IL-6) et le *Stem Cell Factor* (SCF) sont des facteurs dits de compétence, qui agissent sur les cellules souches en les faisant entrer dans des phases actives du cycle cellulaire. L'interleukine 3 (IL3), essentielle pour rendre les progéniteurs pluripotents répondeurs, et le *Granulo-Monocytic Colony Stimulating Factor* (GM-CSF) agissent sur les progéniteurs de rang intermédiaire capables de maintenir la prolifération des cellules activées. L'érythropoïétine (EPO) pour les érythrocytes, le M-CSF (*Monocytic Colony Stimulating Factor*), le G-CSF (*granulocytic Colony Stimulating Factor*) la TPO (thrombopoïétine) sont les cytokines spécialisées des différentes lignées (Figure 16).

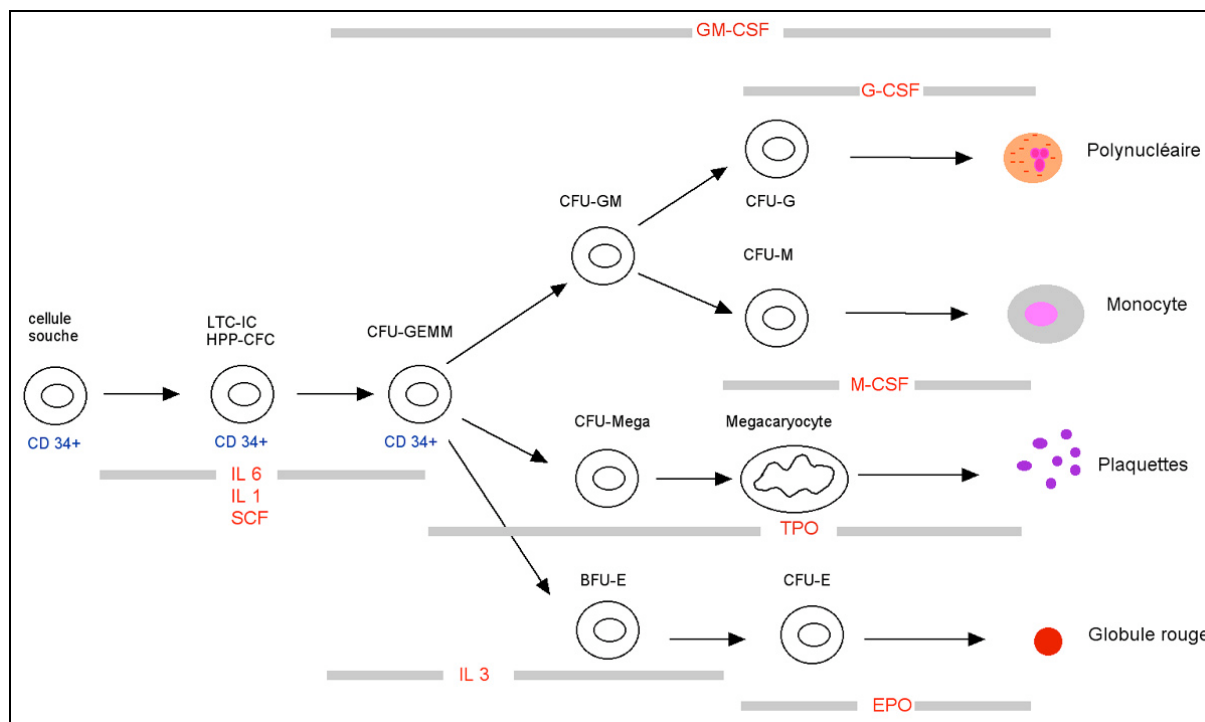


Figure 16 : Rôle des facteurs de croissance sur les différentes étapes de l'hématopoïèse, d'après (Trimoreau et Praloran, 2000)

2.1.1.2 Méthodes de différenciation *in vitro*

Il existe différentes méthodes de culture *in vitro* des cellules souches hématopoïétiques (CSH). La plus ancienne, initialement décrite en 1966, est la méthode en milieu semi-solide. Elle demeure la plus utilisée pour étudier les capacités de multiplication et de différenciation des progéniteurs. Les cultures peuvent être réalisées à partir des cellules mononucléées totales (monocytes, lymphocytes, éléments de la maturation granuleuse et érythroblastique, progéniteurs et cellules souches) isolées par gradient de densité à partir d'un prélèvement de moelle osseuse ou de sang périphérique. Les cellules sontensemencées dans un milieu semi-solide (type méthylcellulose) contenant un ou plusieurs facteurs de stimulation et sont cultivées à 37°C sous CO₂. Il n'existe pas de véritable consensus quant aux cytokines utilisées et à leur concentration respective, qui doivent être adaptées pour chaque culture en fonction de la lignée que l'on souhaite étudier. Les progéniteurs immobilisés se divisent sur place, formant après plusieurs jours de culture des colonies observables au microscope. Ces colonies, morphologiquement identifiables, sont formées d'un amas de cellules issues d'un

seul progéniteur ayant subi les étapes de différenciation et de maturation. Les cellules matures ou en maturation terminale meurent rapidement. Les HPP-CFC (*High Proliferative Potential Colony Forming Unit*) exprimant le CD34+ constituent les progéniteurs capables de générer en milieu semi-solide de grosses colonies témoignant de leur potentiel prolifératif. Elles représentent l'étape la plus primitive de la différenciation. Les CFU-GEMM (*colony forming unit-granulo-erythro-mono-megakaryocytic*) sont des progéniteurs primitifs formant des colonies en 14 à 21 jours. Les BFU-E (colonies érythroblastiques) et les CFU-GM (granulo-monocytaire), les CFU-Meg (colonies mégacaryocytaires) sont des progéniteurs d'âge intermédiaire, formant en 10 à 14 jours des colonies contenant un seul ou deux types cellulaires. Enfin les CFU-E, CFU-G, CFU-M et mégacaryoblastes sont des progéniteurs tardifs, unipotents, formant des colonies en 5 à 7 jours (Trimoreau and Praloran, 2000).

Les cellules souches très précoces, dénommées LTC IC (*long term culture initiating cell*) (CD34+) sont incapables de former des colonies en culture primaire semi-solide. Dans un système en milieu liquide, deuxième méthode de culture des progéniteurs hématopoïétique, et dans des conditions adaptées (à 37°C sous CO₂ en atmosphère humidifiée), elles génèrent des progéniteurs de niveau primitif, mais également tardif. L'avantage de cette méthode de culture en milieu liquide réside dans sa capacité à permettre l'expansion d'un nombre important de progéniteurs. Par contre, il est, dans ces conditions, beaucoup plus difficile par rapport à la culture en milieu semi-solide d'estimer avec exactitude la différenciation et la prolifération des cellules progénitrices.

Une troisième méthode de culture a été conçue en combinant les deux premières. Elle est basée sur une culture des progéniteurs en milieu liquide avec réalisation d'un contact des cellules médullaires adhérentes non hématopoïétiques (cellules stromales) d'origine animale (murine notamment). Elle autorise en théorie une expansion jusqu'au stade des précurseurs voir même des éléments sanguins matures après 4 à 5 semaines de culture (Lewis et al., 2001) permettant une étude encore plus poussée de la différenciation hématopoïétique *in vitro*.

2.1.1.3 Utilisations thérapeutiques des CSH dans le cadre des greffes

L'administration de cellules souches hématopoïétiques chez des sujets receveurs de traitements antinéoplasiques myéloablatifs est une approche thérapeutique dont les indications s'accroissent graduellement depuis le début des années 90. Cette stratégie thérapeutique a permis des progrès considérables dans le traitement des hémopathies malignes et de certaines tumeurs solides, autorisant l'administration de fortes doses d'anticancéreux.

Deux contextes d'administration sont possibles :

-La greffe allogénique consiste à administrer au receveur des CSH provenant d'un donneur. Le greffon va assurer le remplacement du système hématopoïétique du receveur, irrémédiablement détruit par le conditionnement. Celui-ci a pour but d'éradiquer les cellules malignes et consiste en l'administration de doses élevées de chimiothérapies anticancéreuses associées à une irradiation corporelle totale. A cette fonction de « remplacement » du système hématopoïétique du receveur s'ajoute un effet immunologique important de lutte contre les cellules tumorales résiduelles. Cette notion, de reconnaissance récente, est d'ailleurs mise à profit au cours de mini-allogreffes, où c'est cet effet « greffon contre maladie » que l'on cherche à privilégier. En raison de la toxicité majeure du conditionnement, la greffe allogénique est réservée aux sujets jeunes. Par ailleurs, elle pose le problème de disposer d'un donneur dont le système HLA soit le plus proche possible de celui du receveur. Enfin, elle expose au risque de survenue d'une maladie du greffon contre l'hôte, pendant délétère pour le receveur de l'effet greffon contre maladie.

-La greffe autologue consiste, à l'issue d'une intensification de la chimiothérapie, à réinjecter à un patient ses propres CSH, prélevées antérieurement, si possible au moment d'une phase de rémission. Cette stratégie ne présente pas la toxicité de la greffe allogénique, mais à l'inverse ne s'accompagne d'aucun effet immunothérapique, augmentant le risque de rechute de la maladie initiale. Elle est applicable chez des sujets plus âgés. Ses indications sont restreintes aux maladies hématologiques et aux tumeurs chimiosensibles permettant de faire bénéficier au patient de l'effet dose de la chimiothérapie/radiothérapie.

Les sources de cellules souches hématopoïétiques ont évolué au cours des années. Les premiers greffons ont été obtenus après plusieurs ponctions réalisées sous anesthésie générale au niveau des os plats et ils constituent à l'heure actuelle une source toujours usitée. La démonstration de la migration dans le sang périphérique des précurseurs hématopoïétiques médullaires, après injection de cytokines hématopoïétiques, est à l'origine de la sélection des cellules souches hématopoïétiques pratiquée sur sang périphérique (CSHP) depuis 1986. Les cytokines de mobilisation sont identiques à celles utilisées fréquemment en cancérologie pour accélérer la récupération hématopoïétique en post-chimiothérapie intensive. Elles sont représentées par le G-CSF (Neupogen® ou Granocyte®), à la dose de 5 µg/kg/jour, le GM-CSF (Leucomax®) ou le Filgrastim (G-CSF recombinant) qui associé au SCF conduit à un effet synergique dans la mobilisation des CD34 (Facon et al., 1999). Depuis une dizaine

d'années une nouvelle source de cellules souches est également utilisée, représentée par les cellules fœtales hématopoïétiques obtenues à partir de sang cordon (Broxmeyer et al., 1989).

Au niveau périphérique, les CSHP sont collectables, après stimulation, par cytophérèse. Cette méthode permet l'obtention d'un greffon 10 à 100 fois plus riche qu'un greffon médullaire avec une représentation de toutes les lignées hématopoïétiques. Elles permettent une réduction de la durée de l'aplasie par rapport aux greffes de moelle osseuse notamment au niveau des granuleux et des plaquettes (Craddock, 2000). De plus, le recueil des cellules souches au niveau périphérique est beaucoup moins invasif, ne nécessitant pas d'anesthésie générale, ce qui explique sa place croissante. Ce mode de prélèvement est ainsi devenu prédominant en greffe autologue et prend une place de plus en plus dans les greffes allogéniques. Subsiste cependant le risque d'une éventuelle contamination des cellules transfusées par des cellules malignes.

L'obtention d'anticorps monoclonaux dirigés contre l'antigène CD34 est à l'origine de méthodes de sélection des progéniteurs à partir de la moelle osseuse, mais également du sang de cordon ou du sang périphérique (Balduzzi et al., 1995). Ces techniques garantissent l'obtention de populations pures de précurseurs hématopoïétiques (contenant au moins 95% de cellules CD34). Cette technique de " purge", éliminant les cellules tumorales, n'est cependant pas applicable aux leucémies aiguës où les cellules tumorales expriment souvent le CD34. Ses principales indications sont les Lymphomes Non-Hodgkiniens (LNH), les maladies de Hodgkin, les myélomes et certaines tumeurs solides.

Cependant, des progrès restent à faire pour diminuer la période d'aplasie, d'au moins 10 jours après l'injection, susceptible d'engendrer des surinfections par des agents opportunistes (Molina et al., 2000) (Rutella et al., 2001).

Une des voies actuelles dans le domaine des greffes est de réduire la période d'aplasie, par l'injection de cellules matures, obtenues après expansion *ex vivo* de progéniteurs. La différenciation, *in vitro*, des progéniteurs doit être réalisée en présence d'un cocktail de cytokines dans des conditions permettant secondairement de les réinjecter au patient. Les premiers essais pratiqués, *in vitro*, ont montré la faisabilité de la différenciation en milieu liquide dépourvu de sérum de veau (Estrov et al., 2002; Keil et al., 2002; Mahe et al., 1996) mais soulignent la difficulté d'établir un mélange consensuel de cytokines pour obtenir une expansion reproductible et efficace (Heike and Nakahata, 2002; Paquette et al., 2002). Chez les patients, une réduction très importante de la durée d'aplasie a été observée, concernant en particulier la neutropénie (Paquette et al., 2002; Reiffers et al., 1999). La réduction de la thrombopénie est plus discutée (McNiece et al., 2000). Cette nouvelle approche requiert

cependant la mise à disposition d'un matériel assez lourd et d'un personnel qualifié au sein d'une structure de thérapie cellulaire, respectant des conditions de manipulation et de contrôles drastiques. Cette méthodologie est susceptible d'être appliquée aux précurseurs hématopoïétiques de sang de cordon dans le cadre de greffe allogénique (Shpall, 1999). Ces champs d'applications pourraient également s'étendre à la thérapie génique proprement dite (remplacement d'un gène défectueux) ou en utilisant le concept de plasticité des cellules souches pour obtenir différents tissus (traitement de l'infarctus du myocarde par exemple).

2.1.2 *Betaherpesvirinae* et hématopoïèse

La possibilité que les *Betaherpesvirinae* dysrégulent l'hématopoïèse est supportée par l'observation de cytopénies au cours des infections actives à CMVH (Almeida-Porada and Ascensao, 1996) et HHV6 (Carrigan and Knox, 1994; Imbert-Marcille et al., 2000b; Wang et al., 1996). Les mécanismes de ces atteintes sont très partiellement élucidés, en particulier pour l'HHV6 où les données sont très peu nombreuses. Il est probable que les cytopénies soient la conséquence de l'intrication de plusieurs phénomènes, directs ou indirects et non mutuellement exclusifs.

L'infection *in vitro* de cellules stromales par des souches de CMVH a permis de démontrer leur permissivité à ce virus, dont la multiplication intracellulaire conduit à une perturbation de leur fonction de régulation de l'hématopoïèse (Simmons et al., 1990), par modification de la sécrétion de certains facteurs de croissance (Lagneaux et al., 1996b; Lagneaux et al., 1994). Le transfert de particules virales entre cellules myélofibroblastiques stromales infectées *in vitro* par le CMVH et cellules CD34+ en suspension a été observé (Michelson et al., 2001). Les cellules stromales médullaires pourraient donc constituer une source de virus pouvant contaminer secondairement les progéniteurs. La première étude d'infection *in vitro* par l'HHV6 de cellules stromales (Knox and Carrigan, 1992) a apporté la preuve d'un effet inhibiteur du virus sur la croissance de ces cellules. Dans ce même travail, une diminution de la croissance des progéniteurs myéloïdes et érythroïdes préalablement infectés par l'HHV6 a été montrée. La capacité du virus à interagir avec des cellules sécrétrices de cytokines et la mise en évidence d'une diminution des effets suppresseurs du virus en présence d'anticorps anti-IFN γ , ont amené les auteurs à concevoir, comme première hypothèse pour expliquer cet effet suppresseur, le rôle d'un facteur soluble comme l'interféron γ . La sécrétion de la cytokine serait modifiée au cours de l'interaction du virus et des cellules. L'étude suivante,

de la même équipe, a montré qu'il ne pouvait précisément s'agir de cette cytokine, mais sans doute d'une autre molécule soluble (Burd et al., 1993).

Au niveau des progéniteurs hématopoïétiques, les données actuellement disponibles sont en partie contradictoires et, en conséquence, difficiles à synthétiser dans un modèle physiopathologique cohérent. Ceci est lié à la grande diversité des méthodologies choisies, des sources de progéniteurs utilisées pour les essais, de la sélection ou non de cellules CD34 positives, des conditions de leur culture, en milieu liquide ou semi-solide, de la pratique ou non d'une infection, *in vitro*, par des souches virales et, enfin, des outils utilisés pour détecter la multiplication virale.

Les cellules CD34⁺ constituent très probablement un site de latence du CMVH et de l'HHV6, comme le suggère la détection de leur ADN génomique chez certains sujets séropositifs pour ces virus. Pour le CMVH, une détection de l'ADN viral dans les cellules CD34⁺ a ainsi été obtenue chez des patients immunodéprimés (Sindre et al., 1996; von Laer et al., 1995a) (Mendelson et al., 1996). D'autres essais ont conclu à l'absence d'ADN viral, notamment chez l'immunocompétent (Minton et al., 1994). La mise en évidence de transcrits spécifiques de la phase de latence au sein des progéniteurs myéloïdes (Kondo et al., 1996) conforte néanmoins cette hypothèse. Pour l'HHV6, la moelle constituerait à *minima* un des sites de persistance virale comme en témoigne la détection de l'ADN viral dans la moelle osseuse (Gautheret-Dejean et al., 2000) et dans les fractions de cellules de CD34⁺ de la moitié des patients séropositifs (Isomura et al., 1997; Luppi et al., 1999).

La plupart des études publiées concernent des essais d'infection *in vitro* de CSH par des souches virales, qui donnent des informations sur la permissivité de ces cellules et sur les conséquences de l'éventuelle multiplication virale. Ainsi, les essais des infections par le CMVH de CSH, après au moins 2 à 3 semaines de différenciation *in vitro* vers la lignée granulo-monocytaire (Maciejewski et al., 1992; Movassagh et al., 1996) ou vers la lignée mégacaryocytaire (Crapnell et al., 2000), en milieu liquide, rapportent la capacité des cellules différenciées en culture à supporter une réplication totale du virus. Ces essais ont cependant été conduits dans un contexte d'infection par de fortes doses de virus, qui ne retrace pas les conditions *in vivo*, où il est très probable que de telles charges virales ne soient pas atteintes. Pour certains auteurs, en dépit d'une démonstration d'une capacité d'infection des progéniteurs par le CMVH, l'infection demeure abortive dans ces cellules (Crapnell et al., 2000; Holberg-Petersen et al., 1996; Mendelson et al., 1996; Sindre et al., 1996). Un modèle plus récent d'infection *in vitro*, représenté par une suspension de progéniteurs sur une couche de cellules stromales murines irradiées, est une des voies nouvelles pour étudier, plus

précisément, les interactions du CMVH avec l'hématopoïèse, par le biais notamment des cytokines. A nouveau, cette étude rapporte l'effet myélosuppressif *in vitro* du CMVH et conclue, grâce à la technique de micro arrays, à un mode d'expression des gènes du virus différent à la fois de l'infection productive et non productive, qui pourrait correspondre à un état de latence particulier (Goodrum et al., 2002).

Pour l'HHV6, la possibilité de survenue d'un cycle de multiplication virale complet, après infection *in vitro* a été évoquée après détection du génome parental du virus par hybridation *in situ* (Isomura et al., 1997; Isomura et al., 2000). L'hypothèse d'une réplication virale totale de l'HHV6 n'a jamais été réellement recherchée, mais une étude en 1999 (Luppi et al., 1999) a souligné le rôle probable joué de la différenciation dans la réactivation de l'HHV6. Cette même équipe a démontré l'intégration d'une partie du génome de l'HHV6 dans le chromosome 17 faisant l'hypothèse d'une transmission longitudinale du virus par ce biais.

Les conséquences de la multiplication partielle ou totale des virus ont également été évaluées par quelques équipes. Les essais pratiqués sur des cultures de CSH milieu semi-solide ont clairement montré un effet inhibiteur de l'infection par le CMVH et l'HHV6 sur la prolifération des cellules souches. Pour le CMVH, cet effet a été, en particulier, démontré pour les CFU-GM (Maciejewski et al., 1992; Sing and Ruscetti, 1990) avec une supériorité dans cet effet des souches isolées de patients (Zhuravskaya et al., 1997). En ce qui concerne l'HHV6, cette infection s'accompagne d'une diminution de la prolifération des cellules souches pluripotentes (CFU-GEMM), des progéniteurs érythroblastiques (BFU-E) et granulomonocytaires (CFU-GM)(Burd et al., 1993; Isomura et al., 1997; Knox and Carrigan, 1992). Des données similaires ont été obtenues pour la lignée mégacaryocytaire, après infection par le CMVH (Crapnell et al., 2000)et l'HHV6 (Isomura et al., 2000). Certains auteurs ont émis l'hypothèse d'un mécanisme direct de destruction des cellules par le virus avec un effet suppresseur plus important des variants B (Drobyski et al., 1993a; Isomura et al., 1997).

2.2 Réplication virale au cours de la différenciation *in vitro* des cellules souches hématopoïétiques

Les travaux présentés dans ce troisième article sont actuellement soumis pour publication dans la revue Blood.

Ils ont été initiés en 2000 à l'issue d'une étude prospective menée au sein du laboratoire en collaboration avec le Pr N Milpied, visant à préciser le pouvoir pathogène de l'HHV6 chez des receveurs d'allogreffe ou d'autogreffe de CSH (Imbert-Marcille et al., 2000b). Cette étude a montré que plus de 40% des sujets greffés développent une infection active à HHV6 dans les premiers mois suivant la transplantation, et qu'elle est associée avec la survenue de cytopénies partielles voire totales. Lorsque la réactivation survient dans les deux premières semaines suivant le conditionnement, des allongements significatifs de la durée d'aplasie ont été observés. Cette étude a, par la suite, été complétée et confirmée par des mesures de la charge virale de HHV6 et HHV7 lors d'une collaboration avec le Pr H Agut (Boutolleau et al., 2003). Ceci nous a conduit à émettre l'hypothèse d'une atteinte de l'hématopoïèse au cours des infections actives et, parmi les différents mécanismes potentiels, la possibilité d'une réactivation du virus au cours de la différenciation des cellules progénitrices. Parallèlement, et en raison de la fréquence élevée de survenue des cytopénies au cours des infections actives à CMVH, une évaluation de la réplication de ce virus a également été effectuée.

Les essais ont été conduits à partir de prélèvements de cellules souches périphériques, obtenues par cytophérèse chez des patients receveurs d'une autogreffe, ayant donné leur consentement. Les cultures de cellules CD34+, dont le tri a été assuré par l'Unité de Thérapie Cellulaire et Génique du CHU de Nantes, ont été réalisées au sein de notre laboratoire. La lecture des cytopins réalisées au cours des cultures a été réalisée avec l'aide de Dr R Garand du laboratoire d'hématologie du CHU de Nantes.

2.2.1 Article n°3

Mise en évidence d'une réactivation de l'HHV6, et non du CMVH, au cours de la différenciation *ex vivo* de cellules souches périphériques CD34+.

"Reactivation of Human Herpesvirus 6 but not Cytomegalovirus occurs during ex vivo expansion of circulating CD34+ hematopoietic stem cells"

E. Andre-Garnier, N. Milpied, S. Saïagh, S. Billaudel, B.M. Imbert-Marcille.



Abstract

Infusion of ex vivo expanded hematopoietic stem cells is a means of reducing or avoiding high dose chemotherapy-induced neutropenia. Cytomegalovirus (CMV) and Human Herpesvirus 6 (HHV6) replication was evaluated during in vitro culture of CD34-positive cells selected from 10 peripheral blood progenitor cell (PBPCs) samples. Cultures were maintained for 14 to 21 days in a serum free medium supplemented with IL-1, -3, -6, GM- and G-CSF and Stemcell factor. Neither CMV DNA nor CMV UL21.5 or UL86 mRNA were detected among the 4 cultures from CMV seropositive patients. Conversely, the late alternatively spliced U100 mRNA (HHV6) was detected at day 14 or 21 in 5/10 cultures from HHV6 seropositive patients. Our data demonstrates for the first time that HHV6 could enter in a replicative cycle during hematopoietic differentiation in the absence of *in vitro* infection of cells. This raises the question of the viral safety of the infusion of ex-vivo expanded CD34 positive PBPCs.

1- Introduction

Infusion of ex vivo expanded hematopoietic stem cells to patients treated by high dose chemotherapy and/or total body irradiation has been proposed to reduce or avoid post-myeloablative neutropenia ^{1,2}. However, the possibility that *in vitro* differentiation of progenitors has led to γ -Herpesvirus reactivation must be considered, notably because various hematopoietic cells, including stem cells, are targets of Cytomegalovirus (CMV) and Human herpesvirus 6 (HHV6). Such tropism is expressed as partial or total marrow suppression which commonly occurs during active infections ^{3,5}. Physiopathological mechanisms have been only partially understood. CD34+ are now well recognized as one of the latency sites of both viruses ^{6,7}.

Moreover, assays of direct infection in vitro of CD34+ cells by HCMV strains ^{8,9,10} or by HHV6 strains ^{11,12}, showed that mature hematopoietic cells obtained after differentiation are permissive for these viruses.

Such studies have pointed out an inhibition of myeloid colony formation ^{8,13} and myeloid lineage has been established capable of supporting total HHV6 replication ¹⁴. With the aim of completing this data and of assessing the viral safety of infusion of ex vivo expanded CD34+ cells, we evaluate here the possibility that HHV6 and/or CMV reactivation occurs naturally during in vitro differentiation of myeloid progenitors cells.

2-Patients, material and methods

Peripheral blood progenitor cells (PBPCs) were collected, after informed, written consent, from ten patients (3 MM, 7 NHL) undergoing leukapheresis after cell mobilization with G-CSF (Neupogen®, Amgen, Munich, Germany) (5 μ g/kg/day for 5 days). Highly purified peripheral CD34+ cells were isolated using The Clinimacs Device (Milteny Biotec, Bergisch-

Gladbach, Germany)¹⁵. Purity, as determined by flow cytometry ranged from 95% to 99% CD34 positive cells. Serostatus for HHV6 and CMV was determined by ELISA (Human Herpesvirus 6 IgG EIA, Biotrin, Dublin, Ireland and CMV Enzygnost alpha-method, Dade-Behring, Frankfurt, Germany).

Ex vivo expansions of 10^6 CD34+ PBPCs were performed for 14 or 21 days in 10 ml Stem $\square$ G® medium (Stem alpha, Lyon, France) with IL-1, IL-3, IL-6, GM-CSF, G-CSF, Stemcell factor (10ng/ml each), supplemented with antibiotics (penicillin 10^3 U/ml, colymicin $2.5 \cdot 10^3$ U/ml, streptomycin 10 mg/ml). Every 7 days, cells were counted: 10^6 were resuspended in a fresh medium for culture continuation and aliquots of 5×10^5 to 10^6 cells were frozen at -80°C for subsequent molecular analysis. At the end of the culture process, additional aliquots, if available, were removed for cytopins (stained with May Grunwald Giemsa). Supernatants from 2 cultures were also recovered for cultivation for a period of 21 days on peripheral blood leukocytes: cells were harvested every 7 days and evaluated for HHV6 antigen expression by flow cytometry¹⁶.

- Detection of viral DNA and mRNA

Viral genomes and their late products were detected according to procedure adapted from previously developed techniques^{17,18,16} (Andre 2003) in nested format. The first round of amplification was run with degenerated PE1 and PE2 primers¹⁶, C1 and C2 primers¹⁸ and CMCP1 and CMCP2 primers¹⁷ for the alternatively spliced U100 HHV6-A and HHV6-B gene, the spliced UL21.5 CMV gene and the unspliced UL86 CMV gene respectively. Nested PCR were conducted using newly designed internal primers: 5'GTGGTTTCAGGCGCYCATAG3' and 5'GCGATGAYAAAYAGCTGCGGTTC3' for U100 (Y= T and C); 5'CCTTGACGGTGGCTTGG3' and 5'GAGTAATCTTCGTCTCCGTC3' for UL21.5; 5'GTACGGCACGGTCCCGGTTTAG3' and 5'GGAAACTTGCGGCGCGTCTAC3' for UL86.

Total DNA was extracted from 5.10^5 cells using the QIAamp® DNA extraction kit (QIAGEN, Chatsworth, CA). Amplifications were run in a total volume of 25 μ l: 2.5 μ l 10X buffer, 2mM MgCl₂, 200 μ M of each dNTP, 1 μ M of each related primer, 0.625U Taq polymerase (Promega, Carbonniere, France) and 4 μ l of DNA extract. 35 cycles were run as follows: 30s at 94°C, 40s at 58°C (U100), 60°C (UL86) or 62°C (UL21.5) and 95s at 72°C. Nested PCR was conducted on 2 μ l of the first round PCR product in a final volume of 25 μ l in the same conditions as the first round except for 1.5mM MgCl₂ and annealing temperature of 65°C (U100), 60°C (UL21.5) or 67°C (UL86).

RNA were extracted from 10^6 cells using QIAamp viral RNeasy® extraction kit (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France), including DNase treatment. One step RT PCR were conducted using either mRNA selective PCR kit (AMV) (TakaRa-Biomedicals distributed by Biowhittaker, Europe) for amplification of unspliced UL86 and alternatively spliced U100 mRNA, as previously described (annealing temperature of 57°C for UL86) ¹⁶, or Superscript™ One step RT-PCR with platinum® *taq* (Invitrogen, Life technologies, Cergy Pontoise, France) for amplification of the spliced UL21.5 mRNA. For the latter, RT-PCR was carried out in a volume of 25 μ l (4 μ l RNA extract, 0.5 μ M of C1 and C2, 2.5 mM MgCl₂, 12.5 μ l 2X buffer, 1 μ l of RT/Platinum® *taq*) and the amplification conditions were: 45 min RT at 50°C, 5 min at 94°C and then 40 cycles (94°C for 30s, 65°C for 30s and 72°C for 60s). Nested PCR were performed on 2 μ l of first round PCR, as described.

Expected sizes of nested PCR and RT-PCR products were 238 bp for U100 spliced cDNA and 339bp (HHV6A)/371 bp (HHV6B) for U100 unspliced cDNA and DNA; 155 bp for cDNA and 239 bp for DNA from CMV UL21.5 and 205 pb of UL86. Specificity of amplification was assessed with 10 ng/ml biotinylated probes (S1 for U100 cDNA and S2 for DNA ¹⁶; 5'ACTCTCAGTCAGGGGGG3' for UL 21.5 and CMCP3 for UL86 ¹⁷ using colorimetric plate hybridization, using GEN-ETI-, -K™ (Diasorin, Sulluggia, Italy) ¹⁹. Controls consisted

of the detection of human glucose 6 phosphate deshydrogenase mRNA on all samples²⁰ and viral genes amplifications on extracts obtained from cultures of AD169 CMV and HST HHV6 reference strains.

3- Results and discussion

Among the 10 ex vivo expansions performed in this study (table 1), 5 (2, 4, 5, 9-10) were maintained for 21 days, with a fold increase of total nucleated cells (TNC) at end of culture ranging from 3 to 216 (median 18), whereas the others could not be expanded beyond two weeks (1, 3, 6-8), with a related TNC fold increase ranging from 0.5 to 6 (median 1). As expected, mature cells were obtained in higher proportions after 21 days, represented by monocytes or neutrophils as expected with cytokines added in media. These results are in accordance with previous studies conducted in liquid media without serum²¹. Failure or weak expansion was not related to age, sex or underlying disease of patients, but was more frequently observed in CMV seropositive patients.

None of the 4 cultures from CMV seropositive patients were found to be positive for late CMV mRNA (Table 1). CMV DNA remained negative in 2 of the 4 evaluated cultures. This means that, even if culture conditions in liquid media have been identified to favour viral replication in stem cells cultured after in vitro infection^{8,9}, no CMV reactivation occurs naturally during ex vivo expansion review by Maciejewski³.

Among the 10 cultures from HHV6 seropositive patients, half expressed the alternatively spliced HHV6 U100 mRNA (figure 1, table 1). The early unspliced form of 3 cultures was amplified at day 14. Two of them were stopped at this time (6,7) and a PCR inhibitor was detected at day 21 of the other culture (10). The late spliced form, which assesses occurrence of a complete replication cycle, was detected at the end of cultures 8 and 9. This data was confirmed in a second set of experiments and because cultures were not performed at the

same time, viral cross-contamination can be excluded. The length of amplified DNA fragments allowed us to affirm that HHV6 strains were B variants in all cases. Failure of attempts at isolating infectious virus from frozen day 21 supernatant samples (cultures 9 and 10) did not refute the occurrence of viral replication, because cultures are less sensitive than nested PCR, particularly in the context of unfrozen sample cultivation. Moreover, it didn't exclude the occurrence of a non lytic productive viral growth, as previously described for CMV in macrophages²². Our PCR failed to detect HHV6 DNA in unexpanded CD34+, which has been identified as carrying viral genome in one third of patients¹³, whereas HHV6 DNA was detected on all mRNA positive samples. This shows an increase of DNA load, which became detectable during the differentiation process, thus confirming the occurrence of genome replication. It also demonstrates that samples were not obtained from patients who were developing active HHV6 infection at the time of sampling. Our data thus demonstrates for the first time, and in the absence of *in vitro* infection of cells, that HHV6 could enter into a replicative cycle during hematopoietic differentiation.

Although there was only a small number of cultures, we observed a trend towards a less efficacious CD34+ differentiation among culture with HHV6 reactivation: fold increases were lower (0.5 to 64 vs 1 to 216) and mature cells less abundant, particularly in cultures that had run for 21 days. This may reflect the myelosuppressive effect of the virus, previously demonstrated during *in vitro* infection assays of bone marrow stem cells^{11,23}.

Our results highlight the potential role of hematopoietic progenitors as a source of HHV6, which can reactivate during differentiation of cells, thus confirming the hypothesis of Luppi¹³. This may explain the infection of peripheral blood leukocytes during active infection, notably monocytes/macrophages which had been recently recognized as the dominant permissive cell population responsible for HHV6 viremia²⁴. In addition, our data raises the

question of the possibility of infecting recipients during the infusion of high quantities of ex vivo expanded CD34⁺ cells.

Acknowledgments

We thank Alain Cassidanius and Sylvain Bercegeay for PB CD34⁺ selection and Daniele Pineau for expert technical help in progenitors culture.

4- References

1. Paquette RL, Dergham ST, Karpf E, Wang HJ, Slamon DJ, Souza L, Glaspy JA. Ex vivo expanded unselected peripheral blood: progenitor cells reduce posttransplantation neutropenia, thrombocytopenia, and anemia in patients with breast cancer. *Blood*. 2000;96:2385-2390.
2. Pecora AL. Progress in clinical application of use of progenitor cells expanded with hematopoietic growth factors. *Curr Opin Hematol*. 2001;8:142-148.
3. Maciejewski JP, St Jeor SC. Human cytomegalovirus infection of human hematopoietic progenitor cells. *Leuk Lymphoma*. 1999;33:1-13.
4. Wang FZ, Dahl H, Ljungman P, Linde A. Lymphoproliferative responses to human herpesvirus-6 variant A and variant B in healthy adults. *J Med Virol*. 1999;57:134-139.
5. Imbert-Marcille BM, Tang XW, Lepelletier D, Besse B, Moreau P, Billaudel S, Milpied N. Human herpesvirus 6 infection after autologous or allogeneic stem cell transplantation: a single-center prospective longitudinal study of 92 patients. *Clin Infect Dis*. 2000;31:881-886.
6. Kondo K, Xu J, Mocarski ES. Human cytomegalovirus latent gene expression in granulocyte-macrophage progenitors in culture and in seropositive individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:11137-11142.
7. Kondo K, Sashihara J, Shimada K, Takemoto M, Amo K, Miyagawa H, Yamanishi K. Recognition of a novel stage of betaherpesvirus latency in human herpesvirus 6. *J Virol*. 2003;77:2258-2264.
8. Maciejewski JP, Bruening EE, Donahue RE, Mocarski ES, Young NS, St Jeor SC. Infection of hematopoietic progenitor cells by human cytomegalovirus. *Blood*. 1992;80:170-178.
9. Movassagh M, Gozlan J, Senechal B, Baillou C, Petit JC, Lemoine FM. Direct infection of CD34+ progenitor cells by human cytomegalovirus: evidence for inhibition of hematopoiesis and viral replication. *Blood*. 1996;88:1277-1283.
10. Zhuravskaya T, Maciejewski JP, Netski DM, Bruening E, Mackintosh FR, St Jeor S. Spread of human cytomegalovirus (HCMV) after infection of human hematopoietic progenitor cells: model of HCMV latency. *Blood*. 1997;90:2482-2491.

11. Burd EM, Knox KK, Carrigan DR. Human herpesvirus-6-associated suppression of growth factor-induced macrophage maturation in human bone marrow cultures. *Blood*. 1993;81:1645-1650.
12. Isomura H, Yamada M, Yoshida M, Tanaka H, Kitamura T, Oda M, Nii S, Seino Y. Suppressive effects of human herpesvirus 6 on in vitro colony formation of hematopoietic progenitor cells. *J Med Virol*. 1997;52:406-412.
13. Luppi M, Barozzi P, Morris C, Maiorana A, Garber R, Bonacorsi G, Donelli A, Marasca R, Tabilio A, Torelli G. Human herpesvirus 6 latently infects early bone marrow progenitors in vivo. *J Virol*. 1999;73:754-759.
14. Yasukawa M, Ohminami H, Sada E, Yakushijin Y, Kaneko M, Yanagisawa K, Kohno H, Bando S, Fujita S. Latent infection and reactivation of human herpesvirus 6 in two novel myeloid cell lines. *Blood*. 1999;93:991-999.
15. Schumm M, Lang P, Taylor G, Kuci S, Klingebiel T, Buhring HJ, Geiselhart A, Niethammer D, Handgretinger R. Isolation of highly purified autologous and allogeneic peripheral CD34+ cells using the CliniMACS device. *J Hematother*. 1999;8:209-218.
16. Andre-Garnier E, Robillard N, Costa-Mattioli M, Besse B, Billaudel S, Imbert-Marcille BM. 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.
17. Gozlan J, Salord JM, Chouaid C, Duvivier C, Picard O, Meyohas MC, Petit JC. Human cytomegalovirus (HCMV) late-mRNA detection in peripheral blood of AIDS patients: diagnostic value for HCMV disease compared with those of viral culture and HCMV DNA detection. *J Clin Microbiol*. 1993;31:1943-1945.
18. Andre E, Imbert-Marcille BM, Cantarovich D, Besse B, Ferre-Aubineau V, Billaudel S. Use of reverse transcription polymerase chain reaction with colorimetric plate hybridization to detect a cytomegalovirus late spliced mRNA in polymorphonuclear leukocytes from renal transplant patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1999;34:287-291.
19. Ferre-Aubineau V, Imbert-Marcille BM, Raffi F, Besse B, Loirat R, Billaudel S. Colorimetric microtiter plate hybridization assay using monoclonal antibody for detection of an amplified human immunodeficiency virus target. *J Virol Methods*. 1995;55:145-151.
20. Soderberg C, Larsson S, Bergstedt-Lindqvist S, Moller E. Definition of a subset of human peripheral blood mononuclear cells that are permissive to human cytomegalovirus infection. *J Virol*. 1993;67:3166-3175.
21. Mahe B, Pineau D, Robillard N, Accard F, Hermouet S. Ex vivo expansion of hematopoietic progenitors from CD34+ cells selected from leukapheresis products of

lymphoma and myeloma patients: feasibility and enhancement by fibronectin. *J Hematother.* 1996;5:671-679.

22. Fish KN, Britt W, Nelson JA. A novel mechanism for persistence of human cytomegalovirus in macrophages. *J Virol.* 1996;70:1855-1862.

23. Drobyski WR, Dunne WM, Burd EM, Knox KK, Ash RC, Horowitz MM, Flomenberg N, Carrigan DR. 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.

24. Kondo K, Kondo T, Shimada K, Amo K, Miyagawa H, Yamanishi K. Strong interaction between human herpesvirus 6 and peripheral blood monocytes/macrophages during acute infection. *J Med Virol.* 2002;67:364-369.

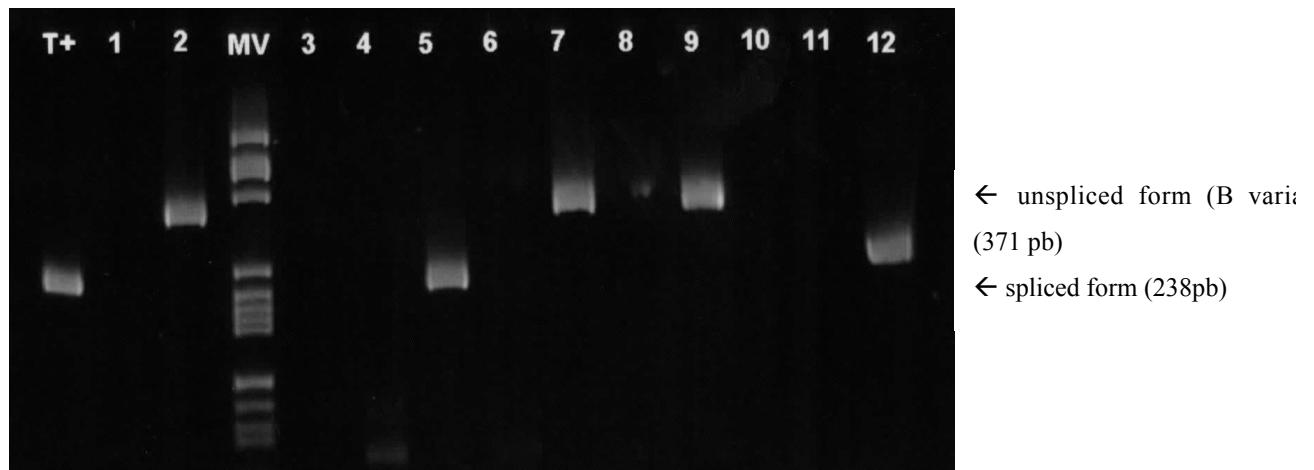


Figure 1 : Polyacrylamid gel electrophoresis of U100 HHV6 RT-PCR products on five ex vivo expansions of CD34+ progenitors in presence of IL1, IL3, IL6, SCF, GM-CSF, G-CSF.

Lane T+: positive control spliced mRNA ; Lane MV: size Marker

Culture 6, d0 (lane 1) and d14 (lane 2); Culture 9, d0 (lane 3),d14 (lane 4) and d21 (lane5); Culture 7, d0 (lane 6) and d14 (lane 7); Culture 10 d0 (lane 8)and d14 (lane 9); Culture 8 d0 (lane 10), d7 (lane 11) culture 8 and d14 (lane 12).

Table 1 : Results of ex vivo expansion of 10 peripheral CD34+ samples and evaluation of HCMV and HHV6 replication during culture

Patients characteristics				Characteristics of <i>ex vivo</i> expansion					Time of detection of viral DNA and viral mRNA					
n°	Age/ Sexe	Pathology	Serostatus		Duration of culture	Fold increase at end of culture	Differentiation of cells at end of culture			CMV (UL22 and UL86)		HHV6 (U100)		
			CMV	HHV6			blast	Immature granulocytes	neutrophil monocytes	DNA	mRNA	DNA	Unspliced mRNA	Spliced mRNA
1	41/ M	NHL	+	+	14 days	1	1%	79%	0%	20%	-	-	-	-
2	55/ F	NHL	+	+	21 days	3	2%	64%	3%	36%	-	-	-	-
3	54/ F	NHL	-	+	14 days	6	nd	nd	nd	nd	-	-	-	-
4	61/ M	MM	-	+	21 days	72	2%	61%	0%	37%	-	-	-	-
5	47/ M	NHL	-	+	21 days	216	0%	54%	1%	45%	-	-	-	-
6	47/ M	NHL	+	+	14 days	0.5	nd	nd	nd	nd	nd	-	+(d14)	-
7	63/ M	MM	+	+	14 days	0.6	10%	71%	0%	19%	nd	-	+(d14)	-
8	54/ M	NHL	-	+	14 days	4	2%	69%	0%	28%	-	-	+(d14)	+(d14)
9	45/ M	NHL	-	+	21 days	18	1%	76%	0%	23%	-	-	+(d14)	+(d21)
10	61/ F	MM	-	+	21 days	64	1%	68%	0%	30%	-	-	+(d14)*	-*

Abbreviations : NHL, non- Hodgkin's Lymphoma; MM, multiple myeloma; D, day ; ND, not determined

* G6PD mRNA was positive in all cDNA samples except on day 21 of culture10

**Cytospins of expanded CD34+ progenitor cells, at the end of the culture, stained with May Grunwald Giemsa coloration and counted in triplicate : data were expressed in mean percentages

2.2.2 Commentaires Article n°3

Les échantillons de cellules souches périphériques ont été obtenus dans le cadre d'un essai clinique, dont l'objectif principal était d'évaluer un protocole d'expansion *ex vivo* de cellules souches hématopoïétiques périphériques CD34+. Après obtention de leur consentement, des patients atteints de myélome multiple ou de lymphomes non hodgkiniens et candidats à une autogreffe dans le cadre d'une intensification de la chimiothérapie ont été inclus. Les cultures en vue de l'étude de la réplication virale ont été effectuées pour 10 sujets (3 atteints de myélome multiple et 7 présentant un lymphome), pour lesquels un excédent de CSH avait été obtenu après stimulation par G-CSF à la dose de 5 µg/kg/jour. Les 10 patients étaient tous séropositifs pour l'HHV6 et 4 d'entre eux l'étaient vis à vis du CMV. Ce chiffre, défavorisant l'étude de la réactivation du CMV, est représentatif des séroprévalences respectives pour ces deux virus en France.

Les cellules CD34+ ont été sélectionnées stérilement grâce à un système de colonnes basé sur l'utilisation de billes magnétiques recouvertes d'anticorps anti-CD34+ (cliniMACS, Milteny-Biotec), permettant d'obtenir une pureté excellente (toujours supérieure à 95%) de l'échantillon destiné à la culture supérieure. Les cultures ont été effectuées en milieu liquide, en présence de facteurs de compétence et de croissance des granuleux et des monocytes-macrophage, en l'absence de sérum de veau foetal, qui a été remplacé par de l'albumine sérique humaine. Le choix de ce milieu de croissance a été motivé par divers éléments : des essais d'infection de CSH par le CMV ont montré que la culture en milieu liquide est favorable à la multiplication virale (Maciejewski et al., 1992; Movassagh et al., 1996; Zhuravskaya et al., 1997), l'absence de sérum de veau est indispensable dans le cadre d'une réinjection à des patients de cellules différenciées *ex vivo* et les lignées myéloïdes constituent des cibles majeures de CMV et de l'HHV6, notamment au niveau du sang périphérique. Une des limites des essais en milieu liquide est de rendre difficile une évaluation précise de la différenciation et de la prolifération de chacune des lignées. La réalisation d'une formule simplifiée (blastés, granulocytes immatures, neutrophiles et monocytes) sur des cytopins colorées au May Grunwald Giemsa a, cependant, permis d'évaluer le stade de différenciation atteint à l'arrêt de la culture (Figure 17). Les conditions de culture sélectionnées pour notre étude ont montré des différences d'efficacité en fonction des échantillons et l'expansion n'a pu être poursuivie au-delà du 14ème jour pour la moitié d'entre elles.

Cellules souches CD34+ à
J0

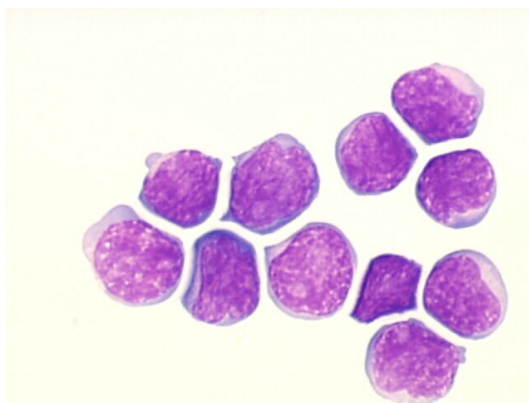


Figure 17 a

Granuleux immatures et
monocytes/Macrophages à
J15

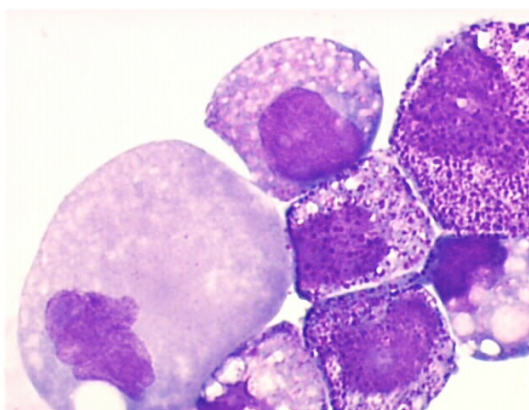


Figure 17b

Cellules granuleuses
en voie de maturation et
monocytes/macrophages
à J21

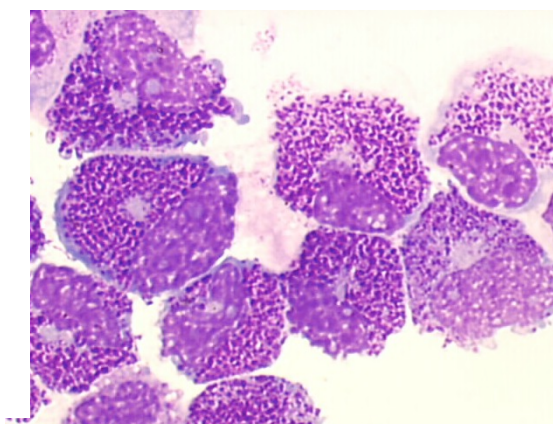


Figure 17c

Figure 17 : Morphologie des cellules, après coloration au May-Grünwald-Giemsa (x100), obtenues à différents temps d'expansion ex vivo de CSHP CD34+ : J 0 (17a), J14 (17b), J21 (17c) (Clichés, Laboratoires d'Hématologie et de Virologie, CHU Nantes)

La variabilité de l'indice de croissance obtenu pour nos 10 cultures est en accord avec les résultats d'autres études d'expansion, *ex vivo*, qui soulignent leur disparité en fonction des échantillons (Heike and Nakahata, 2002). Par ailleurs, nos résultats d'expansions sont comparables à ceux d'autres équipes (Mahe et al., 1996).

Pour chacun des échantillons, la recherche de transcrits, témoins de la réplication virale, a toujours été privilégiée par rapport à la détection des ADN génomiques des virus. Les techniques de PCR et RT-PCR, dont le développement a été présenté dans les articles 1 et 2, ont été adaptées afin d'obtenir un gain en terme de sensibilité, permettant de détecter un événement probablement rare et de limiter la quantité de cellules extraites. La technique d'extraction a été uniformisée, en utilisant la technique sur colonne Qiagen, associée au traitement à la DNase. Pour le CMVH, cette modification a été réalisée après s'être assuré de l'absence de perte de sensibilité. Par ailleurs, la détection de l'ARNm UL22 a été adaptée en une seule étape, en choisissant, puisque ce transcrit est épissé, la méthode Superscript®. La difficulté de mise en évidence d'une réplication virale, observée pour les deux virus au cours des essais d'infection *in vitro* par des souches virales, est à l'origine de la mise en place de PCR nichées. Cette procédure a été réalisée en respectant des conditions de sécurité drastiques pour limiter la contamination par les amplicons. Ainsi le principe de « marche en avant » a été évidemment respecté et une pièce sécurisée, par un sas et où aucune autre manipulation de biologie moléculaire n'était réalisée, a été utilisée pour préparer les PCR nichées.

Les résultats concernant l'absence de mise en évidence de la réplication du CMVH au cours des quatre expansions des cellules souches des patients séropositifs pour ce virus sont peu surprenants. En effet, très peu d'études ont à ce jour pu montrer l'existence d'une multiplication virale, qui ne survient qu'après infection avec des doses infectieuses importantes de virus et uniquement après 28 jours de cultures, lorsqu'un stade très tardif de différenciation macrophagique est atteint (environ 4 semaines) (Crapnell et al., 2000; Maciejewski et al., 1992; Zhuravskaya et al., 1997). Par ailleurs, l'ADN viral n'a pu être détecté sur les deux cultures pour lesquels le nombre de cellules a permis sa recherche. Sur ce très faible nombre d'échantillons, la détection de l'ADN du CMVH dans des extraits obtenus à partir d'échantillons deux fois plus riches en CD34+ issus de la moelle osseuse (Mendelson et al., 1996), n'a donc pas été reproduite. De plus, une étude précédente sur la recherche de la présence d'ADN du CMVH dans les CSHP CD34+ a montré que le génome viral n'était

détecté non pas dans tous échantillons de cellules de patients séropositifs mais uniquement dans 1/3 d'entre eux (von Laer et al., 1995a).

En ce qui concerne l'HHV6, nous montrons, pour la première fois, la présence d'ARNm messagers viraux, apparaissant au cours de la différenciation, après 14 à 21 jours de culture. Ceci est observé pour la moitié des échantillons provenant de sujets séropositifs et parmi les caractéristiques des patients, ni la maladie sous-jacente, ni l'âge ou le sexe ne semblent être reliés à la réactivation virale. La forme non épissée, exprimée précocement au cours du cycle, est détectée dans trois des cultures, alors que la forme épissée tardive est présente dans les deux autres cultures. Pour la culture 10, il est intéressant de préciser que la présence d'un inhibiteur de PCR dans les prélèvements effectués à J21 a compromis l'amplification de l'ADN et de l'ARNm. L'ADN de HHV6 a été mis en évidence de façon concomitante avec les ARNm dans les 3 cultures pour lesquelles la PCR a pu être réalisée, mais n'a pas été détecté dans aucun des prélèvements initiaux. Cette absence de détection des j0 peut s'expliquer par une moins bonne sensibilité de notre technique de PCR par rapport celles d'autres études, où l'ADN HHV6 a été retrouvée pour la moitié des échantillons initiaux (Isomura et al., 1997; Luppi et al., 1999). Elle permet d'éliminer l'hypothèse que les échantillons ayant présenté une réactivation ait pu être prélevés chez des sujets présentant une infection active au moment de la réalisation de la cytophérèse. Enfin, nos résultats montrent que la charge virale ADN a progressivement augmenté au cours de la différenciation, devenant détectable, à partir du 14^{ème} jour, dès l'atteinte du seuil de sensibilité de notre technique. Ceci suggère qu'une réplication de l'ADN viral soit survenue au cours de la différenciation, attestant de la réalité de la multiplication virale. La démonstration absolue d'une multiplication virale aurait pu être apportée par la mise en évidence par culture de virus infectieux, ce qui n'a pu être recherché que pour deux des expansions. Les essais menés à partir des surnageants décongelés n'ont pas permis d'isoler de virions. Ceci ne réfute toutefois pas l'existence d'une réplication virale, notamment en raison de la sensibilité plus faible des techniques de cultures par rapport à celles de génétique moléculaire, surtout dans un contexte d'inoculation après une phase de décongélation. Par ailleurs, ceci n'exclut pas la survenue d'un cycle de multiplication non lytique, comme cela a été décrit dans les macrophages pour le CMVH (Fish et al., 1996).

Il est difficile de déterminer formellement les conséquences de la réactivation sur notre petit échantillon, d'autant plus que nous ne disposons pas de contrôle négatif de référence (progéniteurs non infectés) comme dans les essais d'infections. En comparant les performances des expansions en fonction de la détection ou non d'ARNm, il apparaît

toutefois que le taux de croissance et le pourcentage de cellules matures sont globalement plus élevés en l'absence de réactivation. Dans notre étude, l'existence d'un effet myélosuppresseur tel qu'il a été démontrée après infection *in vitro* (Burd et al., 1993; Isomura et al., 1997; Knox and Carrigan, 1992) ne peut être affirmée. La différence d'intensité de la réplication et du nombre de cellules infectées entre les deux situations pourrait en être l'explication.

Par ailleurs, la méthodologie utilisée pour ces travaux n'est pas contributive pour identifier le ou les types cellulaires dans lesquels est survenue la réactivation. Cependant, en raison du délai minimal de 14 jours de culture, il est envisageable qu'elle prenne place dans des cellules matures, telles que les monocytes, identifiés, au niveau du sang périphérique comme permissifs au virus (Kondo et al., 2002a). Des expériences additionnelles, visant notamment à rechercher des antigènes tardifs par immunofluorescence ou des ARNm par PCR *in situ* permettraient de vérifier cette hypothèse.

Enfin, même si la réplication virale est probablement limitée à quelques cellules, comme en témoigne la nécessité d'utiliser une technique de RT-PCR très sensible pour la mettre en évidence, nos travaux soulèvent le problème de la sécurité virale. En effet, les doses de cellules différenciées réinjectées au patient sont très élevées, en moyenne de 40×10^6 cellules/kg (McNiece et al., 2000), et en raison de l'immunodépression présentée par les candidats à ce type de thérapie, la possibilité d'initier une infection active ne peut être exclue. Ce point témoigne de l'importance d'effectuer des contrôles virologiques au cours des expansions, à l'instar des procédures généralement mises en place dans les protocoles de thérapie cellulaire.

DISCUSSION GENERALE

Il est maintenant établi que certaines infections virales représentent des facteurs majeurs de morbidité et de mortalité dans les suites de greffes de cellules souches hématopoïétiques, en particulier après les allogreffes. Parmi les microorganismes les plus fréquemment impliqués, le CMVH est un des virus les plus délétères, responsable de cytopénies et, dans certains cas de pneumopathies interstitielles potentiellement mortelles. L'HHV6, dont le pouvoir pathogène reste sujet à controverse, a été impliqué dans des épisodes de cytopénies, dont certains sont associés à des prolongations, parfois importantes, de la durée d'aplasie (Imbert-Marcille et al., 2000b). Ces deux virus, membres de la sous famille des *Betaherpesvirinae*, partagent de nombreuses caractéristiques communes, parmi lesquelles un tropisme important pour le système hématopoïétique. Les leucocytes du sang périphérique constituent des sites de latence majeurs (essentiellement les monocytes) et, au cours des infections actives, certains types cellulaires (polynucléaires et monocytes pour le CMVH; monocytes et lymphocytes CD4+ pour HHV6) supportent une multiplication virale. L'évènement premier responsable de cette infection périphérique n'est pas connu. L'hypothèse qu'elle résulte d'une contamination des cellules progénitrices des leucocytes n'a pas été formellement démontrée. Il existe pourtant un faisceau d'arguments qui l'étaye. Les CSH représentent un site de latence pour les deux virus (Luppi et al., 1999; Maciejewski and St Jeor, 1999). Des essais d'infection *in vitro* par de fortes doses de CMVH ont montré que ces cellules étaient aptes à supporter, au cours de leur différenciation, un cycle de multiplication complet (Movassagh et al., 1996). La présence de l'HHV6, au cours de la différenciation de cellules infectées, a été également montrée par la détection de son génome ou de certains de ces antigènes précoces (Burd et al., 1993; Isomura et al., 2000). La possibilité que le processus de différenciation hématopoïétique induise naturellement une réactivation de l'HHV6 n'a été envisagée qu'au cours d'une seule étude, utilisant une culture en milieu semi-solide, qui n'a pu démontrer sa survenue (Luppi et al., 1999). Dans ce contexte et en utilisant une approche en milieu liquide, notre objectif principal a été d'évaluer l'éventualité d'une réplication du CMVH et/ou de l'HHV6 survenant au cours de la différenciation de CSH prélevées chez des sujets séropositifs vis à vis de l'un ou des deux virus.

La mise en place de moyens d'investigation adaptés à l'étude de la multiplication de chacun des virus a constitué la première étape de ce travail. A l'instar de tous les autres *Herpesviridae*, la distinction entre la latence et l'infection active, survenant au cours des primo infections ou à la suite de réactivations, est essentielle. En confirmant ou en infirmant la survenue d'une infection lytique dans des compartiments biologiques ciblés, les outils

sélectionnés doivent permettre d'étudier à la fois les interactions virus/cellules *in vitro* et, en les utilisant comme marqueurs virologiques, de mieux définir le pouvoir pathogène des virus étudiés. La détection indirecte par la sérologie est très peu contributive et ne constitue en aucun cas un outil utilisable lors d'études d'infections *in vitro*. Cette constatation est encore plus vraie pour l'HHV6, en raison de sa forte séroprévalence dès le plus jeune âge et de l'intérêt limité des tests sérologiques. Parmi les méthodes d'évaluation directe, la culture du CMVH sur fibroblastes humains, même si elle demeure la technique de référence (la seule permettant de s'assurer du caractère infectieux des virus isolés) se heurte à un manque de sensibilité et reste délicate. De même, si la co-culture de l'HHV6 sur lymphocytes doit être maîtrisée au sein d'un laboratoire spécialisé, elle demeure fastidieuse. L'effet cytopathogène de ce virus est, entre autres difficultés, parfois très discret voire non visible. L'apport des approches basées sur la génétique moléculaire est, de part leur rapidité et leur sensibilité, incontestable. Il est, cependant, essentiel de préciser la nature des génomes que l'on souhaite cibler. L'amplification des génomes parentaux ADN dans les cellules cibles par PCR se heurte aux risques de détection d'une forme latente du virus (sites de latence et de réactivation souvent identiques), limitant l'utilisation de cette technique pour affirmer l'implication de virus réplicatifs. La quantification de l'ADN génomique, par des méthodes précises et reproductibles tels que les PCR en temps réel (Gautheret-Dejean et al., 2002; Najioullah et al., 2001), peut être utilisée comme marqueur indirect de la réplication virale, qui est associée à un accroissement de la charge ADN. Elle trouve un intérêt certain comme marqueur biologique, permettant le suivi des infections actives (Boeckh and Boivin, 1998; Boutolleau et al., 2003; Imbert-Marcille et al., 1997b). Son utilisation pour l'étude des interactions virus/cellules est, néanmoins, compromise par la nécessité d'établir un seuil de charge virale au-delà duquel le stade d'infection active peut être affirmé. La mise en évidence d'une réplication virale complète avec expression des ARNm tardifs et/ou de la synthèse des protéines tardives par cytométrie de flux constituent deux autres approches complémentaires et relativement novatrices. Ces méthodes, que nous avons choisies de développer pour le CMVH et l'HHV6, sont non seulement adaptées à l'étude de la réplication virale, *in vitro*, mais représentent également de nouveaux marqueurs potentiels en biologie clinique pour le suivi des infections actives chez des patients immunodéprimés.

La sélection des régions cibles pour l'amplification des ARN messagers a été effectuée parmi le vaste choix offert par chaque génome viral (202 cadres de lecture ouverte pour le CMVH, environ 120 pour l'HHV6). Parmi les gènes reconnus pour être exprimés à la phase tardive du cycle, les gènes UL22 (R27080s) pour le CMVH et U100 pour HHV6 ont la particularité

intéressante d'être épissés. Alors que les données disponibles dans la littérature au moment du développement des outils destinées à leur détection étaient assez limitées, de nouvelles études ont apporté, depuis, des renseignements intéressants, en particulier pour le CMVH.

Le gène tardif UL22, qui en raison de sa petite taille (495 pb) n'avait pas été décrit précisément lors du séquençage initial de la souche de référence AD169 (Chee et al., 1990), code pour une glycoprotéine de 45 kDa, composée de 103 acides aminés (Mullberg et al., 1999). Elle est abondamment sécrétée à la phase tardive du cycle viral et pourrait représenter la première virokinine décrite pour le CMVH (Mullberg et al., 1999). Nous avons pu démontrer, au cours du séquençage de 30 souches cliniques (données personnelles), l'existence d'un polymorphisme génétique au sein du transcrit, qui vient d'être confirmé très récemment (Scott et al., 2002). Ce polymorphisme nous permet de classer les souches en 3 groupes, auxquels sont rattachés respectivement les souches de référence AD169, Towne et Toledo. Le séquençage du gène viral à partir d'un nombre plus important d'extraits leucocytaires, obtenus chez des sujets présentant une infection active, et son analyse en fonction des données clinico-biologiques est actuellement en cours. Ce travail devrait permettre de mieux comprendre les conséquences de cette variabilité génétique qui peut théoriquement affecter, en raison des fonctions supposées de cette glycoprotéine, la capacité d'interaction avec le système immunitaire. De telles observations ont déjà été effectuées au sein du laboratoire et ont montré que le polymorphisme naturel des gènes IE1 (UL122/123) et gB (UL55) (Retiere et al., 1998; Retiere et al., 2003) peut, dans certains contextes HLA, modifier l'efficacité de la réponse immunitaire T.

Par ailleurs, des travaux très importants pour la virologie, car ils remettent partiellement en cause la définition originelle de Lwoff, ont apporté des arguments particulièrement pertinents pour la compréhension des interactions CMVH/polynucléaires. La mise en évidence, au sein des virions, de quatre ARNm viraux, dont celui du gène UL22 (Bresnahan and Shenk, 2000), associée à l'observation de mécanismes de fusions entre cellules endothéliales infectées et polynucléaires (Gerna et al., 2000b; Revello et al., 1998), ont démontré l'existence d'une phagocytose des particules virales par les polynucléaires. Ces travaux remettent en cause, au moins du point de vue de la détection de l'ARNm UL22, l'existence d'un cycle de réplication complet du virus au sein des polynucléaires, telle que nous l'avions suggéré dans notre travail (Andre et al., 1999). Ils expliquent également la présence de cet ARNm au sein de préparations de virions purifiées par ultracentrifugation, qui avait conduit, lors d'essais d'infection *in vitro*, à sa détection dès la première heure post-inoculation virale (observation

personnelle). Le mécanisme d'association de ces ARNm viraux avec la particule virale et leur rôle restent à ce jour inconnus. Des travaux ultérieurs ont mis en évidence, au sein des particules virales, la présence d'autres ARNm viraux et d'ARNm cellulaires (Gerna et al., 2000b; Greijer et al., 2000). Cette observation a conduit à émettre l'hypothèse d'une incorporation passive et surtout aléatoire d'ARN messagers qui pourrait survenir au moment des étapes, très mal connues, d'enveloppement et de désenveloppement de la particule virale. Des observations similaires ont été faites pour l'*Herpesvirus simplex* (Sciortino et al., 2001).

En ce qui concerne l'HHV6, nous avons montré que le gène U100 porté par les variants B subit, comme cela avait été rapporté pour les souches de type A, un épissage alternatif et que les formes épissées sont présentes à la phase tardive du cycle (Mirandola et al., 1998). Le gène U100 a été identifié comme codant pour plusieurs glycoprotéines d'enveloppe, notamment la gp 82-105 qui induit la synthèse d'anticorps neutralisants (Pfeiffer et al., 1993). Des travaux très récents, menés sur le variant A, ont permis d'identifier une de ces glycoprotéines, nommée gQ, comme le troisième composant du complexe de l'enveloppe gH-gL (Mori et al., 2003), à l'image de la protéine gO associée au complexe gL-gH pour le CMVH (Huber and Compton, 1998) ou de la gp42 pour l'EBV (Li et al., 1995). Elle présente donc un rôle majeur dans les phénomènes de fusion qui surviennent au cours de l'interaction avec le récepteur viral CD46. En raison des divergences importantes entre les variants A et B (76% d'homologie entre les gènes U100 des deux variants) (Isegawa et al., 1999), ceci pourrait expliquer la différence de tropisme cellulaire des deux types de souches (Dockrell, 2003).

L'utilisation de nos outils, comme aide au diagnostic des infections actives, a été évaluée de façon préliminaire pour le CMVH (Andre et al., 1999), et a montré l'intérêt potentiel de l'ARNm UL22 comme marqueur de survenue d'une maladie à CMVH. Des publications ultérieures, rapportant la détection de l'ARNm UL123 et de l'ARNm tardif non épissé de la protéine pp67 par la technique commercialisée NASBA, ont confirmé nos données. Ces marqueurs, en particulier l'ARNm UL123, apparaissent comme intéressants dans le cadre du diagnostic congénital (Revello et al., 2001) afin de prévoir le risque d'atteinte fœtale ou pour suivre l'efficacité du traitement antiviral chez les patients immunodéprimés (Gerna et al., 2000a; Gerna et al., 2000b; Greijer et al., 2002). Cette méthodologie est adaptable à la routine, mais nécessite en contre-partie un investissement lourd et reste très onéreuse à l'usage. Pour ces raisons, elle entre en compétition avec d'autres méthodologies, en particulier celles qui permettent une quantification de la charge virale ADN ou de celle de l'antigénémie,

notamment en cytométrie de flux (Najioullah et al., 2001; Poirier-Toulemonde et al., 2000). Enfin, l'utilisation même de marqueurs permettant de prédire la survenue de maladies à CMVH, et dont la positivité représente un critère de choix pour initier un traitement d'attaque précoce ("*preemptive therapy*"), est remise en cause par la généralisation des approches antivirales prophylactiques. Ceci est particulièrement probant dans le contexte des greffes d'organes solides où l'administration pendant les premiers mois suivant la transplantation de valaciclovir, molécule très bien tolérée et ayant prouvé son efficacité dans cette indication, est très largement effectuée (Lowance et al., 1999).

Pour l'HHV6, et en dehors du contexte des greffes de CSH où les données sont plus nombreuses (Dockrell, 2003), il apparaît nécessaire de compléter les connaissances sur le pouvoir pathogène de ce virus chez les sujets receveurs de greffes d'organes solides (Gentile, 2000). L'implication réelle de l'HHV6 dans d'autres pathologies, telles que la sclérose en plaque (Challoner et al., 1995; Fillet et al., 1998), le syndrome de fatigue chronique (Dockrell, 2003) ou la maladie de Goujerot-Sjögren (Ranger-Rogez et al., 1994) nécessite également d'être investiguée. A ce titre, les marqueurs de réplication virale dont nous disposons (Andre-Garnier et al., 2003) et qui sont aisément adaptables à une activité de routine, semblent tout à fait adaptés. Il peut ainsi être envisagé de mettre en place des études prospectives, qui évalueraient la positivité de l'antigénémie et/ou de l'ARNémie, associées éventuellement à une quantification de la charge virale ADN, en fonction de la survenue de symptômes évocateurs.

Les travaux menés sur les CSH en voie de différenciation vers les lignées myéloïdes nous ont permis de démontrer, pour la première fois, la présence d'ARN messagers tardifs du variant B de l'HHV6, associé à une augmentation de la charge virale ADN. Les mécanismes concourant à cette réactivation de l'HHV6 restent à élucider. A l'inverse du CMVH, pour lequel il a été établi, dans le modèle des monocytes/macrophages, le rôle prépondérant de la réaction allogénique (Soderberg-Naucleer et al., 1997), nos résultats suggèrent que cette condition ne soit pas requise pour obtenir une réactivation du génome latent de l'HHV6. Ceci est illustré par les observations cliniques menées chez les sujets greffés, où la fréquence des infections actives à HHV6 est similaire dans les deux contextes, autologue et allogénique, alors que les réactivations CMVH surviennent, dans la très grande majorité des cas, uniquement chez les sujets allogreffés. Cette observation est également confortée par les différences entre des délais de réactivation de ces deux virus en période post-greffe : l'HHV6 réactive plus rapidement après le conditionnement que le CMVH, et le moment de la réactivation est

identique après greffe autologue ou allogénique (Imbert-Marcille et al., 2000b). D'un point de vue moléculaire, et bien que les connaissances restent limitées, voire quasi absentes pour l'HHV6, il a été montré que les promoteurs des gènes transactivateurs IE1 (UL122/123 pour le CMVH et U86/87 pour l'HHV6), qui codent pour les protéines clés de l'entrée en cycle lytique et sa régulation, divergent largement (Papanikolaou et al., 2002). Il peut donc être envisagé que ces deux promoteurs ne soient pas affectés par les mêmes ligands. Ainsi, en ce qui concerne le CMVH dans le modèle monocytes/macrophages, il a été démontré le rôle essentiel dans le processus de réactivation après 28 jours de culture de l'interféron gamma et de l'interleukine-2, produites en grandes quantités au cours de la réaction allogénique, alors que d'autres cytokines telles que le GM-CSF, IL-1 et IL-3, utilisées au cours de nos essais, ou des agents tels que le TPA (phorbol 12-myristate 13-acetate) sont sans action (Soderberg-Naucler et al., 2001). Ceci pourrait, associé à une durée limitée de la culture (21 jours maximum), expliquer les échecs de réactivation du CMVH dans notre étude. *A contrario*, pour l'HHV6, la stimulation de monocytes ou de lignées cellulaires myéloïdes infectées de façon latente par le phorbol-ester, a abouti à une réactivation virale, attestée par la mise en évidence de virions ou d'ARN messagers du cycle lytique (Kondo et al., 1991) (Yasukawa et al., 1999). Ceci illustre donc bien que les stimuli à l'origine de la réactivation virale diffèrent entre les deux virus. Dans le contexte de notre étude, il est donc possible d'émettre l'hypothèse qu'une ou plusieurs des cytokines utilisées pour la différenciation des CSH puissent interagir avec le promoteur du gène IE1 de l'HHV6.

La réactivation de l'HHV6 n'a été mise en évidence que pour la moitié des échantillons cultivés, confirmant que la latence au niveau des CSH n'est détectable, avec les outils actuels, que chez certains patients séropositifs (Isomura et al., 2000; Luppi et al., 1999). Il n'existe aucune donnée, à ce jour, permettant d'expliquer ce point. La possibilité qu'il existe au sein des variants B un polymorphisme génétique qui pourrait, à l'exemple du CMVH (Retiere et al., 1998), affecter les gènes IE (U86, U89), est une voie d'investigation intéressante. Il a été établi que la transcription de ces gènes peut suivre différents schémas, caractéristiques de la phase de latence (transcrits antisens) ou de la phase lytique. Des travaux très récents (Kondo et al., 2003) ont montré que l'entrée en phase lytique est précédée par l'accumulation des transcrits de latence H6LTs, ce qui génère une modification progressive du profil de transcription. L'existence d'une variabilité des séquences géniques correspondantes pourrait affecter ce processus.

En dépit de l'absence de démonstration dans notre étude que la réactivation de l'HHV6 conduit à la production de virions infectieux, il est indispensable de prendre en compte le risque viral potentiel encouru lors de la réinjection au patient de CSH différenciées. Les quelques essais de réinjections, qui ont prouvé l'efficacité de cette approche pour réduire la durée d'aplasie (McNiece et al., 2000; Paquette et al., 2000), n'ont pas envisagé la possibilité d'une contamination virale. Celle-ci est pourtant potentiellement délétère en raison des dysfonctionnements immunitaires induits par le conditionnement des patients. Par ailleurs, la différenciation de cellules souches vers d'autres types cellulaires ou leur utilisation dans le cadre de la thérapie génique doit conduire à une évaluation plus précise du risque viral, élargi à d'autres virus, tels que les virus des hépatites C et G dont le tropisme pour les cellules CD34+ est établi (Sansone et al., 1998).

Enfin, nos travaux permettent, pour la première fois, d'identifier les progéniteurs CD34+ comme une des sources d'HHV6 à l'origine de l'infection des monocytes circulants. Ils conduisent, associés aux données précédemment publiées, à proposer un modèle très simplifié d'interaction hypothétique entre ce virus et le système hématopoïétique, qui tient compte de l'état de compétence du système immunitaire (Figure 18). Ainsi, il est possible que, chez un sujet immunocompétent, la différenciation de quelques cellules souches CD34+ infectées de façon latente aboutisse à la production de monocytes dont certains supportent un cycle complet de multiplication. Après passage dans le sang périphérique, la multiplication virale serait limitée par intervention des effecteurs immunitaires. *A contrario*, une défaillance du contrôle immunitaire de la multiplication au niveau périphérique conduit à un accroissement de la réplication virale, en particulier au niveau monocyttaire (Kondo et al., 2002a). Celle-ci pourrait être à l'origine d'une contamination massive des progéniteurs médullaires, après une amplification possible de la charge virale dans des cellules accessoires médullaires, telles que les cellules stromales (Knox and Carrigan, 1992). Ceci pourrait expliquer non seulement la présence de virus répliquatifs au sein des monocytes, ce qui définit l'infection active, mais également un déficit de différenciation hématopoïétique, à l'origine des cytopénies.

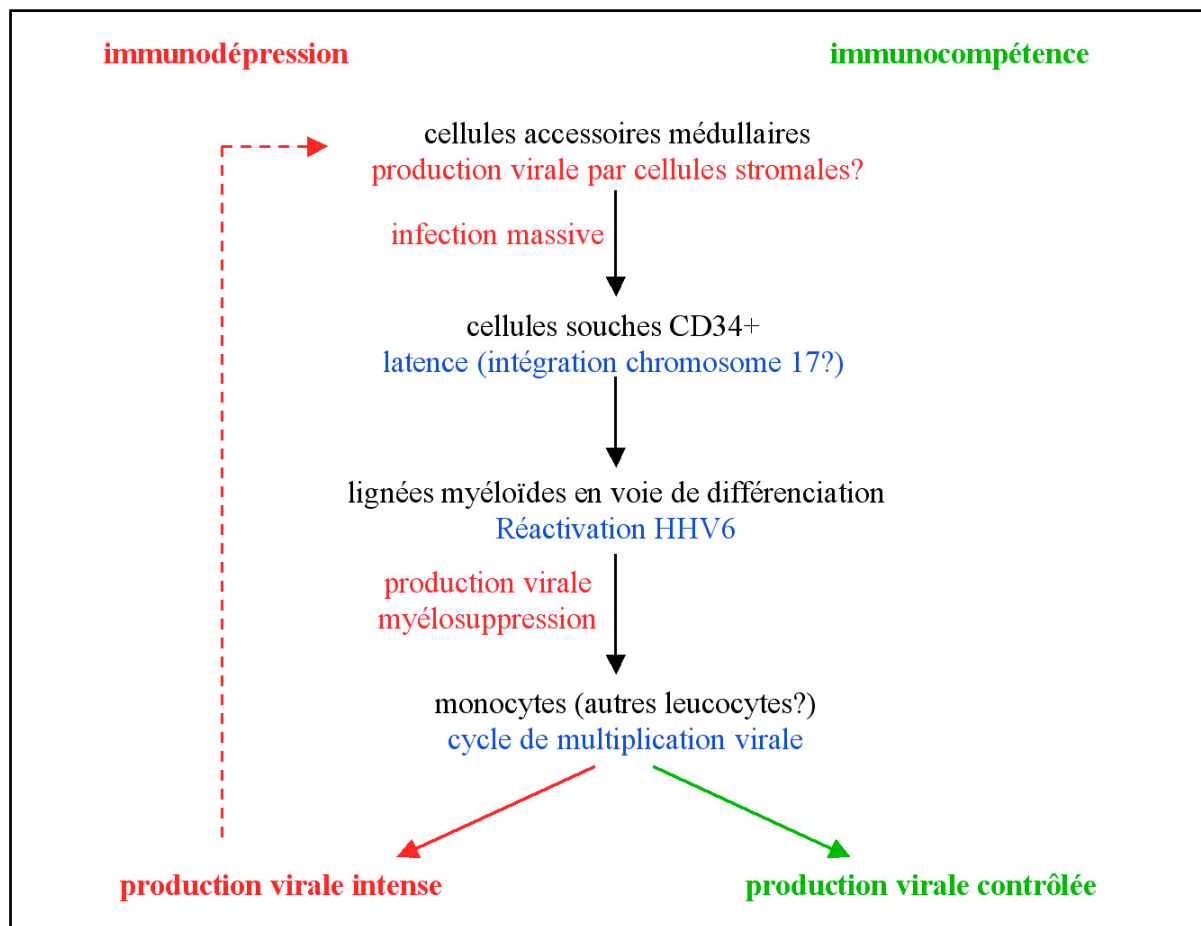


Figure 18 : Modèle simplifié d'interaction de l'HHV6 avec l'hématopoïèse

Parmi les différentes perspectives que les résultats de ce travail offrent, l'évaluation plus précise de la réplication de l'HHV6 au sein des monocytes/macrophages constitue une voie qui sera privilégiée. La mise en place d'un modèle d'infection latente au sein de ces types cellulaires permettrait d'étudier plus précisément, et dans un modèle plus accessible que celui des CSH, l'influence de nombreuses molécules sur la réactivation virale. Ce type de modèle, que nous développons actuellement pour le CMVH, permettrait en outre d'évaluer les conséquences de l'infection sur les fonctions cellulaires, contribuant ainsi à une meilleure compréhension de la physiopathologie des infections à *Betaherpesvirinae*.

BIBLIOGRAPHIE

- Ablashi, D.V., Balachandran, N., Josephs, S.F., Hung, C.L., Krueger, G.R., Kramarsky, B., Salahuddin, S.Z. and Gallo, R.C. (1991) Genomic polymorphism, growth properties, and immunologic variations in human herpesvirus-6 isolates. *Virology* 184(2), 545-52.
- Adler, S.P., McVoy, M., Chou, S., Hempfling, S., Yamanishi, K. and Britt, W. (1993) Antibodies induced by a primary cytomegalovirus infection react with human herpesvirus 6 proteins. *J Infect Dis* 168(5), 1119-26.
- Adler, S.P., Plotkin, S.A., Gonczol, E., Cadoz, M., Meric, C., Wang, J.B., Dellamonica, P., Best, A.M., Zahradnik, J., Pincus, S., Berencsi, K., Cox, W.I. and Gyulai, Z. (1999) A canarypox vector expressing cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B primes for antibody responses to a live attenuated CMV vaccine (Towne). *J Infect Dis* 180(3), 843-6.
- Agut, H. and Aubin, J.T. (1994) [A new virus: the human herpesvirus 6]. *Rev Prat* 44(7), 871-4.
- Akrigg, A., Wilkinson, G.W. and Oram, J.D. (1985) The structure of the major immediate early gene of human cytomegalovirus strain AD169. *Virus Res* 2(2), 107-21.
- Alain, S., Honderlick, P., Grenet, D., Stern, M., Vadam, C., Sanson-Le Pors, M.J. and Mazon, M.C. (1997) Failure of ganciclovir treatment associated with selection of a ganciclovir-resistant cytomegalovirus strain in a lung transplant recipient. *Transplantation* 63(10), 1533-6.
- Almeida-Porada, G.D. and Ascensao, J.L. (1996) Cytomegalovirus as a cause of pancytopenia. *Leuk Lymphoma* 21(3-4), 217-23.
- Alvarez-Barrientos, A., Arroyo, J., Canton, R., Nombela, C. and Sanchez-Perez, M. (2000) Applications of flow cytometry to clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev* 13(2), 167-95.
- Andre, E., Imbert-Marcille, B.M., Cantarovich, D., Besse, B., Ferre-Aubineau, V. and Billaudel, S. (1999) Use of reverse transcription polymerase chain reaction with colorimetric plate hybridization to detect a cytomegalovirus late spliced mRNA in polymorphonuclear leukocytes from renal transplant patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 34(4), 287-91.
- Andre-Garnier, E., Robillard, N., Costa-Mattioli, M., Besse, B., Billaudel, S. and Imbert-Marcille, B.M. (2003) A one-step RT-PCR and a flow cytometry method as two specific tools for direct evaluation of human herpesvirus-6 replication. *J Virol Methods* 108(2), 213-22.
- Anduze-Faris, B.M., Fillet, A.M., Gozlan, J., Lancar, R., Boukli, N., Gasnault, J., Caumes, E., Livartowsky, J., Matheron, S., Leport, C., Salmon, D., Costagliola, D. and Katlama, C. (2000) Induction and maintenance therapy of cytomegalovirus central nervous system infection in HIV-infected patients. *Aids* 14(5), 517-24.
- Apaire-Marchais, V., Ferre-Aubineau, V., Colonna, F., Dubois, F., Ponge, A. and Billaudel, S. (1994) Development of RT-semi-nested PCR for detection of hepatitis A virus in stool in epidemic conditions. *Mol Cell Probes* 8(2), 117-24.
- Appleton, A.L., Sviland, L., Peiris, J.S., Taylor, C.E., Wilkes, J., Green, M.A., Pearson, A.D., Kelly, P.J., Malcolm, A.J., Proctor, S.J. and et al. (1995) Human herpes virus-6 infection in marrow graft recipients: role in pathogenesis of graft-versus-host disease. Newcastle upon Tyne Bone Marrow Transport Group. *Bone Marrow Transplant* 16(6), 777-82.
- Arnal, C., Ferre-Aubineau, V., Besse, B. and Billaudel, S. (1998) Simplified reverse transcription polymerase chain reaction procedure with detection by microplate hybridization for routine screening of hepatitis A virus. *Can J Microbiol* 44(3), 298-302.

- Asano, Y., Nakashima, T., Yoshikawa, T., Suga, S. and Yazaki, T. (1991) Severity of human herpesvirus-6 viremia and clinical findings in infants with exanthem subitum. *J Pediatr* 118(6), 891-5.
- Asano, Y., Yoshikawa, T., Suga, S., Yazaki, T., Kondo, K. and Yamanishi, K. (1990) Fatal fulminant hepatitis in an infant with human herpesvirus-6 infection. *Lancet* 335(8693), 862-3.
- Aubin, J.T., Agut, H., Collandre, H., Yamanishi, K., Chandran, B., Montagnier, L. and Huraux, J.M. (1993) Antigenic and genetic differentiation of the two putative types of human herpes virus 6. *J Virol Methods* 41(2), 223-34.
- Aubin, J.T., Collandre, H., Candotti, D., Ingrand, D., Rouzioux, C., Burgard, M., Richard, S., Huraux, J.M. and Agut, H. (1991) Several groups among human herpesvirus 6 strains can be distinguished by Southern blotting and polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 29(2), 367-72.
- Aubin, J.T., Poirel, L., Agut, H., Huraux, J.M., Bignozzi, C., Brossard, Y., Mulliez, N., Roume, J., Lecuru, F. and Taurelle, R. (1992) Intrauterine transmission of human herpesvirus 6. *Lancet* 340(8817), 482-3.
- Aubin, J.T., Poirel, L., Robert, C., Huraux, J.M. and Agut, H. (1994) Identification of human herpesvirus 6 variants A and B by amplimer hybridization with variant-specific oligonucleotides and amplification with variant-specific primers. *J Clin Microbiol* 32(10), 2434-40.
- Auer, T., Sninsky, J.J., Gelfand, D.H. and Myers, T.W. (1996) Selective amplification of RNA utilizing the nucleotide analog dITP and *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Nucleic Acids Res* 24(24), 5021-5.
- Balduzzi, A., Gooley, T., Anasetti, C., Sanders, J.E., Martin, P.J., Petersdorf, E.W., Appelbaum, F.R., Buckner, C.D., Matthews, D., Storb, R. and et al. (1995) Unrelated donor marrow transplantation in children. *Blood* 86(8), 3247-56.
- Benko, D.M., Haltiwanger, R.S., Hart, G.W. and Gibson, W. (1988) Virion basic phosphoprotein from human cytomegalovirus contains O-linked N-acetylglucosamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(8), 2573-7.
- Blackburn, N.K., Besselaar, T.G., Schoub, B.D. and O'Connell, K.F. (1991) Differentiation of primary cytomegalovirus infection from reactivation using the urea denaturation test for measuring antibody avidity. *J Med Virol* 33(1), 6-9.
- Blok, M.J., Lautenschlager, I., Goossens, V.J., Middeldorp, J.M., Vink, C., Hockerstedt, K. and Bruggeman, C.A. (2000) Diagnostic implications of human cytomegalovirus immediate early-1 and pp67 mRNA detection in whole-blood samples from liver transplant patients using nucleic acid sequence-based amplification. *J Clin Microbiol* 38(12), 4485-91.
- Boeckh, M. (1999) Current antiviral strategies for controlling cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: prevention and therapy. *Transpl Infect Dis* 1(3), 165-78.
- Boeckh, M. and Boivin, G. (1998) Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. *Clin Microbiol Rev* 11(3), 533-54.
- Boeckh, M., Gallez-Hawkins, G.M., Myerson, D., Zaia, J.A. and Bowden, R.A. (1997) Plasma polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA after allogeneic marrow transplantation: comparison with polymerase chain reaction using peripheral blood leukocytes, pp65 antigenemia, and viral culture. *Transplantation* 64(1), 108-13.
- Bolovan-Fritts, C.A., Mocarski, E.S. and Wiedeman, J.A. (1999) Peripheral blood CD14(+) cells from healthy subjects carry a circular conformation of latent cytomegalovirus genome. *Blood* 93(1), 394-8.

- Bolovan-Fritts, C.A. and Wiedeman, J.A. (2002) Mapping the viral genetic determinants of endothelial cell tropism in human cytomegalovirus. *J Clin Virol* 25(Suppl 2), S97-109.
- Boom, R., Sol, C.J., Salimans, M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M. and van der Noordaa, J. (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28(3), 495-503.
- Boppana, S.B., Pass, R.F., Britt, W.J., Stagno, S. and Alford, C.A. (1992) Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. *Pediatr Infect Dis J* 11(2), 93-9.
- Boutolleau, D., Fernandez, C., Andre, E., Imbert-Marcille, B.M., Milpied, N., Agut, H. and Gautheret-Dejean, A. (2003) Human herpesvirus (HHV)-6 and HHV-7: two closely related viruses with different infection profiles in stem cell transplantation recipients. *J Infect Dis* 187(2), 179-86.
- Bowden, R.A., Mori, M., Dobbs, S., Hackman, R., Kopecky, K. and Crawford, S. (1993) Mononuclear cell reconstitution in the lung after marrow transplantation. Lack of influence of cytomegalovirus pneumonia, irradiation, and graft-versus-host disease. *Transplantation* 55(3), 557-61.
- Bowden, R.A., Slichter, S.J., Sayers, M.H., Mori, M., Cays, M.J. and Meyers, J.D. (1991) Use of leukocyte-depleted platelets and cytomegalovirus-seronegative red blood cells for prevention of primary cytomegalovirus infection after marrow transplant. *Blood* 78(1), 246-50.
- Braun, D.K., Dominguez, G. and Pellett, P.E. (1997) Human herpesvirus 6. *Clin Microbiol Rev* 10(3), 521-67.
- Bresnahan, W.A. and Shenk, T. (2000) A subset of viral transcripts packaged within human cytomegalovirus particles. *Science* 288(5475), 2373-6.
- Broxmeyer, H.E., Douglas, G.W., Hangoc, G., Cooper, S., Bard, J., English, D., Arny, M., Thomas, L. and Boyse, E.A. (1989) Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(10), 3828-32.
- Burd, E.M., Knox, K.K. and Carrigan, D.R. (1993) Human herpesvirus-6-associated suppression of growth factor-induced macrophage maturation in human bone marrow cultures. *Blood* 81(6), 1645-50.
- Campadelli-Fiume, G., Guerrini, S., Liu, X. and Foa-Tomasi, L. (1993) Monoclonal antibodies to glycoprotein B differentiate human herpesvirus 6 into two clusters, variants A and B. *J Gen Virol* 74(Pt 10), 2257-62.
- Campadelli-Fiume, G., Mirandola, P. and Menotti, L. (1999) Human herpesvirus 6: An emerging pathogen. *Emerg Infect Dis* 5(3), 353-66.
- Carrigan, D.R., Drobyski, W.R., Russler, S.K., Tapper, M.A., Knox, K.K. and Ash, R.C. (1991) Interstitial pneumonitis associated with human herpesvirus-6 infection after marrow transplantation. *Lancet* 338(8760), 147-9.
- Carrigan, D.R. and Knox, K.K. (1994) Human herpesvirus 6 (HHV-6) isolation from bone marrow: HHV-6-associated bone marrow suppression in bone marrow transplant patients. *Blood* 84(10), 3307-10.
- Challoner, P.B., Smith, K.T., Parker, J.D., MacLeod, D.L., Coulter, S.N., Rose, T.M., Schultz, E.R., Bennett, J.L., Garber, R.L., Chang, M. and et al. (1995) Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(16), 7440-4.
- Chee, M.S., Bankier, A.T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C.M., Cerny, R., Horsnell, T., Hutchison, C.A., 3rd, Kouzarides, T., Martignetti, J.A. and et al. (1990) Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol* 154, 125-69.

- Chen, H., Pesce, A.M., Carbonari, M., Ensoli, F., Cherchi, M., Campitelli, G., Sbarigia, D., Luzi, G., Aiuti, F. and Fiorilli, M. (1992) Absence of antibodies to human herpesvirus-6 in patients with slowly-progressive human immunodeficiency virus type 1 infection. *Eur J Epidemiol* 8(2), 217-21.
- Chiu, S.S., Cheung, C.Y., Tse, C.Y. and Peiris, M. (1998) Early diagnosis of primary human herpesvirus 6 infection in childhood: serology, polymerase chain reaction, and virus load. *J Infect Dis* 178(5), 1250-6.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1), 156-9.
- Clark, D.A. (2000) Human herpesvirus 6. *Rev Med Virol* 10(3), 155-73.
- Cohen, J.I. and Corey, G.R. (1985) Cytomegalovirus infection in the normal host. *Medicine (Baltimore)* 64(2), 100-14.
- Collandre, H., Aubin, J.T., Agut, H., Bechet, J.M. and Montagnier, L. (1991) Detection of HHV-6 by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 31(2-3), 171-9.
- Collot, S., Petit, B., Bordessoule, D., Alain, S., Touati, M., Denis, F. and Ranger-Rogez, S. (2002) Real-time PCR for quantification of human herpesvirus 6 DNA from lymph nodes and saliva. *J Clin Microbiol* 40(7), 2445-51.
- Cone, R.W., Hackman, R.C., Huang, M.L., Bowden, R.A., Meyers, J.D., Metcalf, M., Zeh, J., Ashley, R. and Corey, L. (1993a) Human herpesvirus 6 in lung tissue from patients with pneumonitis after bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 329(3), 156-61.
- Cone, R.W., Huang, M.L., Ashley, R. and Corey, L. (1993b) Human herpesvirus 6 DNA in peripheral blood cells and saliva from immunocompetent individuals. *J Clin Microbiol* 31(5), 1262-7.
- Cone, R.W., Huang, M.L., Corey, L., Zeh, J., Ashley, R. and Bowden, R. (1999) Human herpesvirus 6 infections after bone marrow transplantation: clinical and virologic manifestations. *J Infect Dis* 179(2), 311-8.
- Corbellino, M., Lusso, P., Gallo, R.C., Parravicini, C., Galli, M. and Moroni, M. (1993) Disseminated human herpesvirus 6 infection in AIDS. *Lancet* 342(8881), 1242.
- Couchoud, C., Cucherat, M., Haugh, M. and Pouteil-Noble, C. (1998) Cytomegalovirus prophylaxis with antiviral agents in solid organ transplantation: a meta-analysis. *Transplantation* 65(5), 641-7.
- Craddock, C. (2000) Haemopoietic stem-cell transplantation: recent progress and future promise. *Lancet Oncol* 1, 227-34.
- Crapnell, K., Zanjani, E.D., Chaudhuri, A., Ascensao, J.L., St Jeor, S. and Maciejewski, J.P. (2000) In vitro infection of megakaryocytes and their precursors by human cytomegalovirus. *Blood* 95(2), 487-93.
- Crumpacker, C.S. (1996) Ganciclovir. *N Engl J Med* 335(10), 721-9.
- Curran, M. and Noble, S. (2001) Valganciclovir. *Drugs* 61(8), 1145-50 ; discussion 1151-2.
- Dahl, H., Fjaertoft, G., Norsted, T., Wang, F.Z., Mousavi-Jazi, M. and Linde, A. (1999) Reactivation of human herpesvirus 6 during pregnancy. *J Infect Dis* 180(6), 2035-8.
- Dankner, W.M., McCutchan, J.A., Richman, D.D., Hirata, K. and Spector, S.A. (1990) Localization of human cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes by in situ hybridization. *J Infect Dis* 161(1), 31-6.
- De Clercq, E. (2001) Antiviral drugs: current state of the art. *J Clin Virol* 22(1), 73-89.
- DesJardin, J.A., Cho, E., Supran, S., Gibbons, L., Werner, B.G. and Snyderman, D.R. (2001) Association of human herpesvirus 6 reactivation with severe cytomegalovirus-associated disease in orthotopic liver transplant recipients. *Clin Infect Dis* 33(8), 1358-62.
- DesJardin, J.A., Gibbons, L., Cho, E., Supran, S.E., Falagas, M.E., Werner, B.G. and Snyderman, D.R. (1998) Human herpesvirus 6 reactivation is associated with

- cytomegalovirus infection and syndromes in kidney transplant recipients at risk for primary cytomegalovirus infection. *J Infect Dis* 178(6), 1783-6.
- Dewhurst, S., Dollard, S.C., Pellett, P.E. and Dambaugh, T.R. (1993) Identification of a lytic-phase origin of DNA replication in human herpesvirus 6B strain Z29. *J Virol* 67(12), 7680-3.
- Di Luca, D., Dolcetti, R., Mirandola, P., De Re, V., Secchiero, P., Carbone, A., Boiocchi, M. and Cassai, E. (1994) Human herpesvirus 6: a survey of presence and variant distribution in normal peripheral lymphocytes and lymphoproliferative disorders. *J Infect Dis* 170(1), 211-5.
- Di Luca, D., Katsafanas, G., Schirmer, E.C., Balachandran, N. and Frenkel, N. (1990) The replication of viral and cellular DNA in human herpesvirus 6-infected cells. *Virology* 175(1), 199-210.
- Dockrell, D., H. (2003) Human herpesvirus 6 : molecular biology and clinical features. *J Med Microbiol.* 52, 5-18.
- Dockrell, D.H., Prada, J., Jones, M.F., Patel, R., Badley, A.D., Harmsen, W.S., Ilstrup, D.M., Wiesner, R.H., Krom, R.A., Smith, T.F. and Paya, C.V. (1997) Seroconversion to human herpesvirus 6 following liver transplantation is a marker of cytomegalovirus disease. *J Infect Dis* 176(5), 1135-40.
- Dominguez, G., Dambaugh, T.R., Stamey, F.R., Dewhurst, S., Inoue, N. and Pellett, P.E. (1999) Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A. *J Virol* 73(10), 8040-52.
- Doniger, J., Muralidhar, S. and Rosenthal, L.J. (1999) Human cytomegalovirus and human herpesvirus 6 genes that transform and transactivate. *Clin Microbiol Rev* 12(3), 367-82.
- Downing, R.G., Sewankambo, N., Serwadda, D., Honess, R., Crawford, D., Jarrett, R. and Griffin, B.E. (1987) Isolation of human lymphotropic herpesviruses from Uganda. *Lancet* 2(8555), 390.
- Drobyski, W.R., Dunne, W.M., Burd, E.M., Knox, K.K., Ash, R.C., Horowitz, M.M., Flomenberg, N. and Carrigan, D.R. (1993a) Human herpesvirus-6 (HHV-6) infection in allogeneic bone marrow transplant recipients: evidence of a marrow-suppressive role for HHV-6 in vivo. *J Infect Dis* 167(3), 735-9.
- Drobyski, W.R., Eberle, M., Majewski, D. and Baxter-Lowe, L.A. (1993b) Prevalence of human herpesvirus 6 variant A and B infections in bone marrow transplant recipients as determined by polymerase chain reaction and sequence-specific oligonucleotide probe hybridization. *J Clin Microbiol* 31(6), 1515-20.
- Drobyski, W.R., Knox, K.K., Majewski, D. and Carrigan, D.R. (1994) Brief report: fatal encephalitis due to variant B human herpesvirus-6 infection in a bone marrow-transplant recipient. *N Engl J Med* 330(19), 1356-60.
- Drouet, E., Boibieux, A., Michelson, S., Ecochard, R., Biron, F., Peyramond, D., Colimon, R. and Denoyel, G. (1993) Polymerase chain reaction detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood leukocytes as a predictor of cytomegalovirus disease in HIV-infected patients. *Aids* 7(5), 665-8.
- Drouet, E., Gafa, V., Le Roy, E. and Davignon, J.L. (2002) L'immunosubversion liée au cytomégalovirus humain et les conséquences en pathologie humaine. *Virologie* vol.6-n°6, 417-430.
- Engelhard, D., Weinberg, M., Or, R., Shaked, O., Naparstek, E., Haikin, H., Slavin, S. and Sarov, I. (1991) Immunoglobulins A, G, and M to cytomegalovirus during recurrent infection in recipients of allogeneic bone marrow transplantation. *J Infect Dis* 163(3), 628-30.

- Estrov, Z., Huh, Y.O., Ginsberg, C.F., Harris, D., Van, Q., Mirza, N.Q., Talpaz, M. and Korbaling, M. (2002) Ex vivo expansion of apheresis-derived peripheral blood hematopoietic progenitors. *J Clin Apheresis* 17(1), 7-16.
- Facon, T., Harousseau, J.L., Maloisel, F., Attal, M., Odriezola, J., Alegre, A., Schroyens, W., Hulin, C., Schots, R., Marin, P., Guilhot, F., Granena, A., De Waele, M., Pigneux, A., Meresse, V., Clark, P. and Reiffers, J. (1999) Stem cell factor in combination with filgrastim after chemotherapy improves peripheral blood progenitor cell yield and reduces apheresis requirements in multiple myeloma patients: a randomized, controlled trial. *Blood* 94(4), 1218-25.
- Farrell, H.E., Degli-Esposti, M.A. and Davis-Poynter, N.J. (1999) Cytomegalovirus evasion of natural killer cell responses. *Immunol Rev* 168, 187-97.
- Farrell, H.E., Vally, H., Lynch, D.M., Fleming, P., Shellam, G.R., Scalzo, A.A. and Davis-Poynter, N.J. (1997) Inhibition of natural killer cells by a cytomegalovirus MHC class I homologue in vivo. *Nature* 386(6624), 510-4.
- Ferre-Aubineau, V., Imbert-Marcille, B.M., Raffi, F., Besse, B., Loirat, R. and Billaudel, S. (1995) Colorimetric microtiter plate hybridization assay using monoclonal antibody for detection of an amplified human immunodeficiency virus target. *J Virol Methods* 55(1), 145-51.
- Fillet, A.M., Lozeron, P., Agut, H., Lyon-Caen, O. and Liblau, R. (1998) HHV-6 and multiple sclerosis. *Nat Med* 4(5), 537; author reply 538.
- Fillet, A.M., Reux, I., Joberty, C., Fournier, J.G., Hauw, J.J., Le Hoang, P., Bricaire, F., Huraux, J.M. and Agut, H. (1996) Detection of human herpes virus 6 in AIDS-associated retinitis by means of in situ hybridization, polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *J Med Virol* 49(4), 289-95.
- Fish, K.N., Britt, W. and Nelson, J.A. (1996) A novel mechanism for persistence of human cytomegalovirus in macrophages. *J Virol* 70(3), 1855-62.
- Fish, K.N., Soderberg-Naucler, C., Mills, L.K., Stenglein, S. and Nelson, J.A. (1998) Human cytomegalovirus persistently infects aortic endothelial cells. *J Virol* 72(7), 5661-8.
- Fishman, J.A. and Rubin, R.H. (1998) Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 338(24), 1741-51.
- Flamand, L., Gosselin, J., D'Addario, M., Hiscott, J., Ablashi, D.V., Gallo, R.C. and Menezes, J. (1991) Human herpesvirus 6 induces interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha, but not interleukin-6, in peripheral blood mononuclear cell cultures. *J Virol* 65(9), 5105-10.
- Flamand, L., Gosselin, J., Stefanescu, I., Ablashi, D. and Menezes, J. (1995) Immunosuppressive effect of human herpesvirus 6 on T-cell functions: suppression of interleukin-2 synthesis and cell proliferation. *Blood* 85(5), 1263-71.
- Flebbe-Rehwaldt, L.M., Wood, C. and Chandran, B. (2000) Characterization of transcripts expressed from human herpesvirus 6A strain GS immediate-early region B U16-U17 open reading frames. *J Virol* 74(23), 11040-54.
- Flood, J., Drew, W.L., Miner, R., Jekic-McMullen, D., Shen, L.P., Kolberg, J., Garvey, J., Follansbee, S. and Poscher, M. (1997) Diagnosis of cytomegalovirus (CMV) polyradiculopathy and documentation of in vivo anti-CMV activity in cerebrospinal fluid by using branched DNA signal amplification and antigen assays. *J Infect Dis* 176(2), 348-52.
- Foa-Tomasi, L., Fiorilli, M.P., Avitabile, E. and Campadelli-Fiume, G. (1996) Identification of an 85 kDa phosphoprotein as an immunodominant protein specific for human herpesvirus 7-infected cells. *J Gen Virol* 77(Pt 3), 511-8.

- Frenkel, N., Katsafanas, G.C., Wyatt, L.S., Yoshikawa, T. and Asano, Y. (1994) Bone marrow transplant recipients harbor the B variant of human herpesvirus 6. *Bone Marrow Transplant* 14(5), 839-43.
- Gaeta, A., Nazzari, C., Angeletti, S., Lazzarini, M., Mazzei, E. and Mancini, C. (1997) Monitoring for cytomegalovirus infection in organ transplant recipients: analysis of pp65 antigen, DNA and late mRNA in peripheral blood leukocytes. *J Med Virol* 53(3), 189-95.
- Gautheret-Dejean, A., Dejean, O., Vastel, L., Kerboull, M., Aubin, J.T., Franti, M. and Agut, H. (2000) Human herpesvirus-6 and human herpesvirus-7 in the bone marrow from healthy subjects. *Transplantation* 69(8), 1722-3.
- Gautheret-Dejean, A., Manichanh, C., Thien-Ah-Koon, F., Fillet, A.M., Mangeney, N., Vidaud, M., Dhedin, N., Vernant, J.P. and Agut, H. (2002) Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of human herpesvirus-6 infection and application to bone marrow transplant patients. *J Virol Methods* 100(1-2), 27-35.
- Gentile, G. (2000) Post-transplant HHV-6 Diseases. *Herpes* 7(1), 24-27.
- Gerard, L. and Salmon-Ceron, D. (1995) Pharmacokinetic and clinical use of foscarnet. *Int J Antimicrob Agents* 5, 209-217.
- Gerna, G., Baldanti, F., Lilleri, D., Parea, M., Alessandrino, E., Pagani, A., Locatelli, F., Middeldorp, J. and Revello, M.G. (2000a) Human cytomegalovirus immediate-early mRNA detection by nucleic acid sequence-based amplification as a new parameter for preemptive therapy in bone marrow transplant recipients. *J Clin Microbiol* 38(5), 1845-53.
- Gerna, G., Percivalle, E., Baldanti, F., Sozzani, S., Lanzarini, P., Genini, E., Lilleri, D. and Revello, M.G. (2000b) Human cytomegalovirus replicates abortively in polymorphonuclear leukocytes after transfer from infected endothelial cells via transient microfusion events. *J Virol* 74(12), 5629-38.
- Gerna, G., Zipeto, D., Percivalle, E., Parea, M., Revello, M.G., Maccario, R., Peri, G. and Milanesi, G. (1992) Human cytomegalovirus infection of the major leukocyte subpopulations and evidence for initial viral replication in polymorphonuclear leukocytes from viremic patients. *J Infect Dis* 166(6), 1236-44.
- Gleaves, C.A., Myerson, D., Bowden, R.A., Hackman, R.C. and Meyers, J.D. (1989) Direct detection of cytomegalovirus from bronchoalveolar lavage samples by using a rapid in situ DNA hybridization assay. *J Clin Microbiol* 27(11), 2429-32.
- Gompels, U.A., Nicholas, J., Lawrence, G., Jones, M., Thomson, B.J., Martin, M.E., Efstathiou, S., Craxton, M. and Macaulay, H.A. (1995) The DNA sequence of human herpesvirus-6: structure, coding content, and genome evolution. *Virology* 209(1), 29-51.
- Goodrich, J.M., Bowden, R.A., Fisher, L., Keller, C., Schoch, G. and Meyers, J.D. (1993) Ganciclovir prophylaxis to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic marrow transplant. *Ann Intern Med* 118(3), 173-8.
- Goodrich, J.M., Mori, M., Gleaves, C.A., Du Mond, C., Cays, M., Ebeling, D.F., Buhles, W.C., DeArmond, B. and Meyers, J.D. (1991) Early treatment with ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 325(23), 1601-7.
- Goodrum, F.D., Jordan, C.T., High, K. and Shenk, T. (2002) Human cytomegalovirus gene expression during infection of primary hematopoietic progenitor cells: a model for latency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(25), 16255-60.
- Gozlan, J., Caburet, F., Tancrede, C. and Petit, J.C. (1992) A reverse polymerase chain reaction method for detection of human cytomegalovirus late transcripts in cells infected in vitro. *J Virol Methods* 40(1), 1-10.

- Gozlan, J., Laporte, J.P., Lesage, S., Labopin, M., Najman, A., Gorin, N.C. and Petit, J.C. (1996) Monitoring of cytomegalovirus infection and disease in bone marrow recipients by reverse transcription-PCR and comparison with PCR and blood and urine cultures. *J Clin Microbiol* 34(9), 2085-8.
- Gozlan, J., Salord, J.M., Chouaid, C., Duvivier, C., Picard, O., Meyohas, M.C. and Petit, J.C. (1993) Human cytomegalovirus (HCMV) late-mRNA detection in peripheral blood of AIDS patients: diagnostic value for HCMV disease compared with those of viral culture and HCMV DNA detection. *J Clin Microbiol* 31(7), 1943-5.
- Gratacap-Cavallier, B., Bosson, J.L., Morand, P., Dutertre, N., Chanzy, B., Jouk, P.S., Vandekerckhove, C., Cart-Lamy, P. and Seigneurin, J.M. (1998) Cytomegalovirus seroprevalence in French pregnant women: parity and place of birth as major predictive factors. *Eur J Epidemiol* 14(2), 147-52.
- Grefte, A., Blom, N., van der Giessen, M., van Son, W. and The, T.H. (1993) Ultrastructural analysis of circulating cytomegalic cells in patients with active cytomegalovirus infection: evidence for virus production and endothelial origin. *J Infect Dis* 168(5), 1110-8.
- Greijer, A.E., Adriaanse, H.M., Dekkers, C.A. and Middeldorp, J.M. (2002) Multiplex real-time NASBA for monitoring expression dynamics of human cytomegalovirus encoded IE1 and pp67 RNA. *J Clin Virol* 24(1-2), 57-66.
- Greijer, A.E., Dekkers, C.A. and Middeldorp, J.M. (2000) Human cytomegalovirus virions differentially incorporate viral and host cell RNA during the assembly process. *J Virol* 74(19), 9078-82.
- Griffiths, P.D., Clark, D.A. and Emery, V.C. (2000) Betaherpesviruses in transplant recipients. *J Antimicrob Chemother* 45(Suppl T3), 29-34.
- Hahn, G., Rose, D., Wagner, M., Rhiel, S. and McVoy, M.A. (2003) Cloning of the genomes of human cytomegalovirus strains Toledo, TownevarRIT3, and Towne(long) as BACs and site-directed mutagenesis using a PCR-based technique. *Virology* 307(1), 164-77.
- Hall, C.B., Long, C.E., Schnabel, K.C., Caserta, M.T., McIntyre, K.M., Costanzo, M.A., Knott, A., Dewhurst, S., Insel, R.A. and Epstein, L.G. (1994) Human herpesvirus-6 infection in children. A prospective study of complications and reactivation. *N Engl J Med* 331(7), 432-8.
- Hasegawa, A., Yasukawa, M., Sakai, I. and Fujita, S. (2001) Transcriptional down-regulation of CXCR4 chemokine receptor 4 induced by impaired association of transcription regulator YY1 with c-Myc in human herpesvirus 6-infected cells. *J Immunol* 166(2), 1125-31.
- Heike, T. and Nakahata, T. (2002) Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells by cytokines. *Biochim Biophys Acta* 1592(3), 313-21.
- Herbein, G., Strasswimmer, J., Altieri, M., Woehl-Jaegle, M.L., Wolf, P. and Obert, G. (1996) Longitudinal study of human herpesvirus 6 infection in organ transplant recipients. *Clin Infect Dis* 22(1), 171-3.
- Hibberd, P.L., Tolkoff-Rubin, N.E., Conti, D., Stuart, F., Thistlethwaite, J.R., Neylan, J.F., Snyderman, D.R., Freeman, R., Lorber, M.I. and Rubin, R.H. (1995) Preemptive ganciclovir therapy to prevent cytomegalovirus disease in cytomegalovirus antibody-positive renal transplant recipients. A randomized controlled trial. *Ann Intern Med* 123(1), 18-26.
- High, K.P. (1999) Atherosclerosis and infection due to *Chlamydia pneumoniae* or cytomegalovirus: weighing the evidence. *Clin Infect Dis* 28(4), 746-9.
- Hill, W.E., Keasler, S.P., Trucksess, M.W., Feng, P., Kaysner, C.A. and Lampel, K.A. (1991) Polymerase chain reaction identification of *Vibrio vulnificus* in artificially contaminated oysters. *Appl Environ Microbiol* 57(3), 707-11.

- Holberg-Petersen, M., Rollag, H., Beck, S., Overli, I., Tjonnfjord, G., Abrahamsen, T.G., Degre, M. and Hestdal, K. (1996) Direct growth suppression of myeloid bone marrow progenitor cells but not cord blood progenitors by human cytomegalovirus in vitro. *Blood* 88(7), 2510-6.
- Huang, L.M., Lee, C.Y., Chen, J.Y., Yang, C.S., Wang, J.D., Chang, M.H., Hsu, C.Y. and Kuo, P.F. (1992) Primary human herpesvirus 6 infections in children: a prospective serologic study. *J Infect Dis* 165(6), 1163-4.
- Huber, M.T. and Compton, T. (1998) The human cytomegalovirus UL74 gene encodes the third component of the glycoprotein H-glycoprotein L-containing envelope complex. *J Virol* 72(10), 8191-7.
- Humar, A., Kumar, D., Caliendo, A.M., Moussa, G., Ashi-Sulaiman, A., Levy, G. and Mazzulli, T. (2002a) Clinical impact of human herpesvirus 6 infection after liver transplantation. *Transplantation* 73(4), 599-604.
- Humar, A., Kumar, D., Raboud, J., Caliendo, A.M., Moussa, G., Levy, G. and Mazzulli, T. (2002b) Interactions between cytomegalovirus, human herpesvirus-6, and the recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *Am J Transplant* 2(5), 461-6.
- Imbert-Marcille, B.M. (2001) Histoire naturelle des infections à cytomégalo-virus. *Medicine thérapeutique* vol 7 n°8, 577-584.
- Imbert-Marcille, B.M. (2002) Epidemiologie des infections à cytomegalovirus. In: J.C. Nicolas (Ed), *Cytomegalovirus*, Elsevier : collection MediBIO, Paris, pp. 43-50.
- Imbert-Marcille, B.M., Cantarovich, D., Ferre-Aubineau, V., Richet, B., Souillou, J.P. and Billaudel, S. (1997a) Usefulness of DNA viral load quantification for cytomegalovirus disease monitoring in renal and pancreas/renal transplant recipients. *Transplantation* 63(10), 1476-81.
- Imbert-Marcille, B.M., Coste-Burel, M., Robillard, N., Foucaud-Gamen, J., Billaudel, S. and Drouet, E. (2000a) Sequential use of paraformaldehyde and methanol as optimal conditions for the direct quantification of ZEBRA and rta antigens by flow cytometry. *Clin Diagn Lab Immunol* 7(2), 206-11.
- Imbert-Marcille, B.M., Milpied, N., Coste-Burel, M., Richet, B., Moreau, P., Harousseau, J.L. and Billaudel, S. (1995) Clinical and practical value of human cytomegalovirus DNAemia detection by semi-nested PCR for follow-up of BMT recipients. *Bone Marrow Transplant* 15(4), 611-7.
- Imbert-Marcille, B.M., Robillard, N., Poirier, A.S., Coste-Burel, M., Cantarovich, D., Milpied, N. and Billaudel, S. (1997b) Development of a method for direct quantification of cytomegalovirus antigenemia by flow cytometry. *J Clin Microbiol* 35(10), 2665-9.
- Imbert-Marcille, B.M., Tang, X.W., Lepelletier, D., Besse, B., Moreau, P., Billaudel, S. and Milpied, N. (2000b) Human herpesvirus 6 infection after autologous or allogeneic stem cell transplantation: a single-center prospective longitudinal study of 92 patients. *Clin Infect Dis* 31(4), 881-6.
- Inoue, N., Dambaugh, T.R. and Pellett, P.E. (1993) Molecular biology of human herpesviruses 6A and 6B. *Infect Agents Dis* 2(6), 343-60.
- Inoue, N., Dambaugh, T.R., Rapp, J.C. and Pellett, P.E. (1994) Alphaherpesvirus origin-binding protein homolog encoded by human herpesvirus 6B, a betaherpesvirus, binds to nucleotide sequences that are similar to ori regions of alphaherpesviruses. *J Virol* 68(7), 4126-36.
- Isegawa, Y., Mukai, T., Nakano, K., Kagawa, M., Chen, J., Mori, Y., Sunagawa, T., Kawanishi, K., Sashihara, J., Hata, A., Zou, P., Kosuge, H. and Yamanishi, K. (1999) Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B. *J Virol* 73(10), 8053-63.

- Isegawa, Y., Ping, Z., Nakano, K., Sugimoto, N. and Yamanishi, K. (1998) Human herpesvirus 6 open reading frame U12 encodes a functional beta-chemokine receptor. *J Virol* 72(7), 6104-12.
- Isomura, H., Yamada, M., Yoshida, M., Tanaka, H., Kitamura, T., Oda, M., Nii, S. and Seino, Y. (1997) Suppressive effects of human herpesvirus 6 on in vitro colony formation of hematopoietic progenitor cells. *J Med Virol* 52(4), 406-12.
- Isomura, H., Yoshida, M., Namba, H., Fujiwara, N., Ohuchi, R., Uno, F., Oda, M., Seino, Y. and Yamada, M. (2000) Suppressive effects of human herpesvirus-6 on thrombopoietin-inducible megakaryocytic colony formation in vitro. *J Gen Virol* 81(Pt 3), 663-73.
- Kadakia, M.P., Rybka, W.B., Stewart, J.A., Patton, J.L., Stamey, F.R., Elsayy, M., Pellett, P.E. and Armstrong, J.A. (1996) Human herpesvirus 6: infection and disease following autologous and allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 87(12), 5341-54.
- Kaplan, J.C. and Delpech, M. (1995a) Du génotype au phénotype. In: J.C. Kaplan and M. Delpech (Eds), *Biologie moléculaire et médecine*, Medecine-Sciences. Flammarion, Paris, pp. 68-86.
- Kaplan, J.C. and Delpech, M. (1995b) Principes de l'analyse génotypique. In: J.C. Kaplan and M. Delpech (Eds), *Biologie moléculaire et médecine*, Médecine-Sciences. Flammarion., Paris, pp. 199-216.
- Kawasaki, E.S. (1990) Amplification of RNA. In: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (Eds), *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*, Academic Press, New York, pp. 21-27.
- Keil, F., Elahi, F., Greinix, H.T., Fritsch, G., Louda, N., Petzer, A.L., Prinz, E., Wagner, T., Kalhs, P., Lechner, K. and Geissler, K. (2002) Ex vivo expansion of long-term culture initiating marrow cells by IL-10, SCF, and IL-3. *Transfusion* 42(5), 581-7.
- Kidd, I.M., Clark, D.A., Sabin, C.A., Andrew, D., Hassan-Walker, A.F., Sweny, P., Griffiths, P.D. and Emery, V.C. (2000) Prospective study of human betaherpesviruses after renal transplantation: association of human herpesvirus 7 and cytomegalovirus co-infection with cytomegalovirus disease and increased rejection. *Transplantation* 69(11), 2400-4.
- Kikuta, H., Nakane, A., Lu, H., Taguchi, Y., Minagawa, T. and Matsumoto, S. (1990) Interferon induction by human herpesvirus 6 in human mononuclear cells. *J Infect Dis* 162(1), 35-8.
- Knox, K.K. and Carrigan, D.R. (1992) In vitro suppression of bone marrow progenitor cell differentiation by human herpesvirus 6 infection. *J Infect Dis* 165(5), 925-9.
- Knox, K.K. and Carrigan, D.R. (1994) HHV-6 and CMV pneumonitis in immunocompromised patients. *Lancet* 343(8913), 1647.
- Kondo, K., Kondo, T., Okuno, T., Takahashi, M. and Yamanishi, K. (1991) Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. *J Gen Virol* 72(Pt 6), 1401-8.
- Kondo, K., Kondo, T., Shimada, K., Amo, K., Miyagawa, H. and Yamanishi, K. (2002a) Strong interaction between human herpesvirus 6 and peripheral blood monocytes/macrophages during acute infection. *J Med Virol* 67(3), 364-9.
- Kondo, K., Sashihara, J., Shimada, K., Takemoto, M., Amo, K., Miyagawa, H. and Yamanishi, K. (2003) Recognition of a novel stage of betaherpesvirus latency in human herpesvirus 6. *J Virol* 77(3), 2258-64.
- Kondo, K., Shimada, K., Sashihara, J., Tanaka-Taya, K. and Yamanishi, K. (2002b) Identification of human herpesvirus 6 latency-associated transcripts. *J Virol* 76(8), 4145-51.

- Kondo, K., Xu, J. and Mocarski, E.S. (1996) Human cytomegalovirus latent gene expression in granulocyte-macrophage progenitors in culture and in seropositive individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(20), 11137-42.
- Kositantont, U., Wasi, C., Wanprapar, N., Bowonkiratikachorn, P., Chokeyhaibulkit, K., Chearskul, S., Chimabutra, K., Sutthent, R., Foongladda, S., Inagi, R., Kurata, T. and Yamanishi, K. (1999) Primary infection of human herpesvirus 6 in children with vertical infection of human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 180(1), 50-5.
- Kropff, B., Landini, M.P. and Mach, M. (1993) An ELISA using recombinant proteins for the detection of neutralizing antibodies against human cytomegalovirus. *J Med Virol* 39(3), 187-95.
- Kuci, S., Wessels, J.T., Buhning, H.J., Schilbach, K., Schumm, M., Seitz, G., Loffler, J., Bader, P., Schlegel, P.G., Niethammer, D. and Handgretinger, R. (2003) Identification of a novel class of human adherent CD34- stem cells that give rise to SCID-repopulating cells. *Blood* 101(3), 869-76.
- Lagneaux, L., Delforge, A., Snoeck, R., Bosmans, E., Moreau, J.F., Taupin, J.L., De Clercq, E., Stryckmans, P. and Bron, D. (1996a) Human cytomegalovirus increases constitutive production of interleukin-6 and leukemia inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *Blood* 87(1), 59-66.
- Lagneaux, L., Delforge, A., Snoeck, R., Bosmans, E., Schols, D., De Clercq, E., Stryckmans, P. and Bron, D. (1996b) Imbalance in production of cytokines by bone marrow stromal cells following cytomegalovirus infection. *J Infect Dis* 174(5), 913-9.
- Lagneaux, L., Delforge, A., Snoeck, R., Stryckmans, P. and Bron, D. (1994) Decreased production of cytokines after cytomegalovirus infection of marrow-derived stromal cells. *Exp Hematol* 22(1), 26-30.
- Lam, K.M., Oldenburg, N., Khan, M.A., Gaylore, V., Mikhail, G.W., Strouhal, P.D., Middeldorp, J.M., Banner, N. and Yacoub, M. (1998) Significance of reverse transcription polymerase chain reaction in the detection of human cytomegalovirus gene transcripts in thoracic organ transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 17(6), 555-65.
- Landry, M.L. and Hsiung, D.G. (2000) Primary isolation of Viruses. In: S. Specter, R.L. Hodinka and S.A. Young (Eds), *Clinical Virology Manual*, American Society for Microbiology, Washington, D.C, pp. 27-42.
- Lautenschlager, I., Hockerstedt, K., Linnavuori, K. and Taskinen, E. (1998) Human herpesvirus-6 infection after liver transplantation. *Clin Infect Dis* 26(3), 702-7.
- Lautenschlager, I., Lappalainen, M., Linnavuori, K., Suni, J. and Hockerstedt, K. (2002) CMV infection is usually associated with concurrent HHV-6 and HHV-7 antigenemia in liver transplant patients. *J Clin Virol* 25(Suppl 2), S57-61.
- Lautenschlager, I., Linnavuori, K. and Hockerstedt, K. (2000a) Human herpesvirus-6 antigenemia after liver transplantation. *Transplantation* 69(12), 2561-6.
- Lautenschlager, I., Linnavuori, K., Lappalainen, M., Suni, J. and Hockerstedt, K. (2000b) HHV-6 reactivation is often associated with CMV infection in liver transplant patients. *Transpl Int* 13(Suppl 1), S351-3.
- Lazzarotto, T., Furlini, G., Re, M.C., Ramazzotti, E., Campisi, B. and Landini, M.P. (1994) Human cytomegalovirus replication correlates with differentiation in a hematopoietic progenitor cell line and can be modulated by HIV-1. *Arch Virol* 135(1-2), 13-28.
- Legendre, C. (2000) Ganciclovir-resistant cytomegalovirus. *Lancet* 356(9238), 1356.
- Lewis, I.D., Almeida-Porada, G., Du, J., Lemischka, I.R., Moore, K.A., Zanjani, E.D. and Verfaillie, C.M. (2001) Umbilical cord blood cells capable of engrafting in primary, secondary, and tertiary xenogeneic hosts are preserved after ex vivo culture in a noncontact system. *Blood* 97(11), 3441-9.

- Li, Q., Turk, S.M. and Hutt-Fletcher, L.M. (1995) The Epstein-Barr virus (EBV) BZLF2 gene product associates with the gH and gL homologs of EBV and carries an epitope critical to infection of B cells but not of epithelial cells. *J Virol* 69(7), 3987-94.
- Lindquester, G.J. and Pellett, P.E. (1991) Properties of the human herpesvirus 6 strain Z29 genome: G + C content, length, and presence of variable-length directly repeated terminal sequence elements. *Virology* 182(1), 102-10.
- Liu, D.X., Gompels, U.A., Foa-Tomasi, L. and Campadelli-Fiume, G. (1993) Human herpesvirus-6 glycoprotein H and L homologs are components of the gp100 complex and the gH external domain is the target for neutralizing monoclonal antibodies. *Virology* 197(1), 12-22.
- Lopez, C., Pellett, P.E., Stewart, J., Goldsmith, C., Sanderlin, K.C., Black, J., Warfield, D.T. and Feorino, P.M. (1988) Characteristics of human herpesvirus-6. *J Infect Dis* 157, 1271-1273.
- Lowance, D., Neumayer, H.H., Legendre, C.M., Squifflet, J.P., Kovarik, J., Brennan, P.J., Norman, D., Mendez, R., Keating, M.R., Coggon, G.L., Crisp, A. and Lee, I.C. (1999) Valacyclovir for the prevention of cytomegalovirus disease after renal transplantation. International Valacyclovir Cytomegalovirus Prophylaxis Transplantation Study Group. *N Engl J Med* 340(19), 1462-70.
- Luppi, M., Barozzi, P., Marasca, R., Ceccherini-Nelli, L., Ceccherelli, G. and Torelli, G. (1995) Human herpesvirus-6 (HHV-6) in blood donors. *Br J Haematol* 89(4), 943-5.
- Luppi, M., Barozzi, P., Morris, C., Maiorana, A., Garber, R., Bonacorsi, G., Donelli, A., Marasca, R., Tabilio, A. and Torelli, G. (1999) Human herpesvirus 6 latently infects early bone marrow progenitors in vivo. *J Virol* 73(1), 754-9.
- Luppi, M., Barozzi, P., Morris, C.M., Merelli, E. and Torelli, G. (1998) Integration of human herpesvirus 6 genome in human chromosomes. *Lancet* 352(9141), 1707-8.
- Luppi, M., Marasca, R., Barozzi, P., Ferrari, S., Ceccherini-Nelli, L., Batoni, G., Merelli, E. and Torelli, G. (1993) Three cases of human herpesvirus-6 latent infection: integration of viral genome in peripheral blood mononuclear cell DNA. *J Med Virol* 40(1), 44-52.
- Lusso, P., De Maria, A., Malnati, M., Lori, F., DeRocco, S.E., Baseler, M. and Gallo, R.C. (1991a) Induction of CD4 and susceptibility to HIV-1 infection in human CD8⁺ T lymphocytes by human herpesvirus 6. *Nature* 349(6309), 533-5.
- Lusso, P. and Gallo, R.C. (1994) Human herpesvirus 6 in AIDS. *Lancet* 343(8897), 555-6.
- Lusso, P., Malnati, M., De Maria, A., Balotta, C., DeRocco, S.E., Markham, P.D. and Gallo, R.C. (1991b) Productive infection of CD4⁺ and CD8⁺ mature human T cell populations and clones by human herpesvirus 6. Transcriptional down-regulation of CD3. *J Immunol* 147(2), 685-91.
- MacCormac, L.P. and Grundy, J.E. (1996) Human cytomegalovirus induces an Fc gamma receptor (Fc gammaR) in endothelial cells and fibroblasts that is distinct from the human cellular Fc gammaRs. *J Infect Dis* 174(6), 1151-61.
- Maciejewski, J.P., Bruening, E.E., Donahue, R.E., Mocarski, E.S., Young, N.S. and St Jeor, S.C. (1992) Infection of hematopoietic progenitor cells by human cytomegalovirus. *Blood* 80(1), 170-8.
- Maciejewski, J.P. and St Jeor, S.C. (1999) Human cytomegalovirus infection of human hematopoietic progenitor cells. *Leuk Lymphoma* 33(1-2), 1-13.
- Mahe, B., Pineau, D., Robillard, N., Accard, F. and Hermouet, S. (1996) Ex vivo expansion of hematopoietic progenitors from CD34⁺ cells selected from leukapheresis products of lymphoma and myeloma patients: feasibility and enhancement by fibronectin. *J Hematother* 5(6), 671-9.

- Manichanh, C., Grenot, P., Gautheret-Dejean, A., Debre, P., Huraux, J.M. and Agut, H. (2000) Susceptibility of human herpesvirus 6 to antiviral compounds by flow cytometry analysis. *Cytometry* 40(2), 135-40.
- Manichanh, C., Olivier-Aubron, C., Lagarde, J.P., Aubin, J.T., Bossi, P., Gautheret-Dejean, A., Huraux, J.M. and Agut, H. (2001) Selection of the same mutation in the U69 protein kinase gene of human herpesvirus-6 after prolonged exposure to ganciclovir in vitro and in vivo. *J Gen Virol* 82(Pt 11), 2767-76.
- Martin, M.E., Nicholas, J., Thomson, B.J., Newman, C. and Honess, R.W. (1991) Identification of a transactivating function mapping to the putative immediate-early locus of human herpesvirus 6. *J Virol* 65(10), 5381-90.
- McNiece, I., Jones, R., Bearman, S.I., Cagnoni, P., Nieto, Y., Franklin, W., Ryder, J., Steele, A., Stoltz, J., Russell, P., McDermitt, J., Hogan, C., Murphy, J. and Shpall, E.J. (2000) Ex vivo expanded peripheral blood progenitor cells provide rapid neutrophil recovery after high-dose chemotherapy in patients with breast cancer. *Blood* 96(9), 3001-7.
- Mendelson, M., Monard, S., Sissons, P. and Sinclair, J. (1996) Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors. *J Gen Virol* 77(Pt 12), 3099-102.
- Mendez, J.C., Dockrell, D.H., Espy, M.J., Smith, T.F., Wilson, J.A., Harmsen, W.S., Ilstrup, D. and Paya, C.V. (2001) Human beta-herpesvirus interactions in solid organ transplant recipients. *J Infect Dis* 183(2), 179-184.
- Meyer-Konig, U., Serr, A., von Laer, D., Kirste, G., Wolff, C., Haller, O., Neumann-Haefelin, D. and Hufert, F.T. (1995) Human cytomegalovirus immediate early and late transcripts in peripheral blood leukocytes: diagnostic value in renal transplant recipients. *J Infect Dis* 171(3), 705-9.
- Michelson, S. (1998) Mechanisms of immunosuppression by human cytomegalovirus. In: M. Scholz, H.F. Rabenau, H.W. Doerr and J. Cinatl (Eds), *CMV-related immunopathology. Monographs in Virology*, Basel, Karger, pp. 12-28.
- Michelson, S., Dal Monte, P., Zipeto, D., Bodaghi, B., Laurent, L., Oberlin, E., Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J.L. and Landini, M.P. (1997) Modulation of RANTES production by human cytomegalovirus infection of fibroblasts. *J Virol* 71(9), 6495-500.
- Michelson, S., Rohrlisch, P., Beisser, P., Laurent, L., Perret, E., Prevost, M.C., Monchatre, E., Duval, M., Marolleau, J.P. and Charbord, P. (2001) Human cytomegalovirus infection of bone marrow myofibroblasts enhances myeloid progenitor adhesion and elicits viral transmission. *Microbes Infect* 3(12), 1005-13.
- Minton, E.J., Tysoe, C., Sinclair, J.H. and Sissons, J.G. (1994) Human cytomegalovirus infection of the monocyte/macrophage lineage in bone marrow. *J Virol* 68(6), 4017-21.
- Mirandola, P., Menegazzi, P., Merighi, S., Ravaioli, T., Cassai, E. and Di Luca, D. (1998) Temporal mapping of transcripts in herpesvirus 6 variants. *J Virol* 72(5), 3837-44.
- Miyoshi, H., Tanaka-Taya, K., Hara, J., Fujisaki, H., Matsuda, Y., Ohta, H., Osugi, Y., Okada, S. and Yamanishi, K. (2001) Inverse relationship between human herpesvirus-6 and -7 detection after allogeneic and autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 27(10), 1065-70.
- Mocarski, E.S. and Courcelle, C.T. (2001) Cytomegaloviruses and their replication. In: D.M. Knipe and P.M. Howley (Eds), *Fields Virology*, 4th ed, Vol. 2, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 2629-2674.
- Molina, A., Popplewell, L., Kashyap, A. and Nademanee, A. (2000) Hematopoietic stem cell transplantation in the new millennium: report from City of Hope National Medical Center. *Clin Transpl*, 317-42.

- Mookerjee, B.P. and Vogelsang, G. (1997) Human herpes virus-6 encephalitis after bone marrow transplantation: successful treatment with ganciclovir. *Bone Marrow Transplant* 20(10), 905-6.
- Mori, Y., Akkapaiboon, P., Yang, X. and Yamanishi, K. (2003) The human herpesvirus 6 U100 gene product is the third component of the gH-gL glycoprotein complex on the viral envelope. *J Virol* 77(4), 2452-8.
- Mori, Y., Seya, T., Huang, H.L., Akkapaiboon, P., Dhepakson, P. and Yamanishi, K. (2002) Human herpesvirus 6 variant A but not variant B induces fusion from without in a variety of human cells through a human herpesvirus 6 entry receptor, CD46. *J Virol* 76(13), 6750-61.
- Movassagh, M., Gozlan, J., Senechal, B., Baillou, C., Petit, J.C. and Lemoine, F.M. (1996) Direct infection of CD34+ progenitor cells by human cytomegalovirus: evidence for inhibition of hematopoiesis and viral replication. *Blood* 88(4), 1277-83.
- Mullberg, J., Hsu, M.L., Rauch, C.T., Gerhart, M.J., Kaykas, A. and Cosman, D. (1999) The R27080 glycoprotein is abundantly secreted from human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *J Gen Virol* 80(Pt 2), 437-40.
- Musso, O., Sommer, P., Drouet, E., Cotte, L., Neyra, M., Grimaud, J.A. and Chevallier, M. (1996) In situ detection of human cytomegalovirus DNA in gastrointestinal biopsies from AIDS patients by means of various PCR-derived methods. *J Virol Methods* 56(2), 125-37.
- Myers, T.W. and Gelfand, D.H. (1991) Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry* 30(31), 7661-6.
- Najioullah, F., Thouvenot, D. and Lina, B. (2001) Development of a real-time PCR procedure including an internal control for the measurement of HCMV viral load. *J Virol Methods* 92(1), 55-64.
- Nelson, C.T. and Demmler, G.J. (1997) Cytomegalovirus infection in the pregnant mother, fetus, and newborn infant. *Clin Perinatol* 24(1), 151-60.
- Nelson, P.N., Rawal, B.K., Boriskin, Y.S., Mathers, K.E., Powles, R.L., Steel, H.M., Tryhorn, Y.S., Butcher, P.D. and Booth, J.C. (1996) A polymerase chain reaction to detect a spliced late transcript of human cytomegalovirus in the blood of bone marrow transplant recipients. *J Virol Methods* 56(2), 139-48.
- Nicolini, U., Kustermann, A., Tassis, B., Fogliani, R., Galimberti, A., Percivalle, E., Grazia Revello, M. and Gerna, G. (1994) Prenatal diagnosis of congenital human cytomegalovirus infection. *Prenat Diagn* 14(10), 903-6.
- Okuno, T., Higashi, K., Shiraki, K., Yamanishi, K., Takahashi, M., Kokado, Y., Ishibashi, M., Takahara, S., Sonoda, T., Tanaka, K. and et al. (1990) Human herpesvirus 6 infection in renal transplantation. *Transplantation* 49(3), 519-22.
- Okuno, T., Shao, H., Asada, H., Shiraki, K., Takahashi, M. and Yamanishi, K. (1992) Analysis of human herpesvirus 6 glycoproteins recognized by monoclonal antibody OHV1. *J Gen Virol* 73(Pt 2), 443-7.
- Oster, B. and Hollsberg, P. (2002) Viral gene expression patterns in human herpesvirus 6B-infected T cells. *J Virol* 76(15), 7578-86.
- Papanikolaou, E., Kouvatsis, V., Dimitriadis, G., Inoue, N. and Arsenakis, M. (2002) Identification and characterization of the gene products of open reading frame U86/87 of human herpesvirus 6. *Virus Res* 89(1), 89-101.
- Paquette, R.L., Dergham, S.T., Karpf, E., Wang, H.J., Slamon, D.J., Souza, L. and Glaspy, J.A. (2000) Ex vivo expanded unselected peripheral blood: progenitor cells reduce posttransplantation neutropenia, thrombocytopenia, and anemia in patients with breast cancer. *Blood* 96(7), 2385-90.

- Paquette, R.L., Dergham, S.T., Karpf, E., Wang, H.J., Slamon, D.J., Souza, L. and Glaspy, J.A. (2002) Culture conditions affect the ability of ex vivo expanded peripheral blood progenitor cells to accelerate hematopoietic recovery. *Exp Hematol* 30(4), 374-80.
- Pass, R.F. (2001) Cytomegalovirus. In: D.M. Knipe and P.M. Howley (Eds), *Fields Virology*, 4th ed, Vol. 2, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 2675-2706.
- Patel, R. and Paya, C.V. (1997) Infections in solid-organ transplant recipients. *Clin Microbiol Rev* 10(1), 86-124.
- Paya, C.V., Wold, A.D. and Smith, T.F. (1988) Detection of cytomegalovirus from blood leukocytes separated by sepracell-MN and Ficoll-Paque/Macrodex methods. *J Clin Microbiol* 26(10), 2031-3.
- Pecora, A.L. (2001) Progress in clinical application of use of progenitor cells expanded with hematopoietic growth factors. *Curr Opin Hematol* 8(3), 142-8.
- Persing, D.H. (1993) In vitro nucleic acid amplification techniques. In: D.H. Persing, F.C. Tenover and T.J. White (Eds), *Diagnostic molecular microbiology : principles and applications.*, American Society for Microbiology, Washington, D.C, pp. 51-87.
- Petric, M. and Szymanski, M. (2000) Electron Microscopy and Immunoelectron Microscopy. In: S. Specter, R.L. Hodinka and N.S. Young (Eds), *Clinical Virology manual*, American Society for Microbiology, Washington, D.C, pp. 54-65.
- Pfeiffer, B., Berneman, Z.N., Neipel, F., Chang, C.K., Tirwatnapong, S. and Chandran, B. (1993) Identification and mapping of the gene encoding the glycoprotein complex gp82-gp105 of human herpesvirus 6 and mapping of the neutralizing epitope recognized by monoclonal antibodies. *J Virol* 67(8), 4611-20.
- Pfeiffer, B., Thomson, B. and Chandran, B. (1995) Identification and characterization of a cDNA derived from multiple splicing that encodes envelope glycoprotein gp105 of human herpesvirus 6. *J Virol* 69(6), 3490-500.
- Plachter, B., Sinzger, C. and Jahn, G. (1996) Cell types involved in replication and distribution of human cytomegalovirus. *Adv Virus Res* 46, 195-261.
- Plotkin, S.A. (1999) Vaccination against cytomegalovirus, the changeling demon. *Pediatr Infect Dis J* 18(4), 313-25; quiz 326.
- Poirier-Toulemonde, A.S., Imbert-Marcille, B.M., Ferre-Aubineau, V., Besse, B., Le Roux, M.G., Cantarovich, D. and Billaudel, S. (1997) Successful quantification of cytomegalovirus DNA by competitive PCR and detection with capillary electrophoresis. *Mol Cell Probes* 11(1), 11-23.
- Poirier-Toulemonde, A.S., Milpied, N., Cantarovich, D., Morcet, J.F., Billaudel, S. and Imbert-Marcille, B.M. (2000) Clinical relevance of direct quantification of pp65 antigenemia using flow cytometry in solid organ and stem cell transplant recipients. *J Clin Microbiol* 38(9), 3143-9.
- Randhawa, P.S., Manez, R., Frye, B. and Ehrlich, G.D. (1994) Circulating immediate-early mRNA in patients with cytomegalovirus infections after solid organ transplantation. *J Infect Dis* 170(5), 1264-7.
- Ranger-Rogez, S., Venot, C., Aubard, F., Denis, F. and Freymuth, F. (1999) Cytomegalovirus. In: F. Denis (Ed), *Les virus transmissibles de la mère à l'enfant*, John Libbey Eurotext : selection Medecine Sciences, Paris, pp. 214-239.
- Ranger-Rogez, S., Vidal, E., Labrousse, F., Riche, A., Vidal, J., Collineau, M., Liozon, F. and Denis, F. (1995) Large-scale study suggests no direct link between human herpesvirus-6 and primary Sjogren's syndrome. *J Med Virol* 47(3), 198-203.
- Ranger-Rogez, S., Vidal, E., Liozon, F. and Denis, F. (1994) Primary Sjogren's syndrome and antibodies to human herpesvirus type 6. *Clin Infect Dis* 19(6), 1159-60.
- Rawlinson, W.D. and Barrell, B.G. (1993) Spliced transcripts of human cytomegalovirus. *J Virol* 67(9), 5502-13.

- Reiffers, J., Cailliot, C., Dazey, B., Attal, M., Caraux, J. and Boiron, J.M. (1999) Abrogation of post-myeloablative chemotherapy neutropenia by ex-vivo expanded autologous CD34-positive cells. *Lancet* 354(9184), 1092-3.
- Retiere, C., Imbert, B.M., David, G., Courcoux, P. and Hallet, M.M. (1998) A polymorphism in the major immediate-early gene delineates groups among cytomegalovirus clinical isolates. *Virus Res* 57(1), 43-51.
- Retiere, C., Lesimple, B., Lepelletier, D., Bignon, J.D., Hallet, M.M. and Imbert-Marcille, B.M. (2003) Association of glycoprotein B and immediate early-1 genotypes with human leukocyte antigen alleles in renal transplant recipients with cytomegalovirus infection. *Transplantation* 75(1), 161-5.
- Revello, M.G., Lillieri, D., Zavattoni, M., Stronati, M., Bollani, L., Middeldorp, J.M. and Gerna, G. (2001) Human cytomegalovirus immediate-early messenger RNA in blood of pregnant women with primary infection and of congenitally infected newborns. *J Infect Dis* 184(8), 1078-81.
- Revello, M.G., Percivalle, E., Arbustini, E., Pardi, R., Sozzani, S. and Gerna, G. (1998) In vitro generation of human cytomegalovirus pp65 antigenemia, viremia, and leukoDNAemia. *J Clin Invest* 101(12), 2686-92.
- Revello, M.G., Percivalle, E., Di Matteo, A., Morini, F. and Gerna, G. (1992) Nuclear expression of the lower matrix protein of human cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes of immunocompromised viraemic patients. *J Gen Virol* 73(Pt 2), 437-42.
- Rieux, C., Gautheret-Dejean, A., Challine-Lehmann, D., Kirch, C., Agut, H. and Vernant, J.P. (1998) Human herpesvirus-6 meningoencephalitis in a recipient of an unrelated allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 65(10), 1408-11.
- Robert, C., Agut, H., Aubin, J.T., Collandre, H., Ingrand, D., Devillechabrolle, A., LeHoang, P. and Huraux, J.M. (1990) Detection of antibodies to human herpesvirus-6 using immunofluorescence assay. *Res Virol* 141(5), 545-55.
- Robert, C., Massonneau, V., Pothier, P., Clement, A., Hejblum, G., Hubert, P., Aubin, J.T. and Agut, H. (1998) Selection and characterization of two specific monoclonal antibodies directed against the two variants of human herpesvirus-6. *Res Virol* 149(6), 403-11.
- Roffman, E., Albert, J.P., Goff, J.P. and Frenkel, N. (1990) Putative site for the acquisition of human herpesvirus 6 virion tegument. *J Virol* 64(12), 6308-13.
- Ruger, B., Klages, S., Walla, B., Albrecht, J., Fleckenstein, B., Tomlinson, P. and Barrell, B. (1987) Primary structure and transcription of the genes coding for the two virion phosphoproteins pp65 and pp71 of human cytomegalovirus. *J Virol* 61(2), 446-53.
- Rutella, S., Pierelli, L., Sica, S., Rumi, C. and Leone, G. (2001) Transplantation of autologous peripheral blood progenitor cells: impact of CD34-cell selection on immunological reconstitution. *Leuk Lymphoma* 42(6), 1207-20.
- Safrin, S., Cherrington, J. and Jaffe, H.S. (1999) Cidofovir. Review of current and potential clinical uses. *Adv Exp Med Biol* 458, 111-20.
- Saito, Y., Sharer, L.R., Dewhurst, S., Blumberg, B.M., Hall, C.B. and Epstein, L.G. (1995) Cellular localization of human herpesvirus-6 in the brains of children with AIDS encephalopathy. *J Neurovirol* 1(1), 30-9.
- Salahuddin, S.Z., Ablashi, D.V., Markham, P.D., Josephs, S.F., Sturzenegger, S., Kaplan, M., Halligan, G., Biberfeld, P., Wong-Staal, F., Kramarsky, B. and et al. (1986) Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science* 234(4776), 596-601.
- Salmon-Ceron, D., Mazon, M.C., Chaput, S., Boukli, N., Senechal, B., Houhou, N., Katlama, C., Matheron, S., Fillet, A.M., Gozlan, J., Leport, C., Jeantils, V., Freymuth, F. and Costagliola, D. (2000) Plasma cytomegalovirus DNA, pp65 antigenaemia and a

- low CD4 cell count remain risk factors for cytomegalovirus disease in patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Aids* 14(8), 1041-9.
- Sansonno, D., Lotesoriere, C., Cornacchiulo, V., Fanelli, M., Gatti, P., Iodice, G., Racanelli, V. and Dammacco, F. (1998) Hepatitis C virus infection involves CD34(+) hematopoietic progenitor cells in hepatitis C virus chronic carriers. *Blood* 92(9), 3328-37.
- Santoro, F., Kennedy, P.E., Locatelli, G., Malnati, M.S., Berger, E.A. and Lusso, P. (1999) CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell* 99(7), 817-27.
- Schaade, L., Kockelkorn, P., Ritter, K. and Kleines, M. (2000) Detection of cytomegalovirus DNA in human specimens by LightCycler PCR. *J Clin Microbiol* 38(11), 4006-9.
- Schumm, M., Lang, P., Taylor, G., Kuci, S., Klingebiel, T., Buhring, H.J., Geiselhart, A., Niethammer, D. and Handgretinger, R. (1999) Isolation of highly purified autologous and allogeneic peripheral CD34+ cells using the CliniMACS device. *J Hematother* 8(2), 209-18.
- Sciortino, M.T., Suzuki, M., Taddeo, B. and Roizman, B. (2001) RNAs extracted from herpes simplex virus 1 virions: apparent selectivity of viral but not cellular RNAs packaged in virions. *J Virol* 75(17), 8105-16.
- Scott, G.M., Barrell, B.G., Oram, J. and Rawlinson, W.D. (2002) Characterisation of transcripts from the human cytomegalovirus genes TRL7, UL20a, UL36, UL65, UL94, US3 and US34. *Virus Genes* 24(1), 39-48.
- Segondy, M. and Michelson, S. (1999) Cytomegalovirus. Réponse immunitaire. In: V. Marechal, M. Segondy and J.C. Nicolas (Eds), *Les herpesvirus humain*, Elsevier : collection Option Bio, pp. 237-263.
- Shpall, E.J. (1999) The utilization of cytokines in stem cell mobilization strategies. *Bone Marrow Transplant* 23(Suppl 2), S13-9.
- Simmons, P., Kaushansky, K. and Torok-Storb, B. (1990) Mechanisms of cytomegalovirus-mediated myelosuppression: perturbation of stromal cell function versus direct infection of myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(4), 1386-90.
- Sindre, H., Tjoonnfjord, G.E., Rollag, H., Ranneberg-Nilsen, T., Veiby, O.P., Beck, S., Degre, M. and Hestdal, K. (1996) Human cytomegalovirus suppression of and latency in early hematopoietic progenitor cells. *Blood* 88(12), 4526-33.
- Sing, G.K. and Ruscetti, F.W. (1990) Preferential suppression of myelopoiesis in normal human bone marrow cells after in vitro challenge with human cytomegalovirus. *Blood* 75(10), 1965-73.
- Singh, N. and Carrigan, D.R. (1996) Human herpesvirus-6 in transplantation: an emerging pathogen. *Ann Intern Med* 124(12), 1065-71.
- Singh, N., Carrigan, D.R., Gayowski, T., Singh, J. and Marino, I.R. (1995) Variant B human herpesvirus-6 associated febrile dermatosis with thrombocytopenia and encephalopathy in a liver transplant recipient. *Transplantation* 60(11), 1355-7.
- Sinzger, C., Grefte, A., Plachter, B., Gouw, A.S., The, T.H. and Jahn, G. (1995) Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J Gen Virol* 76(Pt 4), 741-50.
- Sinzger, C., Kahl, M., Laib, K., Klingel, K., Rieger, P., Plachter, B. and Jahn, G. (2000) Tropism of human cytomegalovirus for endothelial cells is determined by a post-entry step dependent on efficient translocation to the nucleus. *J Gen Virol* 81(Pt 12), 3021-35.
- Sissons, J.G., Bain, M. and Wills, M.R. (2002) Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Infect* 44(2), 73-7.

- Slobedman, B. and Mocarski, E.S. (1999) Quantitative analysis of latent human cytomegalovirus. *J Virol* 73(6), 4806-12.
- Soderberg, C., Larsson, S., Bergstedt-Lindqvist, S. and Moller, E. (1993) Definition of a subset of human peripheral blood mononuclear cells that are permissive to human cytomegalovirus infection. *J Virol* 67(6), 3166-75.
- Soderberg-Naucleer, C., Fish, K.N. and Nelson, J.A. (1997) Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell* 91(1), 119-26.
- Soderberg-Naucleer, C. and Nelson, J.Y. (1999) Human cytomegalovirus latency and reactivation - a delicate balance between the virus and its host's immune system. *Intervirology* 42(5-6), 314-21.
- Soderberg-Naucleer, C., Streblow, D.N., Fish, K.N., Allan-Yorke, J., Smith, P.P. and Nelson, J.A. (2001) Reactivation of latent human cytomegalovirus in CD14(+) monocytes is differentiation dependent. *J Virol* 75(16), 7543-54.
- Spira, T.J., Bozeman, L.H., Sanderlin, K.C., Warfield, D.T., Feorino, P.M., Holman, R.C., Kaplan, J.E., Fishbein, D.B. and Lopez, C. (1990) Lack of correlation between human herpesvirus-6 infection and the course of human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 161(3), 567-70.
- Stanier, P., Taylor, D.L., Kitchen, A.D., Wales, N., Tryhorn, Y. and Tyms, A.S. (1989) Persistence of cytomegalovirus in mononuclear cells in peripheral blood from blood donors. *Bmj* 299(6704), 897-8.
- Starr, S.E., Friedman, H.M. and Plotkin, S.A. (1991) The status of cytomegalovirus vaccine. *Rev Infect Dis* 13(Suppl 11), S964-5.
- Suga, S., Yoshikawa, T., Asano, Y., Nakashima, T., Yazaki, T., Fukuda, M., Kojima, S., Matsuyama, T., Ono, Y. and Oshima, S. (1992) IgM neutralizing antibody responses to human herpesvirus-6 in patients with exanthem subitum or organ transplantation. *Microbiol Immunol* 36(5), 495-506.
- Takahashi, K., Segal, E., Kondo, T., Mukai, T., Moriyama, M., Takahashi, M. and Yamanishi, K. (1992) Interferon and natural killer cell activity in patients with exanthem subitum. *Pediatr Infect Dis J* 11(5), 369-73.
- Takahashi, K., Sonoda, S., Higashi, K., Kondo, T., Takahashi, H., Takahashi, M. and Yamanishi, K. (1989) Predominant CD4 T-lymphocyte tropism of human herpesvirus 6-related virus. *J Virol* 63(7), 3161-3.
- Taylor-Wiedeman, J., Sissons, P. and Sinclair, J. (1994) Induction of endogenous human cytomegalovirus gene expression after differentiation of monocytes from healthy carriers. *J Virol* 68(3), 1597-604.
- The, T.H., van den Berg, A.P., Harmsen, M.C., van der Bij, W. and van Son, W.J. (1995) The cytomegalovirus antigenemia assay: a plea for standardization. *Scand J Infect Dis Suppl* 99, 25-9.
- Thomson, B.J., Dewhurst, S. and Gray, D. (1994) Structure and heterogeneity of the sequences of human herpesvirus 6 strain variants U1102 and Z29 and identification of human telomeric repeat sequences at the genomic termini. *J Virol* 68(5), 3007-14.
- Tong, C.Y., Cuevas, L.E., Williams, H. and Bakran, A. (2000) Prediction and diagnosis of cytomegalovirus disease in renal transplant recipients using qualitative and quantitative polymerase chain reaction. *Transplantation* 69(5), 985-91.
- Tortorella, D., Gewurz, B., Schust, D., Furman, M. and Ploegh, H. (2000a) Down-regulation of MHC class I antigen presentation by HCMV; lessons for tumor immunology. *Immunol Invest* 29(2), 97-100.
- Tortorella, D., Gewurz, B.E., Furman, M.H., Schust, D.J. and Ploegh, H.L. (2000b) Viral subversion of the immune system. *Annu Rev Immunol* 18, 861-926.

- Trimoreau, F. and Praloran, V. (2000) Hématopoïèse et sa régulation. In: G. Sebahoune (Ed), *Hématologie clinique et biologique*, Arnette.
- Uchida, N., Buck, D.W., He, D., Reitsma, M.J., Masek, M., Phan, T.V., Tsukamoto, A.S., Gage, F.H. and Weissman, I.L. (2000) Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(26), 14720-5.
- van der Bij, W., Schirm, J., Torensma, R., van Son, W.J., Tegzess, A.M. and The, T.H. (1988) Comparison between viremia and antigenemia for detection of cytomegalovirus in blood. *J Clin Microbiol* 26(12), 2531-5.
- von Laer, D., Meyer-Koenig, U., Serr, A., Finke, J., Kanz, L., Fauser, A.A., Neumann-Haefelin, D., Brugger, W. and Hufert, F.T. (1995a) Detection of cytomegalovirus DNA in CD34+ cells from blood and bone marrow. *Blood* 86(11), 4086-90.
- von Laer, D., Serr, A., Meyer-Konig, U., Kirste, G., Hufert, F.T. and Haller, O. (1995b) Human cytomegalovirus immediate early and late transcripts are expressed in all major leukocyte populations in vivo. *J Infect Dis* 172(2), 365-70.
- Wang, F.Z., Dahl, H., Linde, A., Brytting, M., Ehrnst, A. and Ljungman, P. (1996) Lymphotropic herpesviruses in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 88(9), 3615-20.
- Wang, F.Z., Dahl, H., Ljungman, P. and Linde, A. (1999) Lymphoproliferative responses to human herpesvirus-6 variant A and variant B in healthy adults. *J Med Virol* 57(2), 134-9.
- Ward, K.N., Turner, D.J., Parada, X.C. and Thiruchelvam, A.D. (2001) Use of immunoglobulin G antibody avidity for differentiation of primary human herpesvirus 6 and 7 infections. *J Clin Microbiol* 39(3), 959-63.
- Wilborn, F., Brinkmann, V., Schmidt, C.A., Neipel, F., Gelderblom, H. and Siegert, W. (1994a) Herpesvirus type 6 in patients undergoing bone marrow transplantation: serologic features and detection by polymerase chain reaction. *Blood* 83(10), 3052-8.
- Wilborn, F., Schmidt, C.A., Zimmermann, R., Brinkmann, V., Neipel, F. and Siegert, W. (1994b) Detection of herpesvirus type 6 by polymerase chain reaction in blood donors: random tests and prospective longitudinal studies. *Br J Haematol* 88(1), 187-92.
- Winston, D.J., Huang, E.S., Miller, M.J., Lin, C.H., Ho, W.G., Gale, R.P. and Champlin, R.E. (1985) Molecular epidemiology of cytomegalovirus infections associated with bone marrow transplantation. *Ann Intern Med* 102(1), 16-20.
- Yadav, M., Arivananthan, M., Chandrashekan, A., Tan, B.S. and Hashim, B.Y. (1997) Human herpesvirus-6 (HHV-6) DNA and virus-encoded antigen in oral lesions. *J Oral Pathol Med* 26(9), 393-401.
- Yamanishi, K. (2001) Human Herpesvirus 6 and Human Herpesvirus 7. In: D.M. Knipe and P.M. Howley (Eds), *Fields Virology*, 4th ed, Vol. 2, Lipincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Yamanishi, K., Kondo, T., Kondo, K., Hayakawa, Y., Kido, S., Takahashi, K. and Takahashi, M. (1990) Exanthem subitum and human herpesvirus 6 (HHV-6) infection. *Adv Exp Med Biol* 278, 29-37.
- Yamanishi, K., Okuno, T., Shiraki, K., Takahashi, M., Kondo, T., Asano, Y. and Kurata, T. (1988) Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet* 1, 1065-1067.
- Yasukawa, M., Ohminami, H., Sada, E., Yakushijin, Y., Kaneko, M., Yanagisawa, K., Kohno, H., Bando, S. and Fujita, S. (1999) Latent infection and reactivation of human herpesvirus 6 in two novel myeloid cell lines. *Blood* 93(3), 991-9.
- Yasukawa, M., Yakushijin, Y., Furukawa, M. and Fujita, S. (1993) Specificity analysis of human CD4+ T-cell clones directed against human herpesvirus 6 (HHV-6), HHV-7, and human cytomegalovirus. *J Virol* 67(10), 6259-64.

- Yeager, A.S., Grumet, F.C., Hafleigh, E.B., Arvin, A.M., Bradley, J.S. and Prober, C.G. (1981) Prevention of transfusion-acquired cytomegalovirus infections in newborn infants. *J Pediatr* 98(2), 281-7.
- Yoshida, M., Yamada, M., Tsukazaki, T., Chatterjee, S., Lakeman, F.D., Nii, S. and Whitley, R.J. (1998) Comparison of antiviral compounds against human herpesvirus 6 and 7. *Antiviral Res* 40(1-2), 73-84.
- Yoshikawa, T., Suga, S., Asano, Y., Nakashima, T., Yazaki, T., Ono, Y., Fujita, T., Tsuzuki, K., Sugiyama, S. and Oshima, S. (1992) A prospective study of human herpesvirus-6 infection in renal transplantation. *Transplantation* 54(5), 879-83.
- Yoshikawa, T., Suga, S., Asano, Y., Nakashima, T., Yazaki, T., Sobue, R., Hirano, M., Fukuda, M., Kojima, S. and Matsuyama, T. (1991) Human herpesvirus-6 infection in bone marrow transplantation. *Blood* 78(5), 1381-4.
- Yoshikawa, T., Suzuki, K., Ihira, M., Furukawa, H., Suga, S., Asano, Y., Kojima, S., Kato, K. and Matsuyama, T. (1998) Prediction of human herpesvirus 6 infection after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 92(7), 2597-9.
- Zerr, D.M., Yeung, L.C., Obrigewitch, R.M., Huang, M.L., Frenkel, L.M. and Corey, L. (2002) Case report: primary human herpesvirus-6 associated with an afebrile seizure in a 3-week-old infant. *J Med Virol* 66(3), 384-7.
- Zhuravskaya, T., Maciejewski, J.P., Netski, D.M., Bruening, E., Mackintosh, F.R. and St Jeor, S. (1997) Spread of human cytomegalovirus (HCMV) after infection of human hematopoietic progenitor cells: model of HCMV latency. *Blood* 90(6), 2482-91.

ANNEXES

Annexe 1 : Culture du CMVH

Préparation des cellules MRC-5

- à la réception des MRC-5 (Biomerieux): préparation d'une suspension à 3.10^5 cellules/ml dans un milieu de croissance (MEM avec 8% de sérum de veau fœtal, 1% de L-glutamine et 1% d'un mélange d'antibiotiques)
- répartition stérile en flasques (Nunc) de 25 cm² (6 ml) ou de 75 cm² (30ml)
- culture à 37° C sous 5% de CO₂ pendant 3 à 4 jours
- observation de la progression de la confluence des cellules au microscope inversé
- changement du milieu de culture pour un milieu nutritif minimum (MEM avec 2% de sérum de veau fœtal, 1% de L-glutamine et 1% d'un mélange d'antibiotiques)
- culture à 37° C, survie pendant 10 à 15 jours

Entretien des souches de CMVH

Décongélation et mise en culture

- conservation des souches à -70° C : 2 à 5 millions de cellules 0.75ml de SVF+0.25ml MEM 20%DMSO
- décongélation rapide dans un bain-marie à 37° C
- transférer dans des conditions stériles le culot fraîchement décongelé dans 10 ml de MEM contenant 8% de SVF
- lavage : centrifugation à 1000g, 10 minutes à 4° C
- reprendre le culot cellulaire avec 6 ml de MEM+8% de SVF
- réalisation d'un contact de 2 heures avec des MRC-5 en culture à 37° C
- élimination de la suspension remplacée par du milieu de survie
- culture à 37° C avec surveillance microscopique pour détecter l'apparition d'un ECP

Repassage des souches

A partir d'un tapis cellulaire montrant au moins 50% d'ECP :

- élimination du milieu de culture
- rinçage de la nappe cellulaire avec une solution phosphatée stérile
- trypsination grâce à une solution de trypsine à 0.25% préalablement tiédie : contact de 3 minutes

- arrêt de l'action de l'enzyme par ajout de 10 ml de milieu+8% de SVF
- répartition du nouvel inoculum sur plusieurs flasques avec réalisation d'un contact comme décrit ci dessus

Préparation d'un stock de CMVH titré

_ Concentration du CMVH

- multiplication virale sur 16 flasques de 75 cm² jusqu'à un ECP >80% de la nappe cellulaire
- collection des milieux de culture contenant d'éventuel virions libres
- nappes cellulaires, reprises par 0.3 ml de milieu de survie, soumises à 3 phases de congélation/décongélation -70° C
- clarification de l'ensemble milieu de culture+cellules éclatées par une centrifugation à 2500 g pendant 30 minutes à 4°C (rotor JA 14, centrifugeuse J2-21M/E BECKMAN)
- ultra-centrifugation des surnageants à 30 000g (rotor, JA 17) huit heures à 4°C
- reprise des culots du virus dans du MEM + 10%de SVF et 10% de glycérol -
- préparation d'aliqots 200 µl conservés à -70° C.

_ Titrage des souches stockées

Titrage avant et après ultra centrifugation

- inoculation de 100 µl de chaque dilution de raison 10 dans 5 puits de cellules MRC- 5 d'une plaque de titration de 24 puits (Nunc)
- incubation à 37° C sous 5% de CO₂ pendant 48 heures
- élimination du milieu et fixation des cellules par une solution d'acétone glaciale à -20°C pendant 10 minutes
- séchage sous hotte
- incubation des cellules 30 minutes à 37°C avec 1,5 µg de l'anticorps monoclonal anti-CMVH E13 (argène)
- réalisation de deux lavages en PBS
- incubation 30 minutes à 37°C avec l'antiglobuline marquée à un fluorochrome (IgG antisouris couplée à l'isothiocyanate de fluorescéine (Bioatlantic), mélangée à une solution de bleu Evans)
- réalisation de deux lavages en PBS
- recouvrir les cellules d'une solution glycérol à 90%
- lecture à l'aide d'un microscope inversé (Leitz) équipé d'une lampe à U.V.

- numération des noyaux fluorescents dans les puits de chaque dilution permet la détermination de la dilution limite pour laquelle 50% des puits présentent encore des noyaux fluorescents.
- détermination du titre du virus en DITC_{50} /ml selon la formule de Reed et Muench.

Annexe 2 : Culture del'HHV6

Entretien et stimulation des CMSPs

- CMSPs issus de poche de lymphocytes de donneurs sains, isolés par ficoll
- congélation à -70°C ,après séparation et lavage, en aliquot de 5 millions de cellules en DMSO/SVF
- décongélation de 5 à 10 millions pour une nouvelle culture
- lavage des cellules dans 30 à 40 ml de RPMI+10% SVF
- centrifugation 10 min à 1500g
- élimination du surnageant et suspension dans 40 ml de RPMI
- homogénéisation de la suspension et numération des CMSPs
- centrifugation 10 min à 1500g
- mise en suspension dans une flasque ventilée de 200 ml à raison de 2 millions de CMSPs/ml en milieu de stimulation RPMI (Life Technologies) supplémenté par 10% de sérum de veau foetal, 1% d'un mélange antibiotique et $1\mu\text{g/ml}$ de phytohémaglutinine (PHA) et de l'interleukine 2 (IL-2)(20UI/ml)
- maintien des cellules à 37°C sous 5% de CO_2 pendant 48 heures à 72 heures
- arrêt de la stimulation par élimination du surnageant suivi deux lavages en RPMI
- remis en suspension à 1.10^6 cellules /ml dans le milieu d'entretien dépourvu de PHA
- maintien pendant 48 heures avant l'inoculation
- après inoculation changement du milieu de culture tous les 4 jours et rajout de 3 millions de cellules fraîches 1 fois par semaine
- maintien des cultures maximum 3 semaines

Entretien des cellules de lignées MT4

- conservation en aliquots congelés à 70°C en DMSO-SVF
- décongélation de 5 à 10 millions pour une nouvelle culture
- lavage des cellules dans 30 à 40 ml de RPMI+10% SVF
- centrifugation 10 min à 1500g
- élimination du surnageant et suspension dans 40 ml de RPMI
- homogénéisation de la suspension et numération des MT4
- centrifugation 10 min à 1500g

- mise en suspension dans une flasque ventilée de 200 ml à 37° C sous CO₂ à raison de 1 million de MT4/ml dans le milieu d'entretien des MT4 (RPMI avec 15%de SVF, 1% de L-glutamine, 1% d'un mélange antibiotiques)
- surveillance de la croissance rapide des cellules impliquant un entretien régulier comprenant une numération cellulaire tous les 4 jours avec un changement et un ajustement du volume de milieu de culture.

Cultures des souches d'HHV6

A partir d'un prélèvement de sang sur héparine

- isolement des CMPSs patient par ficoll
- numération des cellules du patient isolées
- mise en culture sous 5% CO₂ à 37° C avec un nombre équivalent de CMPSs du donneur sain ou de MT4
- observation de l'apparition de l'ECP (cellules réfringentes, ballonnées)
- dès 4 jours élimination de la moitié du surnageant
- à partir d'un ECP atteignant 30 à 40% des cellules conservation des surnageants en aliquot de 1.5ml à -70° C
- poursuite de l'entretien des cellules comme ci dessus
- au cours de la culture et /ou à la fin : congélation des cellules infectées en aliquot de 10.10⁶ cellules en DMSO-SVF

A partir d'aliquot de surnageant congelés

- décongélation rapide de 1.5 ml de surnageant
- préparation d'un culot de 10.10⁶ cellules (CBMCs ou MT4)
- reprise du culot par les 1.5 ml de surnageant, contact en flasque ventilée à 37° C sous 5% de CO₂ pendant deux heures
- ajout du milieu d'entretien pour obtenir une suspension cellulaire à 1.10⁶ cellules/ml

Constitution de stocks d'HHV6 titrés

Réalisées pour la souche de référence HST et la souche GUI

- mise en culture de surnageants en parallèle dans 6 flasques de 75 cm² contenant 30 millions de MT4
- en présence d'un ECP de 30%, collection des surnageants
- cellules soumises à trois phases de congélation(15 min) à -70°C /décongélation rapide
- clarification de l'ensemble à 2500 g pendant 15 minutes à 4°C
- conservation du surnageant en aliquot de 1.5ml à 5 ml à -70°C

_ Titrage du surnageant obtenu

- inoculation de 100 μl de chaque dilution de raison 10 dans 5 puits d'une plaque de titration de 24 puits (Nunc) contenant chacun 1ml d'une suspension à $1 \cdot 10^6$ CMPSs/ml
- incubation à 37°C sous 5% de CO_2 pendant 7 jours
- lecture de l'ECP associée à un contrôle de la positivité des cellules sur lame IF par marquage avec l'Ac 7C7
- à partir de ces données, le titre du virus en DITC_{50} /ml est calculé selon la formule de Reed et Muench.

Résumé :

Le Cytomégalo­virus humain (CMVH) et l'Herpès­virus humain de type 6 (HHV6) sont deux *Betaherpesvirinae* pré­sen­tant un tropisme majeur pour le système hématopoïétique. Ce travail a visé à évaluer leurs capacités de réplication au cours de la différenciation hématopoïétique.

Des outils méthodologiques autorisant la mise en évidence de la réplication virale ont été développés, permettant la détection de transcrits viraux tardifs par RT-PCR. Parmi les marqueurs développés pour le CMVH, l'ARNm tardif UL22, issu d'un épissage, a montré son intérêt, en particulier dans le cadre du diagnostic de l'infection active/maladie à CMVH. Pour l'HHV6, la détection du transcrit tardif multi-épissé de la gp 82-105 (U100) et la mise en évidence en cytométrie de flux d'antigènes nucléaires tardifs ont été développés à partir de cultures de souches virales de variant B. Ces essais ont permis de préciser que la forme épissée du gène U100 est exprimée en phase tardive du cycle de réplication, alors que la forme non épissée est un marqueur de la phase précoce.

La possibilité de survenue d'une réplication des deux virus au cours de l'expansion *ex vivo* de 10 prélèvements de cellules souches hématopoïétiques CD34+ périphériques, a ensuite été envisagée. Ces essais ont été réalisés dans le cadre d'une nouvelle approche thérapeutique, qui vise à réduire la durée d'aplasie, chez des sujets traités par hautes doses de chimiothérapie, grâce à l'injection de cellules souches différenciées *in vitro*. Les cultures ont été menées en milieu liquide, en présence de cytokines permettant d'engager la différenciation vers les lignées myéloïdes et monocytaires. Parmi les quatre cultures de cellules provenant de patients séropositifs pour le CMVH, aucun marqueur de réactivation virale n'a été détecté. A l'inverse, dans 5/10 cultures issues de prélèvements effectués chez les patients séropositifs pour l'HHV6, le transcrit U100 a été amplifié.

Ces données montrent pour la première fois et sans avoir recours à une infection préalable par une souche virale, une réplication de l'HHV6 due à une réactivation au cours de la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques. Ces résultats originaux soulèvent le problème de la sécurité virale lors des réinjections chez des patients immunodéprimés de cellules supportant une réplication de l'HHV6.

Title : Cytomegalovirus and Human Herpesvirus 6 : evaluation of their replication in hematopoietic cells

Abstract :

Cytomegalovirus (CMV) and Human Herpesvirus 6 (HHV6) were two β -Herpesvirus with a major tropism for hematopoietic system. Since their interactions with hematopoiesis are still poorly understood, we evaluated their replication capacity during differentiation of hematopoietic stem cells.

We first developed and evaluated tools to follow viral replication, by detection of late viral transcripts, which assess occurrence of a complete replication cycle. Among the CMV transcripts amplified by reverse transcription-PCR, the late spliced UL22 mRNA was of particular interest, notably to predict the occurrence CMV disease during active infection. For HHV6, a one-step RT-PCR amplifying the late alternatively U100 gene encoding the gp 82-105 glycoprotein and a flow cytometry method to analyse nuclear late antigens were developed from reference strains cultures. Evaluation of these methods was then realized during a sequential culture of HST strain on MT4 cells. This allows to specify that the U100 gene splicing starts at a late stage of multiplication whereas unspliced forms were detectable earlier in the cycle.

We then evaluated the occurrence of viral replication during *ex vivo* expansion of 10 peripheral hematopoietic stem cells (CD34+) samples. Cultures were maintained in a serum free liquid medium supplemented with cytokines of myeloid-monocyte lineage. Neither CMV DNA nor CMV UL22 or UL86 mRNA were detected among the 4 cultures from CMV seropositive patients. Conversely, the late alternatively spliced U100 mRNA (HHV6) was detected at day 14 or 21 in 5/10 cultures from HHV6 seropositive patients.

Our data demonstrated for the first time that HHV6 could enter in a replicative cycle during hematopoietic differentiation in the absence of *in vitro* infection of cells. This also raised the question of the viral safety of the infusion of *ex-vivo* expanded CD34-positive PBPCs.

Discipline : Virologie moléculaire

MOTS CLES : CYTOMEGALOVIRUS- HERPESVIRUS HUMAIN DE TYPE 6-SYSTEME HEMATOPOÏETIQUE -RT-PCR-REPLICATION VIRALE
