

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Science – Technologie – Santé

FACULTE des Sciences et Techniques

Année : 2005

Thèse N° [37-2005]

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline : Biologie – Sciences - Santé

présentée et soutenue par

Melle Karine PRADEAU

Le 12 octobre 2005

Réactivation de l'herpèsvirus humain de type 6 (HHV-6) : outils de détection et mécanismes moléculaires

Thèse dirigée par Sylvie RANGER-ROGEZ

JURY :

Président:

Mr François Denis

Professeur, Université de Limoges

Rapporteurs:

Mr Vincent MARECHAL

Professeur, Université Paris VI

Mme Berthe-Marie IMBERT-MARCILLE

Professeur, Université de Nantes

Examineurs:

Mr Emmanuel DROUET

Professeur, Université de Grenoble

Mr Gérard AGIUS

Professeur, Université de Poitiers

Mme Sylvie RANGER-ROGEZ

Professeur, Université de Limoges

*A mes parents,
A ma sœur,*

A Pierre

*A mon grand-père
A mon cousin*

J'exprime toute ma gratitude à Monsieur le Professeur François Denis pour m'avoir accueilli dans l'équipe EA 3175 "Biologie Cellulaire et Moléculaire des Microorganismes" et vous remercie de refermer cette boucle en présidant ce jury de thèse.

Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements à Madame le Professeur Sylvie Ranger-Rogez pour m'avoir dirigé tout au long de ces années et m'avoir fait découvrir son cher HHV-6. Je te remercie de m'avoir fait confiance il y a de cela 5 ans, de m'avoir conseillé et donné de ton temps, enfin merci pour ta présence lors des moments difficiles.

Je souhaite remercier tout particulièrement Madame le Professeur Berthe-Marie Imbert-Marcille et Monsieur le Professeur Vincent Maréchal d'avoir accepté la lourde tâche de rapporter ce travail de thèse. Je les remercie pour le temps consacré à la lecture de mon mémoire et pour leurs conseils dans l'amélioration du manuscrit.

Je remercie Messieurs les Professeurs Emmanuel Drouet et Gérard Agius d'examiner mon travail et de leur participation à ce jury de thèse.

J'adresse également tous mes remerciements à l'ensemble du personnel du laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène du CHU Dupuytren de Limoges. Je remercie tout spécialement l'équipe de Virologie pour son accueil et sa collaboration durant toutes ces années. Je ne me lancerai pas dans une énumération de prénoms de peur d'en oublier un, juste un mot: merci pour tous ces moments passés ensemble. J'adresse également mes remerciements à Carole et à Delphine pour leur cohabitation durant 4 ans et leur aide.

A présent, je tiens à remercier l'équipe du Laboratoire de Microbiologie Parasitologie de la Faculté de Pharmacie de Limoges. Un grand merci à Virginie Bellet, Sylvie Delebassée, Roseline Mouzet, Jeanne Cook-Moreau et Mr Dreyfuss pour votre chaleureux accueil et cette année passée ensemble.

A l'heure où ma thèse s'achève, je n'oublie pas mes collègues de galères passées et actuelles, merci à Aurélie, Gaël et Armelle pour leur amitié et leur aide, patience votre tour vient. Je remercie également Sophie pour avoir initié ma formation.

Je tiens à remercier toutes les personnes, amis et collègues, qui ont collaboré à mes travaux et qui m'ont permis de les mener à bien.

A tous ces remerciements, j'associe ma nouvelle famille, merci à Jacques et Nicole Aubreton, Anne et David pour leur sympathie et leur écoute...

Je ne pourrais terminer ces quelques lignes sans remercier ceux sans qui rien de tout cela n'aurait été possible, merci à mes parents pour leur soutien dans les bons comme dans les mauvais moments..., merci à ma sœur pour ses petits messages d'encouragements et toutes ses attentions...

Enfin un immense merci à un des êtres les plus chers à mon cœur, merci Pierre pour ta présence à mes côtés, pour ton soutien et ton réconfort..., pour les nuits blanches à rédiger mon manuscrit et à résoudre mes problèmes informatiques... merci d'être là.

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS	12
LISTE DES FIGURES	15
LISTE DES TABLEAUX	16
INTRODUCTION GENERALE.....	17
ENVIRONNEMENT BIBLIOGRAPHIQUE.....	21
Partie 1 : L'herpèsvirus humain de type 6 (HHV-6).....	22
1. Caractéristiques du virus	24
1.1. Virion	24
1.2. Génome	25
1.3. Cycle réplcatif	28
1.4. Régulation de l'expression des gènes.....	32
2. Tropisme cellulaire	33
3. Effets sur la cellule.....	34
4. Epidémiologie, Transmission.....	35
5. Manifestations cliniques	36
5.1. Primo-infection.....	36
5.2. Pathologies associées à la latence et/ou la réactivation d'HHV-6	37
5.2.1. HHV-6 et maladies du système nerveux central	37

5.2.2.	HHV-6 et oncogenèse	37
5.2.3.	HHV-6 et SIDA.....	38
5.2.4.	HHV-6 et greffes	38
6.	Latence	39
6.1.	Le gène U94	39
6.2.	Transcrits associés à la latence	40
6.3.	Intégration chromosomique.....	40
7.	Diagnostic des infections à HHV-6.....	42
7.1.	Diagnostic direct	42
7.1.1.	Isolement du virus par culture	42
7.1.2.	Détection d'antigènes	43
7.1.3.	Détection d'acides nucléiques	43
7.2.	Diagnostic indirect ou sérologie.....	45
8.	Traitements anti-HHV-6.....	46
8.1.	Analogues nucléosidiques	46
8.2.	Analogue nucléotidique.....	47
8.3.	Analogue de pyrophosphate	50
8.4.	Résistances développées par HHV-6	50
Partie 2 : Réactivation d'HHV-6 chez les sujets immunodéprimés après transplantation		51
1.	Les différentes greffes.....	52
1.1.	Greffes de moelle osseuse	52
1.2.	Transplantation rénale	54

1.3. Transplantation hépatique	54
1.4. Transplantation cardiaque	55
2. Traitements immunosuppresseurs.....	56
2.1. Rejets de greffe.....	56
2.2. Traitements immunosuppresseurs	57
2.2.1. Corticoïdes	57
2.2.2. Inhibiteurs de l'interleukine 2	57
2.2.2.1. Inhibiteurs de la sécrétion d'IL-2	58
2.2.2.2. Antagonistes du récepteur de l'IL-2.....	59
2.2.2.3. Inhibiteur de la transduction du signal de l'IL-2.....	59
2.2.3. Les inhibiteurs de la synthèse d'ADN et d'ARN	59
2.2.3.1. Analogue purique	59
2.2.3.2. Inhibiteurs de l'inosine monophosphate déhydrogénase (IMPDH).....	59
2.2.4. Les anticorps	61
2.2.4.1. Immunoglobuline anti-CD3	61
2.2.4.2. Immunoglobulines anti-lymphocytes.....	62
3. Pathologies associées à la réactivation d'HHV-6 chez les transplantés.62	
3.1. Receveurs de moelle osseuse (BMT).....	62
3.2. Receveurs d'organes solides (SOT)	65

TRAVAIL EXPERIMENTAL.....67

Partie 1 : Mise au point d'outil moléculaire permettant la détection d'une infection active à HHV-6 68

1. Développement d'une technique de quantification des virus HHV-6 et HCMV par PCR multiplex en temps réel..... 70

1.1. Le cytomegalovirus humain	70
1.1.1. Généralités.....	70
1.1.2. Epidémiologie, modes de transmission.....	71
1.1.3. Pathogenèse	71
1.1.4. Infection à HCMV après transplantation.....	72
1.2. Recherche d'une infection active à HHV-6 et à HCMV	72
1.3. Article n°1	73

2. Développement d'une technique de RT-nested PCR couplée à une hybridation en plaque pour la détection de transcrits d'HHV-687

2.1. La RT-PCR.....	87
2.2. Détection des produits amplifiés	89
2.3. La RT-nested PCR HHV-6 U79/80	89
2.4. Article n°2	92

Partie 2 : Rôle du facteur de transcription NF-κB dans la réplication d'HHV-6..... 121

1. Les facteurs de transcription NF-κB..... 122

2. Arguments en faveur du rôle de NF-κB dans la stimulation des gènes IE	
.....	126
3. Article n°3.....	127
CONCLUSION GENERALE.....	160
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	164
ANNEXE.....	198

ABBREVIATIONS

°C : degré Celsius
AAV-2 : Adeno-associated virus de type 2
ACV : acyclovir
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ARNr : ARN ribosomiaux
ARNt : ARN de transfert
BET : bromure d'éthidium
BMT : transplantation de moelle osseuse
Ca²⁺ : ion calcium
CBMC : cellules mononucléées de sang de cordon, *cord blood mononuclear cells*
CBSCT : greffés de cellules souches de sang de cordon, *cord blood stem cell transplant*
CDK : *cycline dependent kinases*
CDV : cidofovir
CEX : cycloheximide
CyPG : prostaglandines cyclopentenones
DD : domaine de dimérisation
DHR : domaine d'homologie à Rel
Dig : digoxigénine
DLA : domaine de liaison à l'ADN
DO : densité optique
DR : répétition directe
DT : domaine de transactivation
E : précoce, *early*
EBV : virus d'Epstein-Barr
ECP : effet cytopathogène
ELISA : *enzyme linked immunosorbent assay*
EMSA : gel retard, *electrophoretic mobility shift assay*
ES : exanthème subit
FKBP : *FK binding protein*
FRAP : *FKBP-rapamycine associated protein*
FRET : *fluorescent resonance energy transfert*
Gc : glucocorticoïde
GCS : syndrome de Gianotti-Crosti
GCV : ganciclovir
gH, gL, gQ, gB : glycoprotéines H, L, Q, B
GR : récepteur de glucocorticoïde
GVHD, GVH : maladie du greffon contre l'hôte, *Graft Versus Host Disease*
h : heure
H6LTs : transcrits associés à la latence d'HHV-6
HBLV : *human B-lymphotropic virus*
HCMV : cytomégalovirus humain
HD : maladie de Hodgkin

HHV-6 : herpèsvirus humain de type 6
 HHV-7 : herpèsvirus humain de type 7
 HHV-8 : herpèsvirus humain de type 8
 HLA : *Human Leukocyte Antigens*
 HSV-1 : Virus de l'herpès simplex de type 1
 HSV-2 : Virus de l'herpès simplex de type 2
 IκB : inhibiteur de NFκB
 IC₅₀ : concentration inhibitrice 50%
 ICTV : *International Comitee on Taxonomy of Viruses*
 IE : très précoce, *immediate early*
 IFA : *immunofluorescence assay*
 IFN-γ : interféron-γ
 Ig : immunoglobuline
 IKK: kinase IκB
 IL : interleukine
 IMP : inosine monophosphate
 IMPHD : inosine monophosphate déshydrogénase
 IP3 : inositol triphosphates
 J : jour
 kb : kilobases
 kpb : kilopaires de bases
 L : tardif, *late*
 LA : lamelle annulaire
 LAT : transcrits associés à la latence d'HSV
 LCR : liquide céphalo-rachidien
 LSS : site d'initiation de la transcription de l'infection latente
 MCMV : cytomegalovirus murin
 min : minute
 MIP: *Macrophage inflammatory protein*
 Mo/Mφ : monocytes / macrophages
 NDP : nucléoside diphosphate
 NF-κB : facteur nucléaire kappa B, *Nuclear factor kappa B*
 NF-AT : facteur nucléaire des cellules T activées, *Nuclear Factor of Activated T Cells*
 NHL : lymphome non hodgkinien
 NIK : *NF-κB inducing kinase*
 NK : *natural killer*
 NTP : nucléotide triphosphates
 ORF : cadres ouverts de lecture, *Open reading frame*
 Ori-Lyt : origine de réplication virale lytique
 p.i. : post infection
 PAA : phosphonoacéate
 pb : paire de bases
 PBL : leucocyte du sang périphérique
 PBMC : cellules mononucléées de sang périphérique
 PCR : réaction de polymérisation en chaîne, *polymerase chain reaction*
 PFA : Foscarnet
 PHA : phytohémagglutinine
 PMNL : *polymorphonuclear leukocytes*
 PNMP : pyrimidine nucléoside monophosphate
 POD : peroxydase

ppi : pyrophosphates inorganiques
PSS : site d'initiation de la transcription de l'infection productive
R1, 2, 3 : répétition/réitération interne 1, 2, 3
RAFT1 : *rapamycine FKBP target*
RANTES : *Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted*
RT : transcription inverse, rétrotranscription
SCT : transplantation de cellules souches
SEP : scléroses en plaques
SIDA : syndrome de l'immunodéficience acquise
SLN : séquence de localisation nucléaire
SNC : système nerveux central
SOT : transplantation d'organe solide
TCR : récepteur du lymphocyte T
TNF : facteur nécrosant les tumeurs, *Tumor necrosis factor*
TPA : tetradecanoyl phorbol acetate
UL ; segment unique long
US : segment unique court
Val-ACV : valacyclovir
Val-GCV : valganciclovir
VIH : virus de l'immunodéficience humaine
VZV : virus de la varicelle et du zona
XMP : xanthosine monophosphate

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure du virion des herpèsvirus.....	24
Figure 2 : L'organisation génomique d'HHV-6.....	26
Figure 3 : Le cycle réplcatif d'HHV-6.....	29
Figure 4 : Le mécanisme du cercle roulant de la réplication d'HHV-6.....	31
Figure 5 : Organisation des transcrits associés à la latence d'HHV-6.....	41
Figure 6 : L'effet cytopathogène d'HHV-6.....	42
Figure 7 : Structures chimiques des composés anti-HHV-6.....	48
Figure 8 : Activation métabolique du ganciclovir (GCV) et du cidofovir (CDV) par les enzymes kinases cellulaires et la phosphotransférase virale pU69.....	49
Figure 9 : Le mécanisme d'action des glucocorticoïdes.....	58
Figure 10 : La régulation de la biosynthèse d'IL-2, site d'action de la ciclosporine et du tacrolimus.....	60
Figure 11 : Le mécanisme d'action de l'IL-2, inhibition par le daclizumab, le basiliximab et la rapamycine.....	61
Figure 12 : Résultats de la PCR quantitatives multiplex.....	84
Figure 13 : Les coffrets PCR-ELISA Dig-Detection et Dig-Labeling.....	90-91
Figure 14 : Structure des sous-unités NF- κ B.....	123
Figure 15 : La voie canonique de signalisation NF- κ B.....	124
Figure 16 : La voie non-canonique de NF- κ B.....	125
Figure 17 : Le locus IE-A d'HHV-6A souche U1102.....	126

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Caractéristiques des herpèsvirus humains.....	19
Tableau II : Les principaux gènes d'HHV-6.....	27
Tableau III : Différentes techniques de quantification d'HHV-6 utilisées sur les prélèvements biologiques.....	44
Tableau IV : Les différentes techniques de RT-PCR HHV-6.....	118

INTRODUCTION GENERALE

Les *Herpesviridae* ou herpèsvirus sont très nombreux et infectent presque toutes les espèces animales ; il en existe ainsi plus de 100. Ce sont des virus très conservés et leur inclusion dans cette famille est basée sur l'architecture du virion (Roizman et Pellett, 2001).

A l'heure actuelle, huit herpèsvirus humains ont été identifiés et regroupés en 3 sous-familles suivant leurs propriétés de croissance *in vitro*, leurs sites de latence *in vivo*, la taille de leurs génomes et leurs pourcentages de GC. Ainsi, les virus herpès simplex de types 1 et 2 (HSV-1 et HSV-2), de même que le virus de la varicelle et du zona (VZV) appartiennent à la sous-famille α , alors que le cytomégalovirus humain (HCMV), les herpèsvirus humains de types 6 et 7 (HHV-6 et HHV-7) sont des β -herpesvirinae. Le virus d'Epstein et Barr (EBV) et l'herpèsvirus humain de type 8 (HHV-8) sont quant à eux classés dans la sous-famille γ (Braun et al., 1997). Les principales caractéristiques des herpèsvirus humains sont regroupées dans le Tableau I.

Comme tous les *Herpesviridae*, l'herpèsvirus humain de type 6 a la capacité de rester dans un état latent tout au long de la vie de l'hôte infecté. Le virus est ainsi présent, mais ne se multiplie pas. Cette latence virale peut être entrecoupée d'épisodes de réactivation : il y a alors reprise du cycle de réplication et production de particules infectieuses. Si cette réactivation est classiquement asymptomatique chez les individus immunocompétents, elle peut s'accompagner de divers symptômes pouvant être graves, voire mortels chez le sujet immunodéprimé, particulièrement chez les receveurs de greffes.

La mise en évidence de la réactivation d'HHV-6 est donc importante pour mettre en place le traitement de ces pathologies, ou prévenir leur apparition.

Actuellement, les mécanismes par lesquels le virus établit une infection latente, ou à l'inverse ceux qui conduisent à sa réactivation, ne sont pas connus. Cependant, il a précédemment été suggéré que le rôle du facteur de transcription NF- κ B pourrait intervenir dans la réactivation d'HHV-6 (Takemoto et al., 2001).

L'objectif de ce travail de thèse était donc double : mettre au point des outils de détection de la réactivation d'HHV-6 et étudier le rôle du facteur de transcription NF- κ B dans la stimulation de la réplication d'HHV-6.

		Taille du génome (kpb)			% adultes infectés	Site de latence	Maladies associées
			% GC				
<i>α-herpesvirinae</i>	HSV-1	152	67	~70	Ganglions	Herpès labial	
	HSV-2	152	69	~30	nerveux	Herpès génital	
	VZV	126	46	>80	sensitifs	Varicelle, zona	
<i>β-herpesvirinae</i>	HCMV	229	57	55	Lymphocytes,	Syndrome mononucléosique, infection congénitale	
	HHV-6A	160	43	>95	épithéliums des glandes	Exanthème subit (B)	
	HHV-6B	162			salivaires, tissu endothélial,	? (A)	
	HHV-7	145	39	>85	monocytes/macrophages	Exanthème subit (?)	
<i>γ-herpesvirinae</i>	EBV	172	60	>95	Tissus lymphoïdes, épithélium pharyngé	Mononucléose infectieuse, lymphome de Burkitt, carcinome naso-pharyngé	
	HHV-8	140	54	2-30*	Tissu prostatique, cellules fusiformes	Sarcome de Kaposi, maladies prolifératives rares	

Tableau I : Caractéristiques des herpèsvirus humains

HSV-1 et -2 : herpès simplex virus de types 1 et 2, VZV : virus de la varicelle et du zona, HCMV : cytomégalovirus humain, EBV : virus d'Epstein Barr, HHV-6, -7 et -8 : herpèsvirus humains de types 6, 7 et 8. (* varie selon les régions)

Après une revue de la littérature concernant l'herpèsvirus humain de type 6 et sa réactivation chez les individus immunodéprimés après transplantation d'organe solide et de moelle osseuse, le travail de thèse sera présenté. Ce travail est divisé en deux parties.

- œ Dans un premier temps, les outils de détection de la réactivation d'HHV-6 mis au point au cours de ces travaux de thèse, une PCR quantitative en temps réel et une RT-PCR, seront développés.
- œ Puis dans un deuxième temps, l'étude du rôle du facteur de transcription NF- κ B sera détaillée.

ENVIRONNEMENT BIBLIOGRAPHIQUE

Partie 1 : L'herpèsvirus humain de type 6 (HHV-6)

L'herpèsvirus humain de type 6 (HHV-6) a pour la première fois été isolé en 1986 à partir du sang périphérique de six patients présentant des désordres lymphoprolifératifs, dont certains étaient atteints du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) (Salahuddin et al., 1986). Le virus a tout d'abord été appelé "HBLV" (human B-lymphotropic virus) car il a été isolé de cellules mononucléées du sang périphérique de patients avec des désordres lymphoprolifératifs des cellules B. Des isolats viraux supplémentaires, dérivés de patients, présentaient un tropisme pour les cellules T et le virus a été rebaptisé comme étant le sixième membre du groupe des herpèsvirus humain (Ablashi et al., 1993) en accord avec les règles ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). Par la suite il est apparu qu'HHV-6 n'est pas lymphotrope pour les cellules B, mais il est plutôt retrouvé dans les lymphocytes T (Lusso et al., 1988).

Il existe en fait deux types génétiquement distincts d'HHV-6 : HHV-6A et HHV-6B qui diffèrent par leurs propriétés de croissance *in vitro*, leurs épidémiologies, leurs réactivités avec des anticorps monoclonaux, leurs profils de restrictions enzymatiques, leurs séquences nucléotidiques. Chaque type est représenté par deux prototypes : les souches GS et U1102 pour HHV-6A et Z29 et HST pour HHV-6B (Ablashi et al., 1993).

HHV-6 est un β -herpèsvirus proche de l'herpèsvirus humain de type 7 (HHV-7). Ensemble, ils forment le genre Roseolovirus de la sous-famille des *β -herpesvirinae* (Black et Pellet, 1999) et à un degré moindre du prototype des *β -herpesvirinae*, le cytomégalovirus humain (HCMV). Les séquences nucléotidiques complètes d'HHV-6A et HHV-6B ont récemment été obtenues et bien qu'il y ait un fort degré d'homologie, des régions significatives de variation existent (Gompels et al., 1995 ; Dominguez et al., 1999 ; Isegawa et al., 1999).

L'herpèsvirus humain de type 6 est un pathogène humain d'importance clinique émergente (Hall, 1997 ; Levy, 1997). L'identification très récente d'un homologue de l'HHV-6 chez les chimpanzés pourrait être un bon modèle pour la compréhension des maladies associées à HHV-6 (Lacoste et al., 2005). Ce virus, baptisé PanHV6, présente de 94 à 96 % d'homologie de séquence nucléotidique et de 95 à 97 % d'homologie de séquence en acides aminés pour les gènes codant l'ADN polymérase (U38), le récepteur β -chimiokine (U12) et le transactivateur viral (U42).

1. Caractéristiques du virus

1.1. Virion

Comme tous les herpesvirus, le virion d'HHV-6 est composé de 4 éléments structuraux présentés sur la Figure 1 (Roizman et Pellet, 2001) :

- ∞ le core qui contient l'acide nucléique,
- ∞ la capside,
- ∞ le tégument
- ∞ et l'enveloppe.

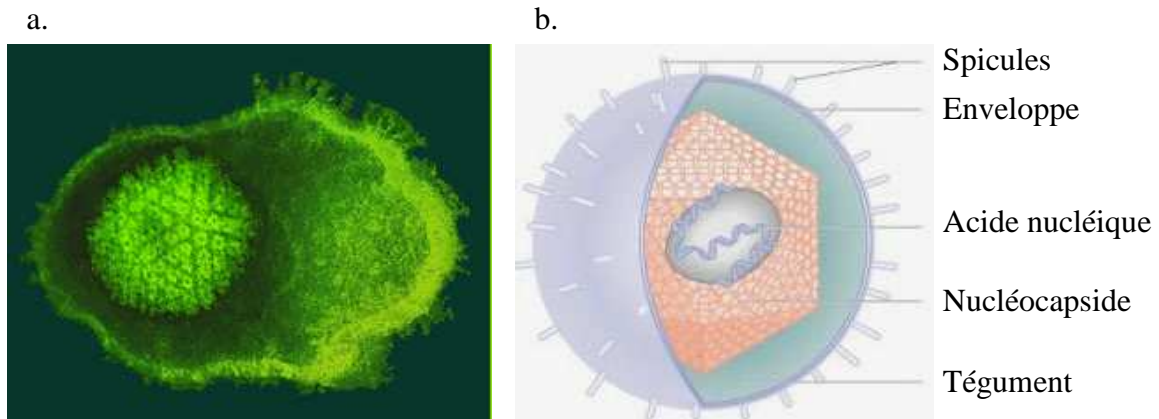


Figure 1 : Structure du virion des herpesvirus

a. Photographie en microscopie électronique

(<http://web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/herpes.html>)

b. Représentation schématique

(<http://www.medecinapreventiva.com.ve/ariculos/imagenes>)

Les virions enveloppés d'HHV-6 mesurent de 160 à 200 nm de diamètre et les nucléocapsides nues 90-110 nm. La capside d'HHV-6 présente une symétrie icosaédrique et contient 162 capsomères. Elle renferme le core qui a un diamètre d'environ 60 nm. Dans le cytoplasme, les capsides sont entourées par un tégument de 20 à 40 nm d'épaisseur. Le tégument correspond donc à l'espace compris entre la capside et l'enveloppe ; il présente une distribution asymétrique et est constitué d'une couche fibreuse de phosphoprotéines et d'enzymes nécessaires à l'initiation de la réplication. L'enveloppe virale d'HHV-6 dérive quant à elle des membranes cellulaires et est un double feuillet lipidique contenant de très nombreuses spicules de glycoprotéines virales relativement courtes (Pellet et Black, 1996).

1.2. Génome

Les génomes d'HHV-6A souche U1102, HHV-6B souches Z29 et HST ont entièrement été séquencés (Gompels et al., 1995 ; Dominguez et al., 1999 ; Isegawa et al., 1999) et sont composés d'une molécule d'ADN bicaténaire linéaire respectivement de 159321 pb, 162114 pb et 161573 pb. L'architecture génomique d'HHV-6 (comme celle d'HHV-7) est unique parmi les herpesvirus humains et ressemble à celle du virus du poisson chat (channel catfish virus). Elle inclut une région unique (U) de 143-144 kb bordée par des répétitions terminales directes (DR) de 8-9 kb (Figure 2).

Le rôle des DR reste mal connu, mais elles semblent impliquées dans la circularisation du génome au cours de la réplication. En effet, les DR comportent des séquences pac-1 et pac-2, signaux de clivage-empaquetage de l'ADN. De plus les DR contiennent des répétitions de l'hexanucléotide GGGTTA, séquences similaires aux télomères humains (Gompels et al., 1995). Il est possible que ces répétitions participent à la réplication du virus, à l'intégration du génome viral au sein de la cellule hôte, ainsi qu'au maintien de la latence d'HHV-6 (Gompels et al., 1995 ; Torelli et al., 1995 ; Daibata et al., 1999).

En plus des répétitions terminales, trois ensembles majeurs de répétitions existent. Ces répétitions sont localisées à l'extrémité droite du segment U et sont désignées R1, R2 et R3 (Gompels et al., 1995). R1 est composée de répétitions qui codent un domaine SR, R2 est une répétition simple du dinucléotide TG et R3 est une répétition de 110 pb contenant des sites Kpn en tandem.

La nomenclature générale pour le génome d'HHV-6 suit celle de Gompels et al. (1995). Les cadres ouverts de lecture (ORF) codant des répétitions directes sont précédés de DR et ceux qui sont dans la région unique sont appelés U1-U100 à partir de l'extrémité gauche de cette séquence (Figure 2), quelques gènes d'HHV-6 et leurs fonctions sont présentés dans le tableau II. Les gènes conservés au sein des herpesvirus sont organisés en sept blocs dont l'arrangement est spécifique de la sous-famille (Gompels et al., 1995). Un bloc additionnel est spécifique aux β -herpesvirus. Les gènes appartenant aux blocs de gènes conservés ont plus de 94 % d'identité en acides aminés entre HHV-6A et HHV-6B. Les gènes spécifiques au genre Roseolovirus des *β -herpesvirinae* (HHV-6 et HHV-7) sont U20-U24, U26, U85 et U100.

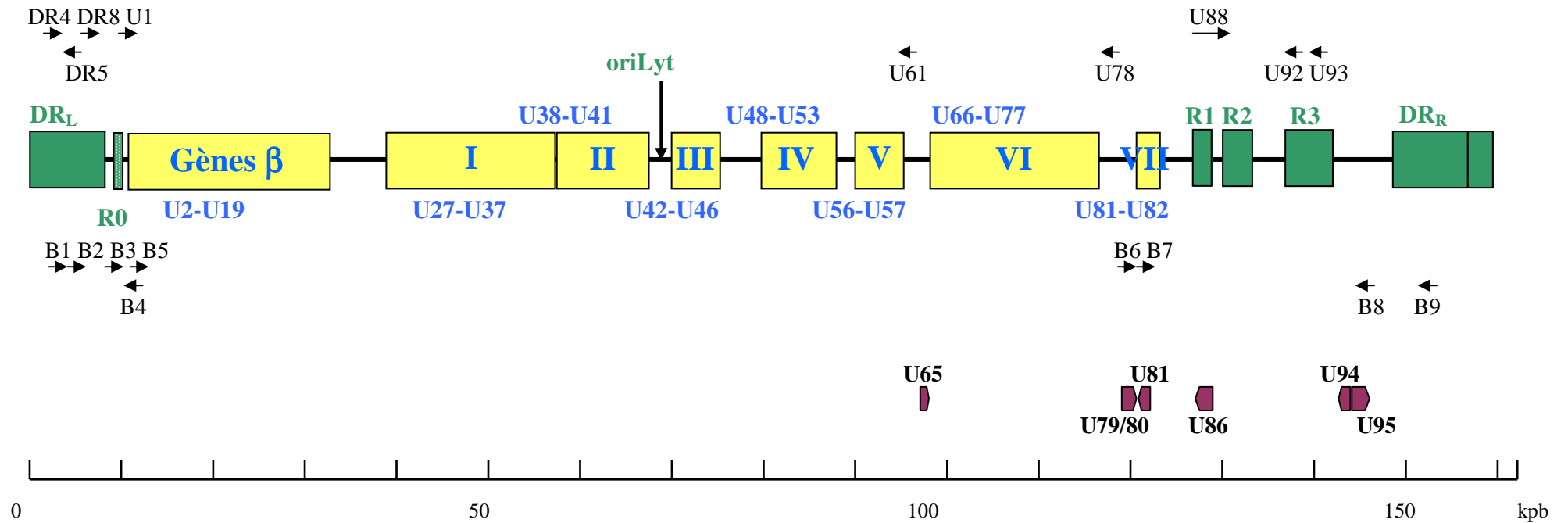


Figure 2 : L'organisation génomique d'HHV-6

DR_L et DR_R : Répétition directe gauche et droite R1, R2, R3 : Répétitions internes, gènes intervenant dans la stimulation de la transcription

Gènes β : Bloc des gènes uniques aux *β-herpesvirinae* Blocs I à VII : Blocs des gènes conservés communs aux *Herpesviridae*.

Les gènes uniques à HHV-6A (U1102) sont DR4, DR5, DR8, U1, U61, U78, U88, U92 et U93 ; ceux uniques à HHV-6B (Z29) sont appelés B1 à B9. La région R0 n'est retrouvée que chez HHV-6B (Z29).

Les gènes utilisés lors de ce travail de thèse (U65, U79/80, U81, U86, U94 et U95) sont également figurés.

Gène	Homologue HCMV	Orientation	Fonction
U3	UL24	-	Transactivateur
U11	UL32	-	pp100, protéine structurale antigénémique
U12	UL33	+	Récepteur de chimiokines
U16/17	UL36	-	Transactivateur, locus IE-B
U27	UL44	-	pp41, facteur de processivité de l'ADN pol
U38	UL54	-	ADN polymérase
U39	UL55	-	Glycoprotéine gB
U41	UL57	-	Protéine majeure de liaison à l'ADN
U43-74-77	UL70-102-105	-/+/+	Complex hélicase/primase
U48	UL75	-	Glycoprotéine gH
U51	UL78	+	Récepteur de chimiokines
U65	UL94	+	
U69	UL97	+	Kinase du ganciclovir, phosphotransférase
U73	/	+	Protéine de liaison à l'origine
U79/80	UL112/113	+	Protéien intervenant dans la réplication
U81	UL114	-	Uracil-ADN glycosylase
U82	UL115	-	Glycoprotéine gL
U83	/	+	Chimiokine virale
U86/87	UL122	-	Transactivateur, protéine IE2, locus IE-A
U89	UL123	-	Transactivateur, protéine IE1, locus IE-A
U94	/	-	
U95	/	+	Homologue protéine IE2 du MCMV
U100	/	-	Glycoprotéine gQ, complex gp82-105

Tableau II : Les principaux gènes d'HHV-6 (D'après Gompels et al., 1995 ; Dominguez et al., 1999 ; Isegawa et al., 1999 ; Dockrell, 2003).

Les comparaisons des génomes d'HHV-6A et HHV-6B confirment que ces deux génomes sont colinéaires avec une identité de séquence nucléotidique globale de 90 %. Les régions présentant des variations significatives sont les DR et un segment de 24 kb s'étendant des cadres ouverts de lecture (ORF) U86 à U100 où 72 % d'identité de séquence nucléotidique sont retrouvés. Une exception est le gène U94, un gène homologue du gène *rep* de l'AAV-2 (adeno-associated virus type 2), identique à 97,6 % entre les deux types d'HHV-6. La région comprenant les ORF U2 à U85 est plus conservée avec 66 des 89 ORF de cette région présentant plus de 92 % d'identité en acides aminés (Dominguez et al., 1999). La divergence dans les gènes particuliers entre HHV-6A et HHV-6B tout au long du génome, mais spécialement à l'extrémité droite du segment U, est probablement importante pour définir les différences biologiques entre les deux types.

1.3. Cycle répliatif

Le cycle de multiplication d'HHV-6 (Figure 3) se déroule en plusieurs étapes.

∞ Liaison aux récepteurs, fusion enveloppe virale – membrane cytoplasmique :

HHV-6 entre dans la cellule par fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire, après reconnaissance d'un récepteur spécifique : le CD46 (Santoro et al., 1999). Ce récepteur CD46 est présent à la surface d'un grand nombre de types cellulaires. Or HHV-6 n'infecte pas tous les types cellulaires présentant CD46. Il existe donc probablement un co-récepteur. Pour l'HHV-6A, le complexe formé par les glycoprotéines virales gH-gL-gQ (codées respectivement par les gènes U48, U82 et U100) sert de ligand viral pour le CD46 humain (Mori et al., 2003). La glycoprotéine gB (codée par U39) est, quant à elle, impliquée dans le processus de fusion (Takeda et al., 1996).

∞ Décapsidation :

Après liaison aux récepteurs et fusion de l'enveloppe virale à la membrane cellulaire, la nucléocapside est transportée à travers le cytoplasme, principalement par association avec le réseau de microtubules, vers les pores nucléaires, où seul le génome viral est libéré dans le nucléoplasme.

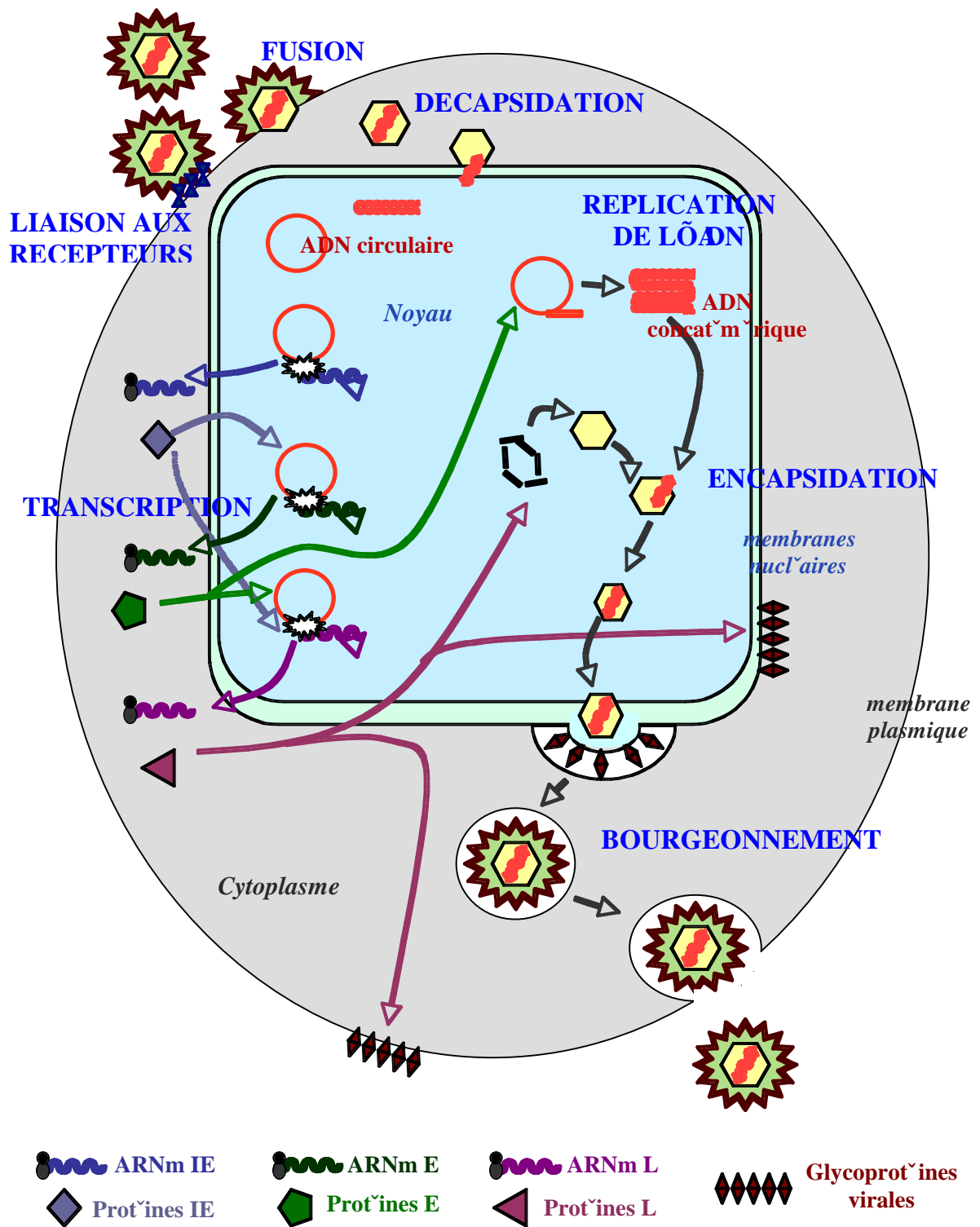


Figure 3 : Le cycle répliatif d'HHV-6
 (D'après Pellet et Dominguez, 2001 ; De Bolle et al., 2005).

œ Transcription, réplication de l'ADN :

Le virus utilise ensuite les machineries de transcription et de traduction cellulaires pour produire trois classes de protéines virales : IE ("immediate early", très précoces) qui sont pour la plupart des transactivateurs, E ("early", précoces) qui sont principalement impliquées dans le métabolisme et la réplication de l'ADN et L ("late", tardives) qui sont des composants structuraux du virion.

La réplication de l'ADN requiert sept facteurs codés par le virus. Après circularisation du génome, la protéine de liaison à l'origine (codée par U73) se lie à l'origine de réplication lytique (ori-lyt) et dénature une portion du génome viral circulaire. Cette ouverture est maintenue par le complexe hélicase/primase (codé par U43, U74 et U77) qui fournit également les amorces ARN pour la synthèse décalée du brin d'ADN. La protéine majeure se liant à l'ADN (codée par U41) stabilise l'ADN simple brin dans la boucle de réplication. Puis la synthèse du second brin d'ADN est catalysée par l'ADN polymérase (codée par U38) qui est guidée par le facteur de processivité (codé par U27). Alors que le brin néoformé grandit, la structure circulaire de réplication est coupée pour former un intermédiaire de cercle roulant (Figure 4).

œ Encapsidation :

Les longs brins concatémériques d'ADN néoformés sont clivés par interaction de protéines de clivage et d'empaquetage avec les signaux spécifiques d'empaquetage "pac" aux extrémités des génomes viraux. Puis les unités de génome sont encapsidées.

œ Bourgeoisement :

Les nucléocapsides matures bourgeonnent hors du noyau dans le cytoplasme, vers le tégusome où elles acquièrent les protéines du tégument. Les particules virales sont alors prises en charge par des vésicules de transport et déplacées à la surface de la cellule. Les virions matures sont enfin libérées dans l'espace extracellulaire par exocytose ou par lyse des cellules. Le temps total de l'infection à la libération de nouveaux virions, soit un cycle de réplication, dure environ 72 h.

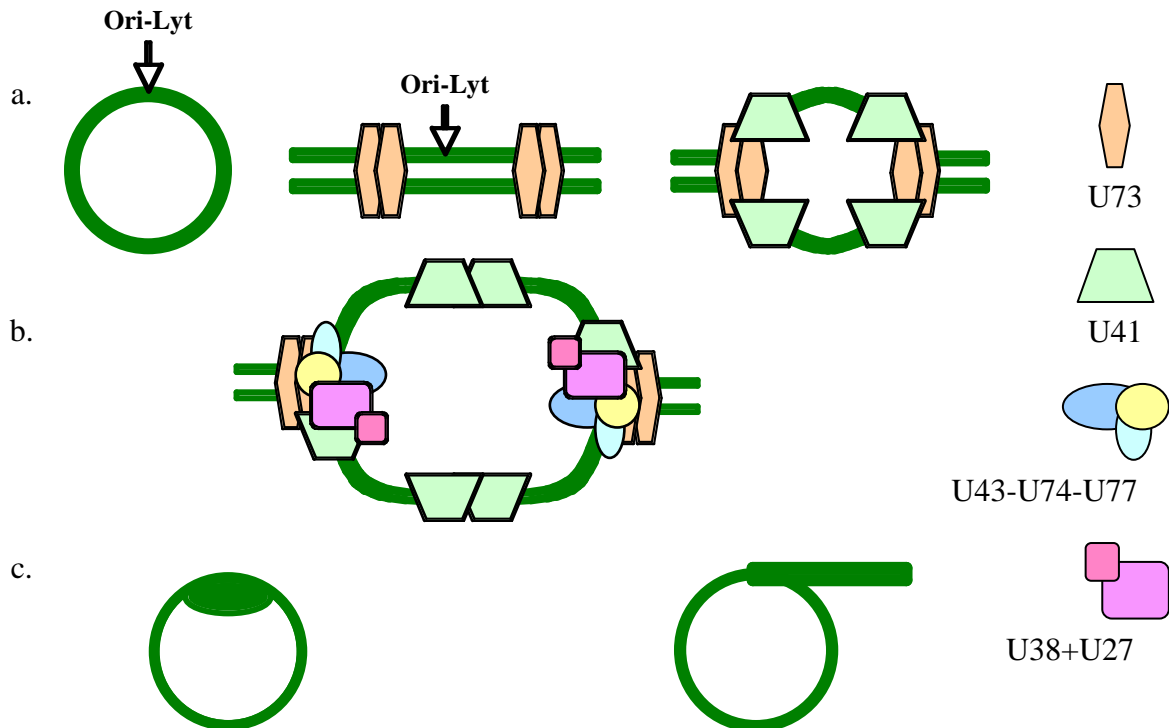


Figure 4 : Le mécanisme du cercle roulant de la réplication de l'ADN d'HHV-6

a. La protéine de liaison à l'origine (U73) se lie à ori-Lyt et débute le désenroulement de l'ADN qui est stabilisé par la protéine majeure se liant à l'ADN simple brin (U41). b. Le complexe hélicase/primase (U43-U74-U77) est recruté et la synthèse de l'ADN est réalisée par l'ADN polymérase (U38) liée au facteur de processivité (U27). c. Après passage par un intermédiaire de réplication, le cercle roulant est formé.

In vitro, lorsque la lignée cellulaire humaine de lymphoblastes T HSB-2 est infectée par l'HHV-6 (type A), le virus est lié à plus de 50 % des cellules en culture dans les 15 minutes, atteignant 100 % après environ 30 min. Puis le virion est internalisé dans les 6 h. La réplication de l'ADN est initiée après environ 12 h, et l'ADN s'accumule dans le noyau entre J1 et J2. Les premières capsides non enveloppées sont trouvées dans le noyau de la cellule à J3. Par la suite, des virus enveloppés naissent dans l'espace péri-nucléaire ; des virus non enveloppés apparaissent également dans le cytosol et à J6 le virus bourgeonne dans l'appareil de Golgi pour y être enveloppé. Entre J6 et J10, le virus est retrouvé en grande quantité dans l'espace extracellulaire et dans le surnageant de culture. Occasionnellement, des surnageants deviennent infectieux pour des cellules HSB-2 saines dès 4 jours après l'infection des cultures originales par HHV-6. La propagation de l'infection, cependant, dure de 6 à 8 jours, et le

rendement viral après 8 jours de culture est d'environ 10^5 particules infectieuses par mL de surnageant non concentré (Krueger et Ablashi, 2003).

1.4. Régulation de l'expression des gènes

La transcription et l'expression des gènes d'HHV-6, comme celles des autres herpèsvirus, sont étroitement régulées et coordonnées au cours du cycle infectieux. Les gènes sont exprimés en cascade suivant une cinétique de trois classes (Braun et al., 1997), ainsi, sont retrouvés :

œ Les gènes IE ou gènes α

Ces gènes sont transcrits sans qu'il y ait synthèse *de novo* de protéine. Ils sont détectés dans les 3 heures post-infection (p.i.) et codent les protéines IE, qui sont essentiellement des transactivateurs et qui contrôlent l'expression des autres gènes.

œ Les gènes E ou gènes β

Ces gènes codent les enzymes intervenant dans le métabolisme et la réplication de l'ADN. Leur expression est dépendante de celle des gènes IE. Ils peuvent être divisés en 2 sous-classes : E_1 et E_2 en fonction de leur expression. Ils apparaissent entre 3 et 8 h p.i. Ils activent la synthèse de la dernière classe de gènes.

œ Les gènes L ou gènes γ

Les produits de ces gènes sont habituellement des constituants du virion et sont impliqués dans son assemblage. Ils peuvent eux aussi être répartis en deux sous-classes selon leur indépendance (L_1) ou dépendance (L_2) par rapport à la synthèse de l'ADN viral pour leur expression. Ils sont détectés après 8 h d'infection et jusqu'à 72 h p.i.

La répartition des gènes d'HHV-6 dans les classes IE, E et L a été étudiée par Mirandola et al. (1998). Les auteurs ont utilisé la cycloheximide (CEX, inhibiteur de la synthèse protéique) et le phosphonoacétate (PAA, inhibiteur de la synthèse d'ADN). Ils ont pu mettre en évidence des profils d'expression différents entre les types A et B d'HHV-6 pour les gènes U16-U17 (IE pour HHV-6B et E pour HHV-6A) et U91 (ARN antisens non épissé IE chez HHV-6A, E chez HHV-6B et ARN antisens épissé E chez HHV-6A et IE chez HHV-6B). Les transcrits des gènes IE étaient détectés même en présence de CEX, l'expression des gènes E était

inhibés par la CEX, mais pas par le PAA, alors que les produits des gènes L étaient inhibés par le PAA.

2. Tropisme cellulaire

L'HHV-6 est principalement considéré comme un virus ayant un tropisme pour les cellules T, bien qu'en réalité il ait la capacité d'infecter une grande variété de types cellulaires. Ainsi *in vivo*, le virus est retrouvé dans les lymphocytes T CD4+ et CD8+, les cellules *Natural Killer*. L'HHV-6 peut infecter les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques, les fibroblastes, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales des vaisseaux et les cellules précurseurs de la moelle osseuse (Asada et al., 1999 ; Robert et al., 1996 ; Simmons et al., 1992 ; Luppi et al., 1999). Les deux types d'HHV-6 infectent les astrocytes fœtaux primaires humains *in vitro* (He et al., 1996), mais HHV-6A semble avoir un neurotropisme plus important *in vivo* (Hall et al., 1998). Les cellules T CD4+ activées semblent la cible préférentielle pour une réplication complète *in vivo* (Takahashi et al., 1989).

In vitro, les cellules mononucléées humaines du cordon ombilical permettent la croissance des deux types à un niveau plus élevé que les lignées cellulaires établies. HHV-6 peut être différencié en types par sa capacité à infecter des lignées particulières continues de cellules T (Abalshi et al., 1993) : HHV-6A croît plus facilement dans la lignée cellulaire T HSB-2, et HHV-6B pousse plutôt sur la lignée cellulaire T Molt-3. Ainsi, la souche GS est cultivée sur la lignée HSB-2 alors que la culture de la souche U1102 se fait sur la lignée JJHAN. La souche Z29 est quant à elle cultivée sur la lignée Molt-3 et la souche HST sur les cellules MT-4 (Braun et al., 1997 ; Clark, 2000 ; Campadelli-Fiume et al., 1999). Les lignées cellulaires d'origines neuronales ou fibroblastiques ont des niveaux variables de permissivité (De Bolle et al., 2005).

Le CD46 est un récepteur cellulaire pour HHV-6A et HHV-6B (Santoro et al., 1999). Cette glycoprotéine est exprimée à la surface de toutes les cellules nucléées et intervient dans la régulation du complément. Le fait qu'HHV-6 utilise le CD46 ubiquiste comme récepteur de surface est en accord avec son apparent large tropisme cellulaire. Mais un co-récepteur doit probablement exister puisque certaines lignées cellulaires T exprimant CD46 ne sont pas permissives à la fusion de l'HHV-6 et à son entrée (Santoro et al., 1999).

3. Effets sur la cellule

L'infection par HHV-6 a de profonds effets sur la cellule hôte : elle induit la marginalisation de la chromatine (Nii et al., 1990), l'arrêt de la synthèse de l'ADN cellulaire (Di Luca et al., 1990), et une stimulation de la synthèse de protéines cellulaires. Des études *in vitro* ont montré que l'HHV-6 a des propriétés immunomodulatrices. Le virus de type A inhibe l'expression de CD3 dans les cellules T infectées, ce qui peut altérer la signalisation transmembranaire médiée par l'immunité (Lusso et al., 1991). L'infection des PBMC semble également supprimer les fonctions des cellules T, entraînant une diminution de la synthèse d'IL-2 et de la prolifération cellulaire (Flamand et al., 1995). L'HHV-6 stimule l'expression de certaines cytokines. Ainsi, *in vitro* l'infection des PBMC induit l'expression des cytokines pro-inflammatoires : HHV-6A (mais pas HHV-6B) stimule la synthèse d'IFN- γ et d'IL-1 β , HHV-6A et HHV-6B stimulent l'expression de TNF- α (Flamand et al., 1991 ; Santoro et al., 1999). L'expression d'IL-10 et d'IL-12 est stimulée dans les monocytes/macrophages (Li et al., 1997). L'infection des PBMC par HHV-6A conduit à une augmentation de la cytotoxicité des cellules NK, ce qui peut passer en partie par une expression accrue d'IL-15 (Flamand et al., 1996). Le virus a également été rapporté comme inducteur de l'apoptose dans les cellules T CD4+ (Dockrell, 2003). De plus, l'HHV-6 et plus particulièrement le type A, a la capacité de moduler la fluidité membranaire de la cellule et d'induire l'expression de CD4 et d'autres molécules de la membrane cellulaire dans les cellules infectées (Clark , 2000 ; Campadelli-Fiume et al., 1999 ; Torrisi et al., 1999).

La protéine codée par le gène U83 spécifique d'HHV-6, après avoir été identifiée comme une chimiokine fonctionnelle, est maintenant définie comme un agoniste de CCR2 hautement sélectif et efficace (Luttichau et al., 2003). La protéine U83 attire les cellules exprimant CCR2 où le virus peut établir une infection productive ou latente, telles que les monocytes/macrophages, facilitant ainsi la dissémination du virus. Les gènes U12 et U51 codent, quant à eux, des récepteurs couplés aux protéines G similaires aux récepteurs des chimiokines. La protéine U12 est un récepteur fonctionnel activé par les β -chimiokines RANTES, MIP-1 α et -1 β et MCP-1, mais pas par l' α -chimiokine IL-8 (Isegawa et al., 1998 ; Kondo et al., 2002a). La protéine U51 se lie spécifiquement à RANTES (Milne et al., 2000).

4. Epidémiologie, Transmission

La séropositivité dans la population adulte est estimée être supérieure à 95 % pour l'un et/ou l'autre des types dans les pays développés, les titres d'anticorps montrant une diminution avec l'âge avancé (Baillargeon et al., 2000). HHV-6 est répandu dans le monde entier, avec des différences géographiques dans la prévalence d'HHV-6 variant de 70 à 100 % (Bhattarakosol et al., 2001 ; Ranger et al., 1991 ; Wu et al., 1997). Il n'est actuellement pas possible de savoir si la répartition est différente pour HHV-6A et HHV-6B car il n'existe pas de test sérologique discriminant entre ces deux types. HHV-6B est généralement acquis entre 6 et 15 mois (Enders et al., 1990 ; Okuno et al., 1989), et la période d'incubation est d'une à deux semaines. La primo-infection à HHV-6 représente 20 % de tous les cas de maladies fébriles chez les enfants entre 6 et 12 mois (Hall et al., 1994). Cette symptomatologie est presque exclusivement causée par HHV-6B, et non HHV-6A (Dewhurst et al., 1993 JCM). Il n'est actuellement pas connu à quel âge la séroconversion au type A, qui est fréquemment retrouvé chez les adultes, a lieu, mais il est possible qu'elle ait lieu après l'acquisition du type B et sans manifestations cliniques. Il est intéressant de noter que plusieurs études rapportent l'isolement de plus d'une souche d'HHV-6 (des deux types) aussi bien chez des adultes que des enfants (Cone et al., 1996 ; Yoshikawa et al., 1992 JMD), indiquant que la réinfection par HHV-6 peut avoir lieu.

La détection fréquente de l'ADN d'HHV-6 dans la salive et les glandes salivaires (Collot et al., 2002 ; Di Luca et al., 1995 ; Zhao et al., 1997) suggère que les glandes salivaires sont un site potentiel pour la persistance d'HHV-6. La salive est le principal véhicule pour la transmission du virus, soit de la mère à l'enfant, soit entre enfants (Mukai et al., 1994 ; van Loon et al., 1995). Tous les isolats d'HHV-6 à partir de la salive sont de type B. La détection de l'ADN d'HHV-6 dans les échantillons de sang de cordon de nouveaux-nés sains en l'absence d'immunoglobulines M sériques (IgM) et dans des fœtus après une fausse couche suggère la possibilité d'une transmission intra-utérine (Adams et al., 1998 ; Aubin et al., 1992). Bien que des séquences d'ADN d'HHV-6B soient trouvées dans le tractus génital de 20 % des femmes enceintes, une transmission périnatale semble peu probable (Maeda et al., 1997). La dissémination oro-fécale, une voie commune de transmission chez les jeunes enfants, n'a pas été documentée pour l'HHV-6, bien que les selles aient été trouvées positives pour l'ADN d'HHV-6 (Suga et al., 1998). Ainsi, la principale voie de transmission d'HHV-6 (au moins pour le type B) est par la salive.

5. Manifestations cliniques

5.1. Primo-infection

La primo-infection à HHV-6 type B cause une maladie fébrile aiguë, l'exanthème subit (ES ou roséole infantile ou 6^e maladie), qui affecte le plus souvent les enfants âgés de 6 mois à 1 an (Asano et al., 1994). La fièvre est élevée (≥ 40 °C) et dure environ 3 jours (parfois jusqu'à 7 jours), après quoi elle chute brutalement. Certains patients développent alors un rash cutané bénin, principalement sur le tronc, le cou et le visage. L'association entre l'ES et la primo-infection à HHV-6 de type B a été découverte par Yamanishi et al. (1988) par séroconversion et isolement du virus. Depuis, l'HHV-6B a été confirmé être l'agent responsable de l'ES chez les jeunes enfants (Dewhurst et al., 1993 ; Hall et al., 1994 ; Portolani et al., 1993 ; Pruksananonda et al., 1992).

Les complications les plus courantes sont des crises fébriles, des convulsions, des malaises, des otites, des symptômes gastro-intestinaux ou du tractus respiratoire, des méningites (Asano et al., 1994 ; Barone et al., 1995 ; Hall et al., 1994 ; Kondo et al., 1993 ; Ward et Gray, 1994 ; Torre et al., 2005). Des complications plus sévères du système nerveux central (SNC), telles que des méningo-encéphalites et des encéphalopathies, existent mais sont rares (Kato et al., 2003 ; Yoshikawa et Asano, 2000 ; Birnbaum et al., 2005). L'ADN d'HHV-6 a été détecté dans les liquides céphalo-rachidiens (LCR) d'enfants avec des convulsions durant la primo-infection ou la réactivation. La plupart des infections à HHV-6 sont non symptomatiques ou caractérisées par une forte fièvre, ont un déroulement bénin et guérissent spontanément. Néanmoins, il a été rapporté des cas d'hépatites fulminantes, des dysfonctionnements hépatiques, des thrombocytopénies et des syndromes d'hémophagocytose (De Bolle et al., 2005).

Etant donnée la forte séoprévalence dans la population, la primo-infection chez les adultes est très rare et les manifestations cliniques sont mal documentées. Elles se manifestent généralement par un syndrome mononucléosique (Akashi et al., 1993 ; Goedhard et al., 1995 ; Sumiyoshi et al., 1995) et dans quelques cas, une issue plus grave, telle une hépatite fulminante (Sobue et al., 1991), a été rapportée chez des individus immunocompétents. Chez les patients immunodéprimés, les conséquences d'une primo-infection peuvent être fatales (Lau et al., 1998 ; Rossi et al., 2001) : elles seront évoquées ultérieurement.

5.2. Pathologies associées à la latence et/ou la réactivation d'HHV-6

5.2.1. HHV-6 et maladies du système nerveux central

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie démyélinisante dans laquelle l'HHV-6 est supposé jouer un rôle. En effet HHV-6 a été trouvé *in situ* dans les oligodendrocytes des plaques de démyélinisation (Challoner et al., 1995). Par la suite, des niveaux élevés de récepteur CD46 soluble dans le sérum et le liquide céphalo-rachidien ont été corrélés à la présence d'ADN d'HHV-6 dans le sérum de patients atteints de SEP (Soldan et al, 2001). Ces niveaux accrus de CD46 avaient précédemment été décrits dans plusieurs désordres auto-immuns, dont la SEP.

Il existe des cas d'adultes immunocompétents ou immunodéprimés présentant une maladie aiguë du système nerveux central due à une infection active à HHV-6 (Beovic et al., 2001 ; Mackenzie et al., 1995 ; Novoa et al., 1997 ; Denes et al., 2004). Le rôle de co-facteur pour HHV-6 dans la leucoencéphalite multifocale progressive, maladie causée par le virus JC, a par ailleurs été proposé (Daibata et al., 2001).

5.2.2. HHV-6 et oncogenèse

Puisque l'HHV-6 a été, à l'origine, isolé chez des patients présentant des désordres lymphoprolifératifs (Salahuddin et al., 1986), son rôle possible dans l'oncogenèse a été recherché. En effet, certains gènes d'HHV-6 codent des protéines transactivatrices, dont la pDR7 qui a été montrée pour avoir des propriétés de transformation (Kashanchi et al., 1997).

Quelques études ont recherché l'expression d'antigènes ou la présence d'ADN d'HHV-6 dans les lésions des tissus lymphoïdes de plusieurs désordres lymphoprolifératifs (Luppi et al., 1998 ; Valente et al., 1996). L'ADN d'HHV-6 a été détecté dans les adénopathies de patients atteints de lymphomes non hodgkiniens (NHL) (Jarrett et al., 1988), mais aussi de maladie de Hodgkin (HD) (Torelli et al., 1991). Un précédent travail conduit au laboratoire a montré que le nombre moyen de copies d'HHV-6 était plus élevé chez les patients atteints de HD que chez les patients NHL, suggérant un possible rôle d'HHV-6 dans la maladie de Hodgkin (Collot et al. 2002).

HHV-6 pourrait également participer à la maladie de Rosai-Dorfman (une lymphadénopathie rare, bénigne, touchant les enfants), à la maladie lymphoproliférative chronique des cellules T S100-positives (un désordre hématologique agressif rare), au carcinome cervical ou au carcinome oral (De Bolle et al., 2005).

5.2.3. HHV-6 et SIDA

L'HHV-6 réactive chez les individus séropositifs pour le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), mais les symptômes cliniques spécifiques associés à la réactivation sont rares. Les cas de rétinites, de pneumopathies et d'encéphalites sont les plus couramment décrits. Dans des cas de lymphomes associés au SIDA, la présence d'HHV-6 a également été rapportée (Fillet et al., 1995). Mais à l'exception d'une transmission verticale du VIH, aucune preuve d'effets indirects de l'HHV-6 sur la progression du SIDA n'a été rapportée (Dockrell, 2003). A l'heure actuelle on ignore si HHV-6 agit simplement en tant que pathogène opportuniste ou accélère la progression de la maladie à VIH.

5.2.4. HHV-6 et greffes

Les pathologies associées à la réactivation d'HHV-6 chez les individus immunodéprimés après transplantation seront abordées dans la deuxième partie.

6. Latence

De même que les autres herpèsvirus, l'HHV-6 reste présent chez l'hôte infecté tout au long de sa vie. Cette persistance inclue un état latent pouvant être entrecoupé d'épisodes de réactivation et une réplication chronique avec une production continue plus ou moins importante de particules infectieuses, notamment dans les glandes salivaires. Au plan cellulaire, la latence peut être définie comme une infection au cours de laquelle le génome viral est présent sous forme épisomale non répliquative et à partir de laquelle il peut se réactiver. Au niveau de l'hôte infecté, la latence peut être définie comme une phase cliniquement muette, pouvant aboutir à une réactivation du virus, c'est-à-dire à la reprise d'un cycle lytique. Cette réactivation d'HHV-6 peut alors être symptomatique ou non.

Au cours de la latence, l'intégrité de la cellule hôte est préservée et les antigènes viraux caractéristiques d'une infection productive ne sont pas exprimés, HHV-6 est ainsi à l'abri du système immunitaire de l'hôte infecté. Seuls quelques transcrits associés à la latence d'HHV-6, transcrit du gène U94 et les transcrits associés à la latence, peuvent être détectés.

Le site actuel de latence n'a pas encore été établi de manière concluante, mais HHV-6 peut être détecté dans le sang périphérique de patients sains par PCR nichée, reflétant des charges virales faibles (Clark et al., 1996) et probablement du virus latent. Les candidats pour une infection latente sont les monocytes et les cellules précurseurs précoces de la moelle osseuse (Kondo et al., 1991 ; Luppi et al., 1999). Récemment, il a été montré que les cellules précurseurs hématopoïétiques CD34+ portaient le virus à l'état latent et que l'HHV-6 pouvait réactiver lors de la différenciation de ces cellules progénitrices (Andre-Garnier et al., 2004). Une lignée cellulaire dans laquelle HHV-6 semblerait latent a précédemment été établie (Bandobashi et al., 1997).

6.1. Le gène U94

Les mécanismes par lesquels le virus établit une infection latente ne sont pas connus ; mais U94 semble jouer un rôle. U94 est un gène IE (Mirandola et al., 1998) exprimé à faible niveau pendant l'infection lytique (Rapp et al., 2000), mais est un transcrit majeur pendant la latence (Rotola et al., 1998). Le gène U94, homologue du gène *rep* de l'Adeno-associated virus de type 2 (AAV-2) (Thomson et al., 1991) est unique à HHV-6, il n'a pas d'analogue chez les autres herpèsvirus humains. La protéine U94, lorsqu'elle est exprimée de façon stable, est

capable d'établir et/ou de maintenir l'infection latente des PBMC (Rotola et al., 1998). Elle possède des propriétés transactivatrices par liaison au facteur de transcription, la protéine de liaison à la boîte TATA humaine (Mori et al., 2000) et a la capacité de se lier à l'ADN simple brin (Dhepakson et al., 2002). La protéine U94 peut avoir une fonction dans la régulation de la latence soit en se liant à une séquence spécifique de l'ADN (comme le fait la protéine Rep de l'AAV-2), soit c'est un répresseur des gènes viraux IE (comme les transcrits LAT associés à la latence d'HSV-1) (Rotola et al., 1998).

6.2. Transcrits associés à la latence

En étudiant la latence d'HHV-6, Kondo et al. (2002b) ont identifié les transcrits associés à la latence de l'HHV-6B (H6LTs) à partir des ARN messagers de la région IE-A. Les H6LTs contiennent des ORF communs aux transcrits IE-1 et IE-2 de la phase productive, mais ont des structures différentes. Les sites d'initiation de la transcription durant l'infection latente (LSS1 et LLS2) sont différents du site d'initiation de la transcription durant l'infection productive (PSS), de même les structures des extrémités 5' et 3' des transcrits productifs et latents sont différentes (Figure 5). Les transcrits les plus abondants sont le type I dérivé du H6LTs de IE2 et le type II dérivé du H6LTs de IE1. De petits ORF localisés dans la région 5' des H6LTs (ORF99, ORF142 et ORF145) ont également été identifiés. Ils pourraient supprimer la réplication d'HHV-6 au niveau de la traduction des protéines IE durant la latence, comme observé pour le HCMV (Kondo et Mocarski, 1995). L'expression des H6LTs est abondante juste avant le déclenchement de la réactivation virale, aussi bien chez des patients après le début d'une thérapie immunosuppressive, qu'*in vitro* après stimulation par le TPA (tetradecanoyl phorbol acetate) de cultures infectées de manière latente (Kondo et al., 2003). Ces transcrits pourraient alors être la source de protéines IE1/IE2 qui en retour stimulent la réactivation de manière efficace.

6.3. Intégration chromosomique

L'intégration dans les chromosomes de la cellule hôte, bien qu'excessivement rare, est un phénomène associé à la latence d'HHV-6. Ce phénomène a été rapporté pour la première fois par Torreli et al. (1995) chez des patients atteints de lymphomes ou de SEP. L'intégration a été localisée aux chromosomes 17q13.3 (Morris et al., 1999), 22q13 et 1q44 (Daibata et al., 1999). Ces deux dernières positions d'intégration ont permis de mettre en évidence la transmission de l'HHV-6 sous forme intégré : un couple présentant le virus intégré en 1q44

pour le père et en 22q13 pour la mère a eu une fille portant le génome viral sous forme intégré aux mêmes sites chromosomiques que ses parents (Daibata et al., 1999).

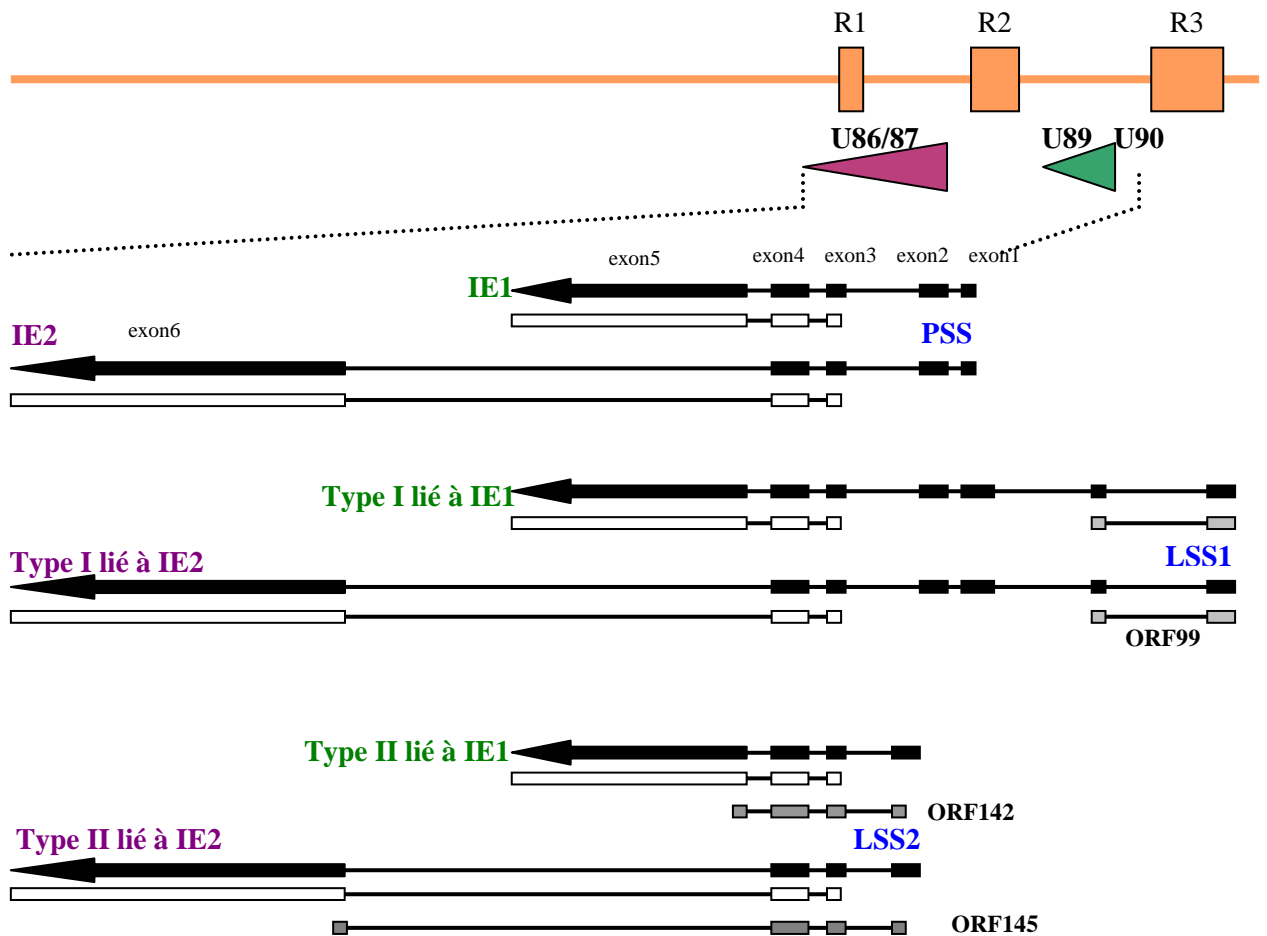


Figure 5 : Organisation des transcrits associés à la latence d'HHV-6

R1, R2, R3 : régions répétées internes ; IE1 : transcrit très précoce 1 dérivant de U90 et U86/87 ; IE2 : transcrit très précoce 2 dérivant de U90 et U89 ; LSS1 et LSS2 : sites d'initiation de la transcription durant l'infection latente ; PSS : site d'initiation de la transcription durant l'infection productive ; ORF : cadre ouvert de lecture.

Actuellement, les mécanismes moléculaires commandant l'intégration chromosomique d'HHV-6 sont inconnus. Mais les séquences $(GGGTTA)_n$ situées aux extrémités du génome viral et les séquences télomériques humaines pourraient recombiner. De plus, la protéine Rep de l'AAV-2 joue un rôle dans l'intégration de l'AAV-2 en ciblant des séquences spécifiques d'ADN. Son homologue chez HHV-6, la protéine pU94, qui présente les mêmes propriétés, pourrait peut-être agir de la même manière (Clark, 2000).

7. Diagnostic des infections à HHV-6

Au laboratoire, les outils couramment utilisés pour diagnostiquer une infection à HHV-6 sont des méthodes directes (isolement du virus, détection d'antigènes, techniques de PCR) ou indirectes (études sérologiques).

7.1. Diagnostic direct

7.1.1. Isolement du virus par culture

La méthode d'isolement du virus à partir du sang périphérique a été décrite par Yamanishi et al. (1988). Elle consiste en la co-culture des prélèvements et de lymphoblastes maintenus en présence d'interleukine 2 (IL-2). Ces lymphoblastes peuvent être isolés du sang de cordon ou du sang périphérique ; dans ce dernier cas une activation soit par la phytohémagglutinine (PHA) soit par l'anticorps anti-CD3 est nécessaire. Etant donné qu'il est présent en grande quantité au cours de la primo-infection, l'HHV-6 répliquatif est ainsi facilement isolé des PBMC ou de la salive au cours de la phase aiguë de l'exanthème subit (ES).

Un effet cytopathogène (ECP) spécifique est observé dans les 5 à 21 jours suivant la mise en culture. *In vitro*, l'HHV-6 est un virus cytopathique. Les cellules infectées montrent des cellules ballonisées géantes, formant des syncytia 2 à 5 fois plus gros que les cellules saines (Figure 6) (Salahuddin, 1986 ; Taniguchi, 2000). Cependant, même si les changements morphologiques sont assez prononcés et qu'ils peuvent suggérer un fort degré d'infection, le rendement en particules infectieuses est généralement plus faible qu'espéré.

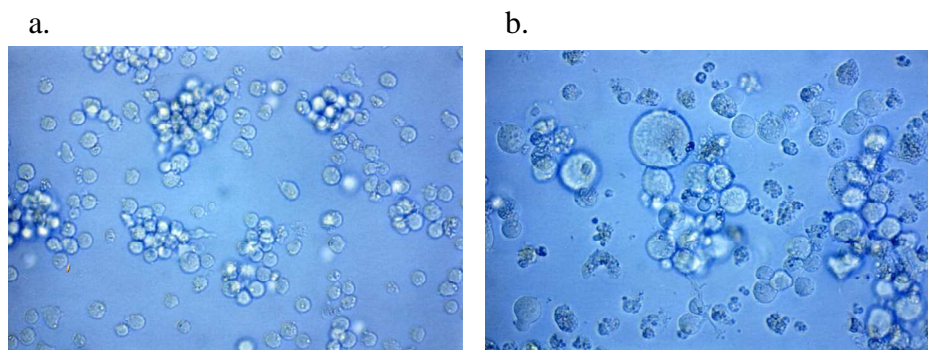


Figure 6 : L'effet cytopathogène d'HHV-6

a. cellules lymphoblastiques saines ; b. cellules infectées par HHV-6 (x 200).

En l'absence d'ECP visible, la confirmation d'une réplication d'HHV-6 peut être apportée par la détection d'antigènes ou du génome viral. De plus, HHV-6A et HHV-6B ayant le même ECP, le typage du virus doit être réalisé à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques ou par des techniques de biologie moléculaire. La technique d'isolement viral par culture est donc laborieuse, longue, délicate et peu sensible en général.

7.1.2. Détection d'antigènes

Les antigènes d'HHV-6 peuvent être détectés par des anticorps monoclonaux spécifiques commercialisés. Ces anticorps sont ensuite eux-mêmes mis en évidence à l'aide d'un conjugué marqué, souvent un anticorps anti-IgG de souris couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine ou à la peroxydase. Certains de ces anticorps réagissent avec des protéines d'HHV-6A et d'HHV-6B (Okuno et al., 1992), alors que d'autres sont spécifiques d'HHV-6A ou B et permettent donc de typer le virus (Foà-Tomasi et al., 1995). En plus de leurs utilisations dans les techniques d'immunofluorescence (IFA), par exemple pour la confirmation de culture, certains de ces anticorps sont adaptés à l'immunohistochimie pour la détection de protéines virales dans les tissus (Lautenschlager et al., 1998). Une détection d'antigènes d'HHV-6 est la preuve d'une infection active.

Une technique d'antigénémie semblable à celle utilisée pour le HCMV a récemment été mise au point (Lautenschlager et al., 2000). Elle permet la mise en évidence d'HHV-6 directement à partir des prélèvements sanguins. Cette méthode consiste à séparer les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) par centrifugation sur gradient de Ficoll-Hypaque, à les récupérer et à les déposer sur lame, par cytocentrifugation par exemple. Après fixation, deux anticorps monoclonaux anti-HHV-6 sont utilisés en parallèle : l'un dirigé contre une protéine précoce d'HHV-6A et d'HHV-6B, l'autre contre la protéine p101 spécifique d'HHV-6B. La réaction est enfin révélée à l'aide de conjugués comme précédemment décrit.

7.1.3. Détection d'acides nucléiques

Le diagnostic d'une multiplication d'HHV-6 se fait essentiellement par des méthodes basées sur la PCR. Ces techniques peuvent se faire sur tout type de prélèvement, notamment des prélèvements obtenus de manière non-invasive. Elles sont rapides et sensibles, tout particulièrement chez les populations immunodéprimées.

Puisque l'infection latente par HHV-6 est très commune dans la population, l'utilisation de la PCR qualitative pour détecter l'ADN d'HHV-6 dans les cellules sanguines ou les tissus n'a qu'une faible valeur pour diagnostiquer la réactivation d'HHV-6. Par contre, la détection du génome viral dans les prélèvements acellulaires (sérum, plasma, LCR) est un marqueur d'une infection productive. Cette détection est pourtant limitée par la sensibilité de la PCR. Afin d'augmenter cette sensibilité, une amplification suivie d'une hybridation peut être utilisée (Cone et al., 1993a et 1994).

Une infection active d'HHV-6 peut également être mise en évidence par la détermination de la charge virale. Dans un premier temps, cette dernière méthode a été évaluée par des techniques de PCR quantitative compétitive utilisant des standards internes ou des quantités connues de virus clonés (Seccherio et al, 1995 ; Clark et al., 1996 ; Emery et al., 1999 ; Griffiths et al, 1999 ; Fujwara et al., 2000). Mais ces techniques étant laborieuses, elles ont, dans un deuxième temps, été remplacées par la PCR quantitative en temps réel qui combine une amplification à une quantification par ordinateur. Les chimies mises en œuvre pour la quantification d'HHV-6 sont les sondes TaqMan et les sondes d'hybridation (Tableau III). Ces techniques sont applicables à une grande variété de matériel biologique et représentent un moyen sensible de détecter et de quantifier l'ADN d'HHV-6, mais aussi de typer l'HHV-6.

Références	Chimie utilisée	Gène quantifié	Prélèvements biologiques	Typage
Locatelli et al., 2000	TaqMan	U67	Plasma	N
Aritaki et al., 2001	Hybridation	U11	Sang	N
Nitsche et al., 2001	TaqMan	IE1	Plasma, PBL	O
Gautheret-Dejean et al., 2002	TaqMan	U65-U66	Sang, LCR	N
Collot et al., 2002	TaqMan	U22	Salive, biopsie	N
Sashihara et al., 2002	TaqMan	IE1	Plasma, PBMC	O
Safronetz et al., 2003a	Hybridation	U38	PBMC	O
Reddy et al., 2005	TaqMan	U38	plasma	O

Tableau III : Différentes techniques de quantification d'HHV-6 utilisées sur les prélèvements biologiques. PBL : leucocytes du sang périphérique ; PBMC : cellules mononucléées du sang périphérique ; LCR : liquide céphalo-rachidien. N : non ; O : oui.

Enfin, la discrimination entre un état latent et un état répliatif d'HHV-6 peut être faite par la détection des ARNm viraux (Norton et al., 1999 ; van den Bosh et al., 2001 ; Chuh et al., 2002 ; Chapenko et al., 2003). Ainsi, une RT-PCR développée par Yoshikawa et al. (2003) permet la détection de 4 transcrits : U31 et U39 (transcrits tardifs) sont retrouvés au cours de la phase fébrile de l'ES chez 90-100 % des patients mais pas pendant la phase de convalescence, U90 et U94 (transcrits très précoces, le dernier étant associé à la latence) sont détectés pendant la convalescence de respectivement 15 et 10 % des patients. Quant à la technique mise au point sur le gène U100 (Andre-Garnier et al., 2003), elle détecte les transcrits provenant de l'épissage alternatif tardif, preuve de la multiplication du virus.

Récemment, Alvarez-Lafuente et al. (2004) ont combiné la détection des ARNm à une PCR quantitative en temps réel permettant la détection des ARNm des gènes très précoces U16/17, U89/90 et U94 sur sérum et sang.

Les avantages et les inconvénients de ces différentes méthodes de diagnostic des infections actives à HHV-6 par détection d'acides nucléiques seront discutés dans la première partie du travail expérimental de ce mémoire.

7.2. Diagnostic indirect ou sérologie

La détection des anticorps, immunoglobulines d'isotype G (IgG) et/ou d'isotype M (IgM), anti-HHV-6 emploie le plus souvent l'IFA indirecte (Krueger et al., 1991 ; Briggs et al., 1988). Les cellules infectées par l'HHV-6, fixées sur des lames, sont utilisées comme antigènes. Mais cette technique est subjective. De nombreux autres essais existent, comme la recherche d'anticorps neutralisants (Asano et al., 1989), l'ELISA (Parker et al., 1993 ; Nigro et al., 1995) et l'immunoblot (Lacroix et al., 2000). Malheureusement, aucune de ces techniques ne distingue une réponse anticorps anti-HHV-6A d'une réponse anti-HHV-6B. De plus, étant donnée la forte séroprévalence d'HHV-6, les titres en anticorps n'ont qu'un faible intérêt diagnostique ou ne sont utiles que pour rechercher des IgG anti-HHV-6 dans les cas de séroconversion (Ueda et al., 1989). En effet, la détection d'IgM, généralement signe d'une primo-infection ou d'une réactivation, n'est pas forcément un bon indicateur dans le cas d'HHV-6 : de nombreux enfants ayant une culture positive pour HHV-6 ne développent pas de réponse IgM détectable et environ 5 % des adultes sains présentent des IgM anti-HHV-6 à n'importe quel moment (Suga et al., 1992).

8. Traitements anti-HHV-6

Chez les individus immunodéprimés, la réactivation de l'HHV-6 latent peut entraîner des complications menaçant la vie du patient. Le traitement est donc nécessaire. Les produits utilisés sont les mêmes que ceux employés pour le traitement d'une infection à HCMV et sont constitués d'analogues nucléosidiques (Ganciclovir et Valganciclovir, Acyclovir et Valaciclovir), d'un analogue nucléotidique (Cidofovir) et d'un analogue de pyrophosphate (Foscarnet).

8.1. Analogues nucléosidiques

L'Acyclovir (ACV) et le Ganciclovir (GCV) sont des analogues de la désoxyguanosine (Figure 7) qui doivent être sous forme triphosphorylée pour être actifs. Dans le cas de l'HHV-6, le premier groupement phosphate, qui convertit l'analogue de nucléosides en son dérivé monophosphate, est ajouté par une phosphotransférase codée par le gène U69. L'expression de cette protéine permet la phosphorylation du GCV (Ansari et al., 1999). Le rôle de la protéine pU69 dans le cycle réplcatif du virus est inconnu, mais son homologue chez le HCMV, la protéine pUL97, joue un rôle essentiel dans la réplication du HCMV (Prichard et al., 1999). La conversion en ACV ou GCV di- et triphosphate est par contre catalysée par les kinases cellulaires (Figure 8). Sous leurs formes actives triphosphates, l'ACV et le GCV entrent en compétition avec la dGTP en tant que substrat pour l'ADN polymérase virale. Suite à son insertion dans l'ADN en cours de réplcation, la synthèse de l'ADN prend fin. En effet, l'ACV et le GCV ne possèdent pas de groupement 3'-hydroxyle nécessaire à la formation de la liaison phosphodiester et sont donc des terminateurs de chaîne. De plus, l'incorporation de l'ACV ou du GCV dans l'ADN est irréversible : il ne peut être excisé par l'activité 3'-5'-exonucléase de l'ADN polymérase virale. Mais un inconvénient pour l'ACV et le GCV réside en leurs faibles disponibilités biologiques par voie orale, rendant l'administration intraveineuse nécessaire. Le Valaciclovir (Val-ACV) et le Valganciclovir (Val-GCV) sont des pro-drogues orales. Le Val-ACV et le Val-GCV sont les L-valyl ester de l'ACV et du GCV, respectivement. Suite à leur ingestion, ils sont rapidement convertis en ACV et GCV par une hydrolase dans le tractus gastro-intestinal et dans le foie (Soul-Lawton et al., 1995).

L'activité *in vitro* du GCV contre HHV-6 est très supérieure à celle de l'ACV et du penciclovir (Agut et al., 1991 ; Burns et al., 1990 ; Manichanh et al., 2000 ; Yoshida et al., 1998). En raison de leurs faibles activités l'ACV et le Val-ACV ne sont donc utilisés ni dans

le traitement ni dans la prévention des maladies à HHV-6. A l'inverse, plusieurs cas rapportés montrent l'efficacité clinique du GCV contre la maladie à HHV-6 *in vivo* chez des greffés de moelle osseuse ou d'organe solide, se manifestant, dans la majorité des cas par des encéphalites à HHV-6 (Johnston et al., 1999 ; Mookerjee et al., 1997 ; Paterson et al., 1999 ; Rieux et al., 1998 ; Yoshida et al., 2002), bien que quelques cas d'infection fulminante à HHV-6 n'aient montré aucune réponse (Rossi et al., 2001 ; Tiacci et al., 2000). En outre, la thérapie prophylactique avec du GCV, à l'inverse de l'ACV, s'est montrée efficace en empêchant la réactivation d'HHV-6 chez les receveurs de moelle osseuse et de cellules souches (Rapaport et al., 2002 ; Tokimasa et al., 2002). Le GCV peut causer d'importants effets secondaires dépendant de la dose administrée, comme une neutropénie et une thrombocytopenie (McGavin et al., 2001).

8.2. Analogie nucléotidique

Le Cidofovir (CDV) est un analogue des nucléosides phosphonates qui appartient à la famille des dérivés phosphonylméthoxyalkyl des purines et des pyrimidines. Etant donné que sa structure primaire comprend un groupement phosphate (Figure 7), il n'a pas besoin d'être phosphorylé par le produit d'un gène viral pour être activé. Les kinases cellulaires le convertissent en sa forme diphosphate qui est alors un inhibiteur compétitif de l'ADN polymérase viral (Figure 8). Sa sélectivité est assurée par la plus grande affinité du CDV diphosphate pour l'ADN polymérase virale que pour les ADN polymérase cellulaires.

Le CDV montre une forte activité contre l'HHV-6 *in vitro* (Reymen et al., 1995) et, avec le foscarnet, c'est le composé le plus actif disponible pour le traitement des infections à HHV-6, avec un index très favorable de sélectivité dans les CBMC (De Bolle et al., 2004 ; Yoshida et al., 1998). Denes et al., (2004) ont rapporté l'utilisation du CDV dans le traitement de l'infection à HHV-6 chez un patient immunocompétent présentant une encéphalomyélite à HHV-6. Bien que le CDV ait été très actif, il a cependant été remplacé par le GCV pour des raisons de toxicité et la réplication d'HHV-6 a été supprimée, de même que les symptômes neurologiques associés.

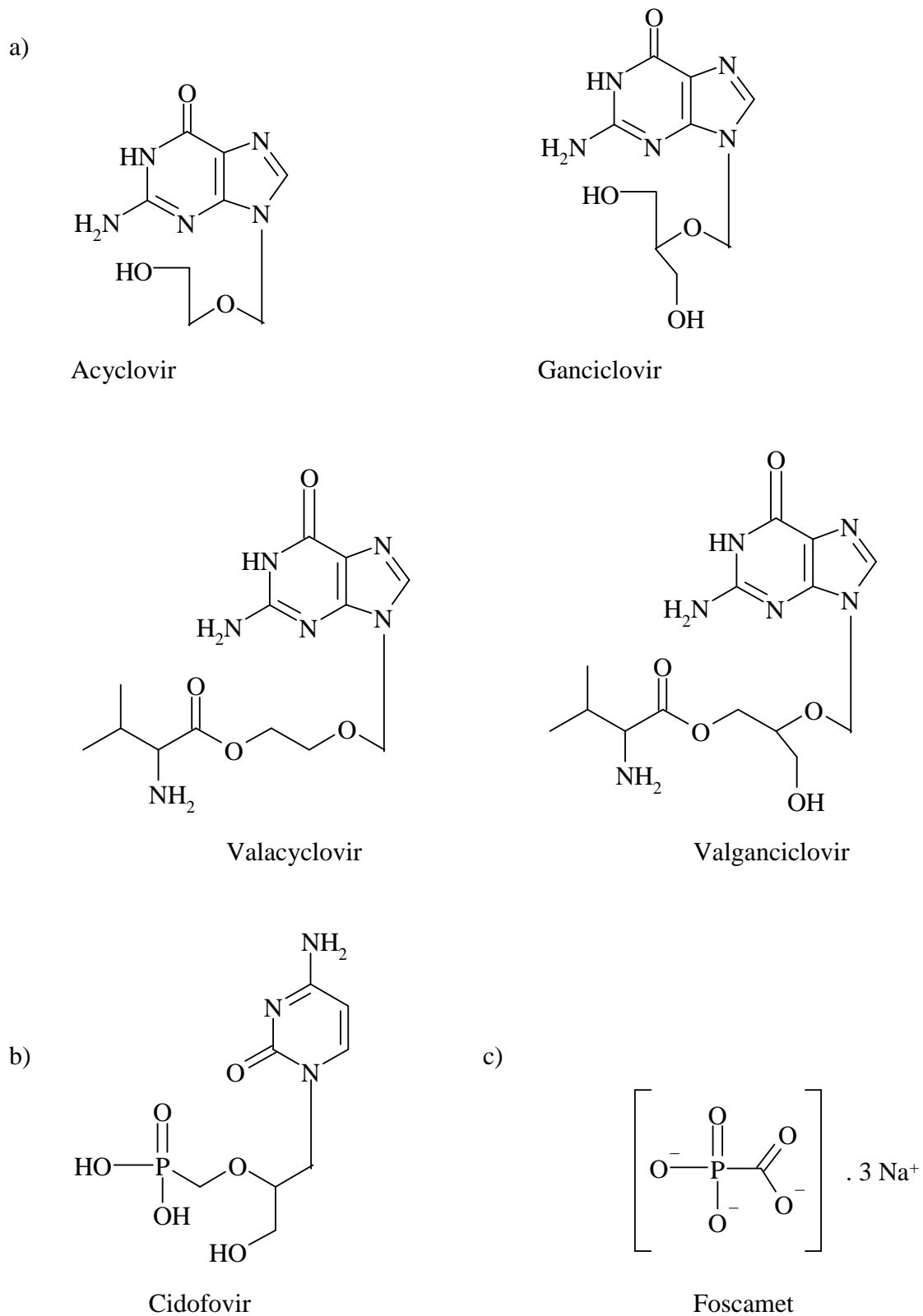


Figure 7 : Structures chimiques des composés anti-HHV-6

- a) analogues nucléosidiques acycliques b) analogue nucléotidique acyclique
 c) analogue de pyrophosphate

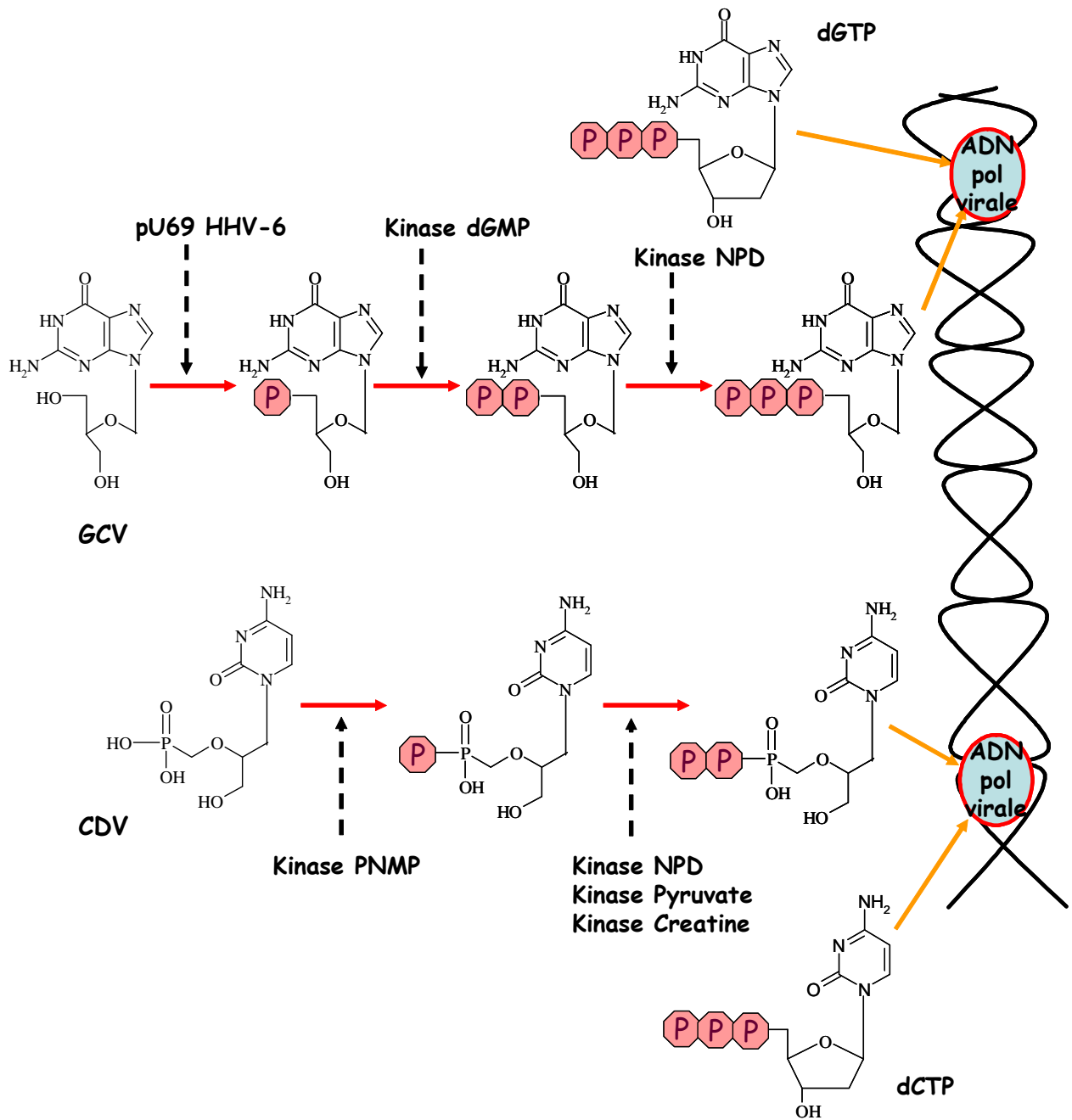


Figure 8 : Activation métabolique du ganciclovir (GCV) et du cidofovir (CDV) par les enzymes kinases cellulaires et la phosphotransférase virale pU69.

dCTP : déoxycytidine triphosphate ; dGTP : déoxyguanosine triphosphate ; dGMP : déoxyguanylate ; NDP : nucléoside diphosphate ; PNMP : pyrimidine nucléoside monophosphate ; ADN pol : ADN polymérase

8.3. Analogue de pyrophosphate

Le Foscarnet (PFA) est un analogue des pyrophosphates inorganiques (ppi) (Figure 7) qui diffère de l'ACV et du GCV puisqu'il ne nécessite pas d'activation préalable par les TK virales ou cellulaires. C'est un inhibiteur de l'ADN polymérase virale et il n'est pas incorporé dans le brin d'ADN en cours d'élongation. Le PFA bloque le site de liaison des ppi sur l'ADN polymérase et empêche ainsi le clivage des NTP et le transfert des ppi sur l'ADN polymérase virale.

Des études ont montré l'utilisation réussie du Foscarnet dans le traitement des encéphalites à HHV-6 chez des receveurs de greffe (Bethge et al., 1999 ; Zerr et al., 2001), alors que d'autres ont eu un résultat décevant (Rossi et al., 2001 ; Tiaci et al., 2000).

8.4. Résistances développées par HHV-6

La première étude de résistance d'HHV-6 aux antiviraux a été menée par Manichanh et al., (2001). Les auteurs, après une série de passages en culture d'HHV-6 en présence de concentrations croissantes de GCV, ont isolé un mutant présentant une sensibilité diminuée aux anti-viraux : les IC₅₀ du mutant HHV-6 étaient 24, 52 et 3 fois plus élevées que les IC₅₀ de la souche sauvage, respectivement pour le GCV, le CDV et le PFA. Deux mutations de substitutions ont alors été identifiées : M318V dans la phosphotransférase pU69 (analogue de M460V/I de la pUL97 du HCMV ; Baldanti et al., 2002) et A961V dans l'ADN polymérase pU38 d'HHV-6. La mutation M318V a également été détectée par PCR sur des PBMC infectées par HHV-6. Ces PBMC ont été isolées d'un patient atteint du SIDA longtemps traité par du GCV pour une infection à HCMV. Par la suite, la même équipe a développé une PCR quantitative en temps réel permettant de mettre en évidence, lors d'essais anti-viraux, la résistance au GCV due à cette mutation (Macé et al., 2003).

En utilisant un système de baculovirus recombinants, Safronetz et al. (2003b) ont évalué l'impact d'une série de mutations de la pU69 d'HHV-6. Ces mutations ont été introduites à des positions correspondant aux codons de la pUL97 du HCMV conférant la résistance au GCV. Les substitutions M318V, C448G, C463Y de pU69, correspondant respectivement aux mutations M460V, C592G, C607Y de pUL97, altèrent significativement la phosphorylation du GCV par pU69 exprimée en système de baculovirus, et confèrent ainsi la résistance d'HHV-6 au GCV.

Partie 2 : Réactivation d'HHV-6 chez les sujets immunodéprimés après transplantation

L'infection active à HHV-6 est fréquemment détectée chez les patients immunodéprimés. La plupart de ces infections à HHV-6 sont dues à la réactivation d'HHV-6B (Drobyski et al., 1993) et les pics sont entre 2 et 4 semaines post-transplantation (Yoshikawa et al., 2002). La fréquence moyenne de détection rapportée varie selon les études entre 48 % (allant de 28 à 75 %) pour les greffés de moelle osseuse (BMT) et 32 % (0 à 82 %) pour les greffés d'organes solides (SOT). Ces variations sont dues à l'hétérogénéité des patients, aux sensibilités des différentes techniques utilisées et au nombre et à la nature des prélèvements. Selon la greffe, la réactivation d'HHV-6 est associée à certaines maladies et les principales observations cliniques sont des encéphalites, de la fièvre et des rashes, une suppression médullaire...

Etant donné l'état d'immunosuppression induit pharmacologiquement chez les transplantés, l'HHV-6 réactive probablement de la latence et agit comme un pathogène opportuniste. Mais comme l'HHV-6 est porté par de nombreux tissus (cellules mononucléées, moelle osseuse, poumons, foie), il existe également une possibilité d'une (ré)infection à HHV-6 induite par le greffon, le virus étant alors transféré du donneur au receveur. Le taux de réactivation d'HHV-6 est plus élevé parmi les transplantés recevant de l'anticorps anti-CD3 (immunoglobuline anti-thymocyte), qui est utilisé pour le traitement du rejet (DesJardin et al., 2001 ; Zerr et al., 2001), mais aussi dans sa prévention.

1. Les différentes greffes

1.1. Greffes de moelle osseuse

C'est dans la moelle osseuse que sont produites les cellules souches qui vont elles-mêmes donner naissance aux cellules du sang. La greffe de moelle est une transplantation particulière car le malade peut être greffé avec sa propre moelle (autogreffe) ou avec la moelle d'un donneur (allogreffe) (Russell, 2005).

Une allogreffe peut se faire entre : deux jumeaux monozygotes ou greffe syngénique, deux personnes de la même fratrie ou greffe géno-identique, deux personnes non apparentées ou greffe phéno-identique. Le système HLA ("Human Leukocyte Antigens", système majeur de reconnaissance des cellules étrangères par le système immunitaire) du donneur et du receveur doivent être compatibles ; ils sont mêmes identiques dans le cas d'une greffe syngénique.

Une autogreffe est la réinjection de la moelle osseuse du patient préalablement recueillie et conservée par congélation. Le prélèvement est réalisé à un moment où la moelle osseuse ne

contient plus de cellules cancéreuses, ou bien ce prélèvement est traité en laboratoire pour éliminer toute cellule tumorale.

Il existe deux grands types d'indication pour les greffes de moelle osseuse : le traitement d'un cancer (lymphome, myélome, leucémie...) représente 80 % des cas et le traitement d'autres maladies (comme les aplasies médullaires) représente les 20 % restants.

Les greffes de moelle ont tendance à diminuer, au profit de deux autres techniques : la cytophérèse et la greffe de sang de cordon. Ces différents types de greffe sont réunis aujourd'hui sous le terme de greffes de cellules souches hématopoïétiques.

La cytophérèse permet le recueil des cellules souches du sang (Moog et al., 1998). Dans un premier temps, une stimulation de la production de ces cellules souches par des injections de facteurs de croissance hématopoïétiques favorise le passage de ces cellules de la moelle vers le sang. Puis dans un deuxième temps, un cathéter est posé et le sang est dérivé pour passer dans une machine de tri cellulaire. Les cellules souches sont alors sélectionnées et prélevées, alors que le reste du sang est réinjecté au patient. Les cellules souches sont conservées au froid dans un milieu nutritif, puis réinjectées. Elles vont alors coloniser la moelle.

La greffe de sang de cordon consiste à greffer les cellules du sang placentaire, prélevées dans le cordon ombilical de nouveaux-nés, juste après la naissance (Paloczi, 1999). Ces cellules se multiplient rapidement et entraînent moins de rejet du fait de leur caractère immature. Une greffe de sang de cordon permet de réaliser l'équivalent d'une allogreffe chez des patients qui ne disposent pas d'un donneur de moelle HLA compatible.

Le risque de rejet est particulièrement élevé pour les greffes de moelle. Aussi est-il indispensable que donneur et receveur soient le plus proche possible dans le système HLA. Les autogreffes sont, en fait, bien plus fréquentes que les allogreffes, du fait notamment des difficultés à trouver un donneur compatible.

La principale complication, en cas d'allogreffe, est la réaction du greffon contre l'hôte ("Graft Versus Host Disease" ou GVHD) (Basara et al., 2000). Elle est liée à l'effet des cellules immunitaires (lymphocytes) contenues dans le greffon contre les organes normaux du patient (notamment la peau, le foie et le tube digestif). Bien qu'un traitement adapté puisse prévenir ou traiter ces complications, chacune d'elles présente un risque d'évolution défavorable. Il existe deux types de GVHD :

☞ La GVH aiguë survenant dans les 3 mois suivant la greffe. Elle serait liée aux lymphocytes TH1 et serait plus fréquente lorsque le greffon est d'origine médullaire

☞ La GVH chronique survenant après le 100ème jour serait plus fréquente avec les greffons de cellules souches issues du sang circulant. Elle serait due aux lymphocytes TH2.

1.2. Transplantation rénale

La greffe du rein est la plus fréquente (52 % des greffes d'organe) et la plus fiable des greffes. Cette opération n'est pas considérée comme vitale, l'hémodialyse et la dialyse péritonéale étant des alternatives plus accessibles aux insuffisants rénaux chroniques. Mais au stade terminal, la transplantation est le seul traitement qui permette aux malades de retrouver une vie quasi-normale (Roberts et al., 2005).

La transplantation rénale peut être réalisée à partir :

☞ D'un donneur en état de mort cérébrale, c'est-à-dire dont le cerveau est détruit de manière irréversible, mais dont les fonctions respiratoires et circulatoires sont maintenues artificiellement

☞ Ou d'un donneur vivant apparenté, un seul rein suffisant à assurer la formation des urines.

Afin de limiter les risques de rejets, on essaie de greffer des reins les plus compatibles possibles. Le donneur doit donc être de même groupe sanguin et, si possible, identique dans le système HLA (cas des vrais jumeaux) ou semi-identique. Les résultats des greffes avec donneurs vivants sont meilleurs et il y a une meilleure compatibilité, donc moins de risque de rejet, et, surtout, le rein est de meilleure qualité car il est greffé immédiatement après le prélèvement.

Un traitement immunodépresseur, avec deux ou trois médicaments, est cependant indispensable pour éviter le rejet du rein greffé (Roberts et al., 2005). Ce risque est maximum au cours des six premiers mois ou de la première année (10 à 30 % de rejet aigu, dont la plupart peut être maîtrisée). Par la suite, le traitement immunosuppresseur peut généralement être allégé, en fonction des bilans, mais il devra être pris toute la vie. Ce traitement diminue les défenses de l'organisme contre les infections et peut favoriser le développement de certaines tumeurs.

1.3. Transplantation hépatique

La transplantation hépatique est la plus fréquente des greffes d'organe après celle du rein. Comme le coeur ou les poumons, le foie est un organe vital, une greffe hépatique est donc indiquée lorsque le foie n'est plus capable d'assurer son rôle dans la transformation des

nutriments et dans l'élimination des substances toxiques. La cause la plus fréquente de défaillance hépatique est la cirrhose, c'est-à-dire la transformation fibreuse du parenchyme hépatique. Elle peut être due à une hépatite virale, à l'alcool ou à d'autres toxiques. Parfois aussi, l'insuffisance hépatique est due à une hépatite fulminante, qui entraîne une destruction de l'ensemble des cellules hépatiques en quelques heures ou jours. Enfin, la greffe peut être réalisée pour remplacer un foie atteint de cancer (Roberts et al., 2005).

La transplantation hépatique peut être réalisée :

☞ Avec le foie d'un donneur en état de mort encéphalique.

☞ A partir du foie d'un donneur vivant, dont seul un lobe est prélevé. En effet, le foie se régénérant rapidement, il est possible d'en enlever une partie sans perturber la fonction hépatique.

Les résultats de ces dernières greffes sont meilleurs car l'intervention est programmée à l'avance : la compatibilité est meilleure et il y a donc moins de risque de rejet car le donneur est apparenté. De plus, le foie a moins de risque de se détériorer, car il est greffé immédiatement. Actuellement ces dons d'organe entre vivants sont limités aux parents au premier degré (parents, enfants, frères et soeurs).

Donneur et receveur doivent être de même groupe sanguin, pour limiter les risques de rejet. Cependant, en cas d'urgence, des greffes peuvent être réalisées avec un donneur de groupe différent, mais compatible. Lorsque le foie provient d'un donneur non apparenté, il est très difficile de respecter une bonne compatibilité dans le système HLA, le risque de rejet est donc plus élevé.

Par ailleurs, le risque de rejet aigu est maximal au cours des premiers mois. Ces rejets peuvent être maîtrisés grâce à des médicaments immunosuppresseurs. Comme pour la greffe de rein, un traitement immunosuppresseur à vie reste nécessaire, pour prévenir un rejet tardif.

1.4. Transplantation cardiaque

La transplantation cardiaque est une intervention lourde, responsable d'une mortalité non négligeable et qui implique un risque vital en cas de rejet. Elle n'est donc utilisée qu'en tout dernier ressort, pour les personnes ayant une insuffisance cardiaque terminale, c'est-à-dire lorsque le coeur est incapable d'effectuer correctement son travail de pompe pour faire circuler le sang, malgré un traitement bien conduit (Roberts et al., 2005).

Comme pour le foie, le coeur est prélevé au bloc opératoire sur des personnes en état de mort encéphalique, mais dont les fonctions respiratoires et circulatoires sont maintenues artificiellement. La greffe est réalisée en plaçant le malade sous circulation extracorporelle ;

son sang est dérivé de part et d'autre du coeur, l'oxygénation et la circulation sanguines étant assurées par un oxygénateur et une pompe extracorporelle. Le coeur malade est alors enlevé, en laissant en place une partie des oreillettes droites et gauches (partie supérieure du coeur), sur lesquelles va être suturé le greffon. Les vaisseaux arrivant et partant du coeur sont ensuite eux aussi suturés au greffon.

Les greffes de coeur ne sont réalisées qu'entre personnes de même groupe sanguin, pour limiter le risque de rejet de ce corps étranger par le système immunitaire. Mais, il est impossible de tenir compte du système HLA, car il serait trop long de trouver un donneur compatible. Un traitement immunosuppresseur puissant est donc indispensable pour prévenir le rejet.

D'autres types de transplantation sont les greffes cœur-poumons, les greffes bi-pulmonaires séquentielles, les greffes mono-pulmonaires, les greffes de pancréas etc...

2. Traitements immunosuppresseurs

La transplantation d'un organe est toujours accompagnée par une réponse du système immunitaire de l'organisme receveur. Cette réponse se traduit par le rejet de l'organe. L'analyse des mécanismes de cette réaction a permis la mise au point de molécules évitant sa survenue. Ces molécules ont pour objet de diminuer la réaction du système immunitaire et sont donc qualifiées d'immunosuppresseurs (Halloran, 2004).

2.1. Rejets de greffe

La réaction du système immunitaire face à l'organe greffé est comparable à celle mise en oeuvre en cas d'infection. Le greffon est considéré comme un intrus contre lequel les défenses de l'organisme se mobilisent. Les principaux acteurs de ce phénomène sont les antigènes, les anticorps et les lymphocytes T. Une fois les cellules du greffon identifiées comme étant étrangères, une cascade de réactions provoque la sécrétion d'anticorps et la prolifération de cellules tueuses (lymphocytes T), qui infiltrent le greffon et le détruisent. L'intensité de la riposte immunitaire dépend du receveur et de la nature des tissus (Bême, 2005).

On distingue trois types de rejets :

☞ Le rejet suraigu intervient dans les heures suivant la transplantation, aussi bien après des greffes de rein, de coeur ou de foie. Cette réaction se manifeste par la thrombose des vaisseaux irriguant le greffon qui de fait, se nécrose. Ce type de rejet est dû à la présence d'anticorps pré-existants chez le receveur et dirigés contre les antigènes portés par

le greffon. La prévention de ce type de rejet réside dans la pratique systématique de l'épreuve de compatibilité lymphocytaire avant la greffe.

œ Le rejet aigu cellulaire survient au-delà du quatrième jour de greffe. Il apparaît essentiellement dans les trois premiers mois suivant la greffe avec un pic durant le premier mois. Le mauvais suivi des traitements antirejet peut cependant relancer le phénomène quelle que soit l'ancienneté de la greffe. A l'origine de ce rejet, les lymphocytes du receveur reconnaissent les antigènes du donneur, puis ils prolifèrent, envahissent le greffon et le détruisent. Un traitement contrecarrant cette réponse immunitaire est le plus souvent efficace et la précocité de la prise en charge est capitale.

œ Le rejet chronique est la principale cause d'échec des greffes. S'installant insidieusement au cours du temps, le rejet chronique diminue la durée de vie des greffons. Le mécanisme est assez simple mais difficile à combattre. L'inflammation qui règne au niveau du greffon, même réprimée par le traitement anti-rejet, provoque une fibrose des vaisseaux dont les parois s'épaississent lentement. L'irrigation devient alors insuffisante et les fonctions de l'organe se détériorent.

2.2. Traitements immunosuppresseurs

2.2.1. Corticoïdes

Le terme corticoïde, hormones naturelles synthétisées par le cortex surrénal, désigne communément les glucocorticoïdes. Leur mode d'action est assez complexe : ils pénètrent dans le noyau où il se fixent directement à l'ADN, inhibant ainsi la production de facteurs inflammatoires (Figure 9) (Leung et Bloom, 2003). Ils agissent également en altérant la circulation lymphocytaire et donc la migration vers l'organe transplanté.

2.2.2. Inhibiteurs de l'interleukine 2

L'IL-2 active des récepteurs situés sur la membrane des lymphocytes T (dont elle entraîne la maturation et la production), des cellules NK (dont elle stimule la croissance et l'activité cytolytique) et des lymphocytes B (dont elle déclenche la maturation et la synthèse d'anticorps). Par ses actions, l'interleukine 2 (IL-2) participe à la défense de l'organisme contre les molécules qui lui sont étrangères et donc contre le greffon. C'est pourquoi elle est la cible de nombreux traitements immunosuppresseurs.

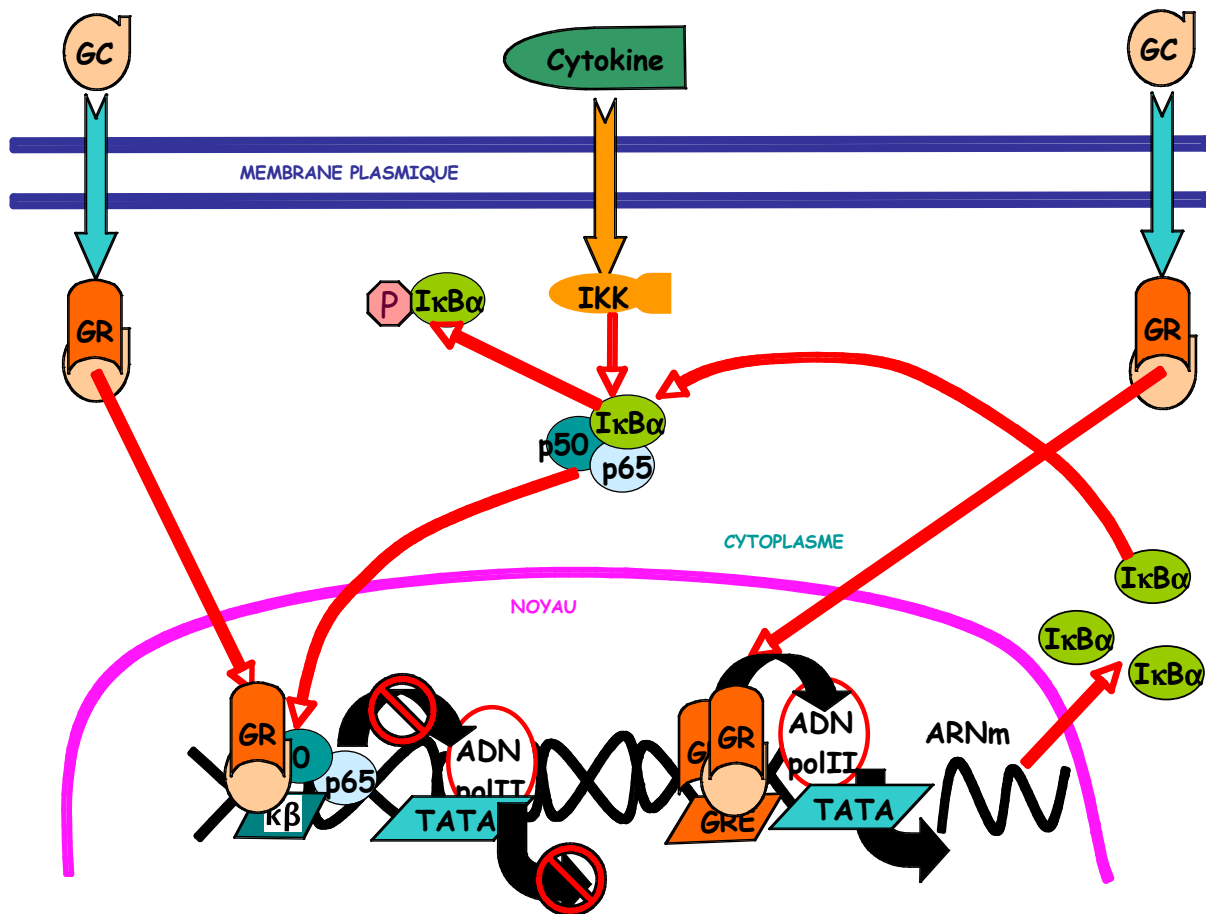


Figure 9: Le mécanisme d'action des glucocorticoïdes

Dans le cytoplasme, les glucocorticoïdes (Gc) se lient à un récepteur soluble (GR). La cible majeure du complexe glucocorticoïde-récepteur est le facteur de transcription NF-κB. En se liant à celui-ci, sans empêcher son attachement aux sites promoteurs contrôlés par NF-κB, le complexe Gc-GR inhibe l'activation de la machinerie transcriptionnelle. Les GC peuvent également exercer leurs effets anti-inflammatoires en activant la transcription de IκBα.

2.2.2.1. Inhibiteurs de la sécrétion d'IL-2

La sécrétion d'IL-2 est déclenchée après l'interaction macrophage-récepteur T (Figure 10). L'un des inhibiteurs de la sécrétion d'IL-2 est la ciclosporine, commercialisée par Novartis sous deux formes : SANDIMMUN® et NEORAL®. Elle est utilisée dans la prévention du rejet du greffon et le traitement de celui-ci après la transplantation d'organe et la greffe de moelle osseuse. Elle inhibe la sécrétion d'IL-2 en se liant à une enzyme, la cyclophiline

(Figure 10). Le tacrolimus est également un inhibiteur de la sécrétion d'IL-2. Il est commercialisé sous le nom de PROGRAF® (Fujisawa). C'est une lactone macrocyclique hydrophobe qui a le même mécanisme d'action que la ciclosporine (Figure 10) (Kahan, 2003).

2.2.2.2. Antagonistes du récepteur de l'IL-2

Le daclizumab (ZENAPAX®, Roche) et le basiliximab (SIMULECT®, Novartis) sont des IgG de type chimérique humain/murin obtenues par génie génétique. Ils sont dirigés contre les récepteurs de l'IL-2 (Figure 11). Ils sont utilisés pour prévenir le rejet aigu après transplantation rénale (Pascual et al., 2001).

2.2.2.3. Inhibiteur de la transduction du signal de l'IL-2

La transduction du signal de l'IL-2 peut être inhibée par la rapamycine (SIROLIMUS®, Wyeth) (Figure 11). Cette molécule a une structure chimérique de type macrolide proche de celle du tacrolimus. Elle est utilisée dans la prévention des rejets de greffes de rein, en association avec la ciclosporine et les corticoïdes (Yakupoglu et Kahan, 2003).

2.2.3. Les inhibiteurs de la synthèse d'ADN et d'ARN

2.2.3.1. Analogue purique

L'azathioprine (IMUREL®, GlaxoSmithKline) inhibe, par compétition avec les bases puriques endogènes, la rétro-inhibition des enzymes responsables de la synthèse des noyaux puriques. Il y a alors synthèse d'ADN et d'ARN anormaux par remplacement des nucléotides physiologiques dérivés de la 6-mercaptopurine.

2.2.3.2. Inhibiteurs de l'inosine monophosphate déhydrogénase (IMPDH)

L'acide mycophénolique est un inhibiteur de l'IMPDH, enzyme responsable de la transformation de l'inosine monophosphate (IMP) en xanthosine monophosphate (XMP), précurseur des dérivés de la guanosine. L'inhibition de l'enzyme entraîne aussi une diminution de la synthèse de guanosine monophosphate (GMP) dont la concentration intracellulaire chute, de même que celle de ses métabolites (GTP et dGTP) nécessaires à la synthèse de l'ARN et de l'ADN.

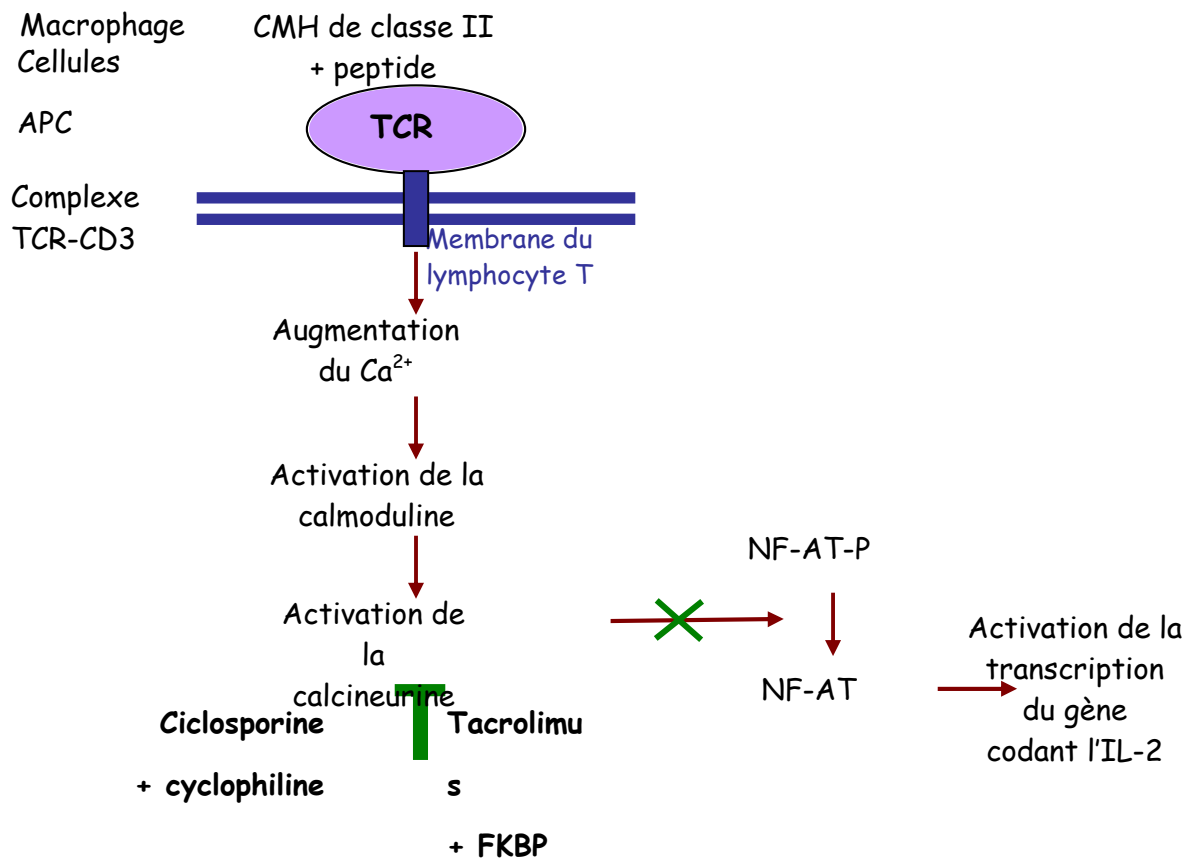


Figure 10 : La régulation de la biosynthèse d'IL-2, site d'action de la ciclosporine et du tacrolimus

Après l'interaction macrophage-récepteur T, l'augmentation du calcium active la calmoduline qui se lie alors à la calcineurine. Ce complexe calmoduline-calcineurine déphosphoryle le NF-AT (nuclear factor of activated T cell), présent dans les cellules lymphoïdes quiescentes à l'état phosphorylé. Le NF-AT déphosphorylé entre dans le noyau et active la synthèse d'IL-2. La ciclosporine inhibe la sécrétion d'IL-2 en se liant à une enzyme, la cyclophiline. Le complexe cyclophiline-ciclosporine se fixe à la calcineurine et inhibe son activité phosphatasique. Le NF-AT n'est alors plus déphosphorylé et la sécrétion d'IL-2 est inhibée. Le tacrolimus inhibe également la calcineurine, mais en se liant à une protéine appelée FKBP (FK binding protein).

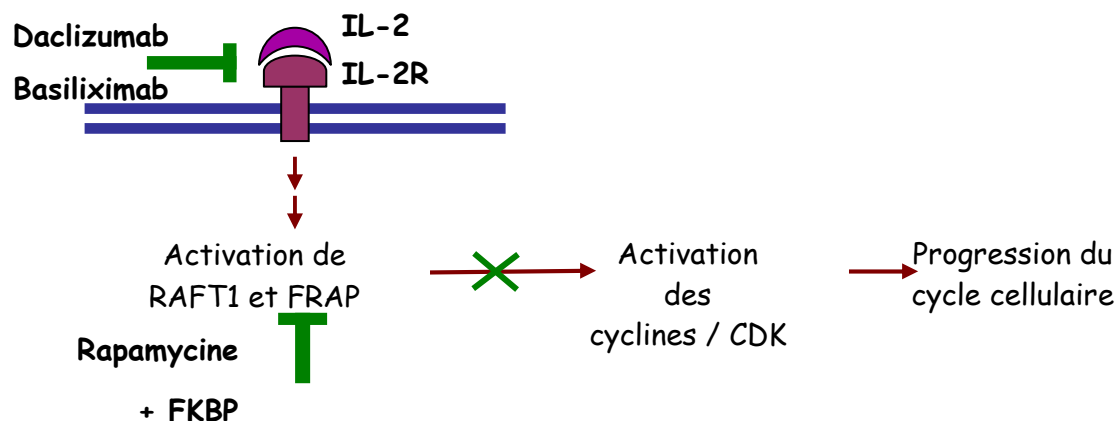


Figure 11 : Le mécanisme d'action de l'IL-2,

inhibition par le daclizumab, le basiliximab et la rapamycine.

La stimulation des récepteurs de l'IL-2 conduit à l'activation des protéines RAFT1 (rapamycine FKBP target) et FRAP (FKBP-rapamycine associated protein), lesquelles activent à leur tour les CDK (cycline dependent kinases).

La rapamycine se fixe à FKBP et le complexe ainsi formé se lie à la protéine cytoplasmique FRAP. Ainsi, elle empêche l'IL-2 d'exercer ses effets au niveau de la cellule cible en inhibant la transduction intracellulaire du signal, ce qui supprime l'activation des CDK.

Le mycophénolate mofétil (CELLCEPT®, Roche) est de l'acide mycophénolique estérifié avec une meilleure biodisponibilité. Une nouvelle formulation gastro-résistante de mycophénolate sodique est commercialisée sous le nom de MYFORTIC® (Novartis). Ils sont utilisés comme immunosuppresseur dans la prévention des rejets aigus de greffes de rein en inhibant la prolifération des lymphocytes B et T, en association avec la ciclosporine et les corticoïdes (van Leeuwen et al., 1997).

2.2.4. Les anticorps

2.2.4.1. Immunoglobuline anti-CD3

Le muromonab-CD3 (ORTHOCLONE OKT3®, Janssen-Cilag) est un anticorps monoclonal IgG dirigé contre l'antigène CD3 des lymphocytes T humains qui interviennent dans la transduction du signal aux lymphocytes T. La liaison du muromonab-CD3 à l'antigène CD3

des lymphocytes, après stimulation transitoire et libération de diverses cytokines, inhibe l'activité des lymphocytes T et diminue les réactions de rejet de greffe rénale, cardiaque, hépatique (Chatenoud, 2003).

2.2.4.2. Immunoglobulines anti-lymphocytes

Il existe deux préparations anti-lymphocytes humains, l'une obtenue à partir de sérum de cheval (LYMPHOGLOBULINE®, Genzyme), l'autre de sérum de lapin (THYMOGLOBULINE®, Genzyme), ces animaux ayant été immunisés contre les lymphocytes humains. Par leur activité lymphotoxique, elles provoquent une déplétion des lymphocytes humains et, par là-même, ont un effet immunosuppresseur. Elles sont utilisées pour éviter les rejets d'organes greffés.

Un des effets indésirables de ces immunoglobulines anti-lymphocytes d'origine animale est l'apparition possible vers le huitième jour du traitement d'une maladie sérique, liée à un conflit antigène-anticorps et caractérisée par plusieurs symptômes : fièvre, urticaire, arthralgies. On peut aussi observer un choc anaphylactique, une thrombopénie et une diminution de la résistance aux infections.

3. Pathologies associées à la réactivation d'HHV-6 chez les transplantés

3.1. Receveurs de moelle osseuse (BMT)

De nombreuses études ont été conduites sur la réactivation d'HHV-6 chez les greffés médullaires et la prévalence de la virémie à HHV-6 apparaît plus élevée chez les receveurs BMT allogéniques qu'autologues. Les conditions pré-transplantation qui prédisposent au développement d'une virémie à HHV-6 post-transplantation sont le fait d'être atteint d'une leucémie ou d'un lymphome et de faibles titres en anticorps anti-HHV6 (Yoshikawa et al., 2002). La fréquence de détection est plus élevée pour l'ADN d'HHV-6 de type A dans le plasma que dans les leucocytes du sang périphérique (PBL) correspondant, alors que l'HHV-6B, qui est le type le plus fréquemment trouvé dans ce contexte, est détecté à des niveaux similaires dans ces deux compartiments (Nitsche et al., 2001). Une confirmation est nécessaire pour dire si chez ces patients, l'HHV-6A réactive à partir d'autres tissus que les PBL.

La réactivation d'HHV-6 peut être asymptomatique, pauci-symptomatique (Kadokia et al., 1996), ou contemporaine de différentes manifestations cliniques.

œ Encéphalite

Depuis ces dix dernières années, de nombreux cas d'encéphalite associée à la réactivation d'HHV-6 après greffe de moelle osseuse ont été décrits. Elle est généralement observée dans un délai de 20 à 100 jours post-transplantation, et l'implication d'HHV-6 est principalement confirmée par la positivité de la PCR dans le LCR des patients, qui peut être associée à la présence d'ADN du virus dans le sérum (MacLean et al., 2002), les PBMC et la moelle osseuse (Rieux et al., 1998), mais aussi après culture des PBL (Rapaport et al., 2002), et ceci en l'absence de toute autre étiologie. Un traitement antiviral par du Foscarnet (180 mg/j/kg), combiné ou non avec du Ganciclovir (10 mg/j/kg) et/ou de l'Aciclovir (10 mg/j/kg), apporte un pronostic favorable (Bethge et al., 1999 ; MacLean et al., 2002 ; Wang et al., 1999 ; Yoshida et al., 2002), mais l'issue peut également être fatale (Rapaport et al., 2002 ; Rieux et al., 1998 ; Tiacci et al., 2000 ; Wang et al., 1999).

œ Pneumopathie

Après transplantation médullaire, la corrélation entre la réactivation d'HHV-6 et une pneumonie a été initialement décrite par Carrigan et al. (1991) qui ont montré la présence du virus par immunohistochimie sur une biopsie pulmonaire et ont cultivé le virus à partir du lavage broncho-alvéolaire d'un patient. Puis d'autres auteurs ont corrélé la quantité d'ADN viral présent dans le tissu pulmonaire au risque de survenue d'une pneumopathie (Cone et al., 1993b). D'autres études conduites plus récemment (Buchbinder et al., 2000 ; Nishimaki et al., 2003) ont montré que la présence d'une infection active à HHV-6 (PCR positive ou présence d'HHV-6 au site inflammatoire) était associée soit à une pneumonie interstitielle, soit à une pneumonie idiopathique.

œ Retard de greffe et suppression médullaire

Au cours du premier mois post-transplantation de moelle osseuse ou après greffe de cellules souches hématopoïétiques, la détection d'HHV-6 par PCR, culture, immunofluorescence ou immunohistochimie a été associée à des retards de prises du greffon (Rosenfeld et al., 1995 ; Ljungman et al., 2000 ; Maeda et al., 1999, 2000).

L'HHV-6 est également une importante cause de suppression médullaire idiopathique après BMT (Drobyski et al., 1993 ; Carrigan et Knox, 1994). Les leucocytes sont la lignée cellulaire la plus couramment supprimée (83 %), suivis par les plaquettes (67 %) et les globules rouges (50 %) ; la dépression de plus d'une lignée de moelle osseuse peut avoir lieu pouvant conduire à un retard de sortie d'aplasie ou à une insuffisance médullaire (Singh et Carrigan, 1996). L'effet de la suppression médullaire par l'HHV-6 va d'une diminution transitoire à une myélosuppression chronique (Knox et Carrigan, 1996).

œ Fièvre et rash cutané

Après transplantation médullaire, deux études ont montré que 33 % des patients présentant un rash cutané associé à une forte fièvre avaient également une culture des PBMC positive pour HHV-6 (Yoshikawa et al., 1991 ; Frenkel et al., 1994), mais sans pouvoir mettre en évidence la présence d'HHV-6 dans des biopsies cutanées. Depuis, une étude rétrospective de biopsies cutanées pour rechercher la présence du génome d'HHV-6 et de PBMC pour mettre en évidence une infection active à HHV-6 par isolement du virus en culture a montré une corrélation entre l'infection à HHV-6 et le début du rash cutané (Yoshikawa et al., 2001).

œ Dommages de l'endothélium vasculaire

La micro-angiopathie thrombotique (TMA) est une des complications sérieuses de la greffe de moelle osseuse pour laquelle plusieurs facteurs peuvent être des agents étiologiques, dont les infections qui causent des dommages de l'endothélium vasculaire. Matsuda et al. (1999) ont rapporté deux cas de jeunes enfants avec une TMA après une chimiothérapie importante. Le développement de la TMA a été accompagné d'une réactivation de l'HHV-6, mise en évidence par une augmentation du nombre de copies de génome. L'infection active à HHV-6 des cellules de l'endothélium vasculaire pourrait induire la TMA via l'endommagement et l'activation de ces cellules, comme le fait le HCMV. Par la suite, l'impact de l'infection à HCMV et HHV-6 sur l'endothélium vasculaire après BMT a été recherché. Il a alors été montré que l'infection par l'un des deux virus cause un dommage de l'endothélium et que l'HHV-6 a un effet plus fort que le HCMV, de même que l'infection combinée a un effet plus fort qu'une infection virale unique (Takatsuka et al., 2003).

☞ La maladie du greffon contre l'hôte

La fréquence de détection d'une infection active à HHV-6 après BMT augmente avec la gravité de la GVH (Wilborn et al., 1994); HHV-6 a un rôle dans l'initiation et/ou l'augmentation de la GVH et la présence du virus dans des biopsies cutanées ou rectales est en relation avec la sévérité de la maladie (Appleton et al., 1995).

La réactivation d'HHV-6 a également été observée chez les receveurs de cellules souches (SCT). La fréquence de la détection d'une infection active à HHV-6 est de 42,5 %. La présence de l'ADN d'HHV-6 dans le sérum, de même qu'une charge virale élevée sont des facteurs de risque de développement d'une infection symptomatique à HHV-6 (Imbert-Marcille et al., 2000 ; Boutolleau et al., 2003). Les manifestations classiques d'HHV-6 sont alors retrouvées (Hentrich et al., 2005 ; Zerr et al., 2005).

3.2. Receveurs d'organes solides (SOT)

Les manifestations cliniques de la réactivation ou réinfection par HHV-6 chez les greffés d'organes solides sont similaires à celles décrites chez les BMT.

☞ Les transplantés rénaux

Après greffe de rein, la réactivation d'HHV-6 est fréquente, de 31 à 66 % (DesJardin et al., 1998) selon les auteurs et la méthode utilisée, et souvent asymptomatique. Cependant, la fièvre peut être concomitante d'une infection active à HHV-6 (Jacobs et al., 1994), de même la suppression médullaire (leucopénie sévère) a été observée (Morris et al., 1989). Il existe également des cas de dysfonctionnement ou de rejet du greffon (Acott et al., 1996 ; Okuno et al., 1990 ; Hoshino et al., 1995). L'implication d'HHV-6 a, dans ces cas, été mise en évidence soit par une augmentation significative du taux d'anticorps anti-HHV6, soit par la détection d'antigènes d'HHV-6 dans biopsies des greffon rénaux rejetés. Un cas de syndrome d'hémophagocytose réactionnel à HHV-6 a également conduit au rejet du greffon (Karras et al., 2004).

œ Les transplantés hépatiques

Le pourcentage d'infection à HHV-6 après greffe de foie est de 24 % (Dockrell et al., 1997) et les principales manifestations sont des cas de fièvre et de rash cutané (Singh et al., 1995 ; Yoshikawa et al., 1998). Des cas de suppression médullaire ont également été observés (Singh et al., 1995 et 1997), la cytopénie sévère ayant été associée à une pneumonie interstitielle chez un des patients. L'équipe de Lautenschlager (1998) a montré que l'infection à HHV-6 pouvait aussi conduire au dysfonctionnement, voire au rejet du greffon. Enfin, Paterson et al. (1999) ont rapporté une encéphalite caractérisée par des confusions, une migraine occipitale et des mouvements involontaires. L'association à HHV-6 a été faite après la détection du génome viral dans le LCR et l'isolement du virus par culture des PBMC.

œ Les transplantés cardiaques

Une seule étude a recherché une incidence de la réactivation d'HHV-6 après transplantation cardiaque ou cardio-pulmonaire (Jacobs et al., 2003). Aucun symptôme clinique n'a pu être associé à HHV-6, mais les patients présentant une réactivation d'HHV-6 avaient des taux de mortalité plus élevés que ceux sans réactivation et tous les patients décédés sont morts pendant l'infection active à HHV-6.

Chez les patients SOT, HHV-6 (seul ou avec l'HHV-7) peut aussi favoriser la maladie à HCMV (DesJardins et al., 1998 et 2001 ; Dockrell et al., 1997 ; Humar et al., 2002a et 2002b ; Ratnamohan et al., 1998) et à l'inverse une infection concomitante à HCMV aggrave les symptômes cliniques de l'infection à HHV-6 (Herbein et al., 1996). Enfin, les propriétés immunomodulatrices d'HHV-6 peuvent également déclencher la réactivation d'autres pathogènes opportunistes, telles que des infections fongiques (Dockrell et al., 1999 ; Rogers et al., 2000).

TRAVAIL EXPERIMENTAL

Partie 1 : Mise au point d'outil moléculaire permettant la détection d'une infection active à HHV-6

La première partie de mon travail expérimental a consisté à mettre au point des outils moléculaires de détection de la multiplication d'HHV-6 et plus particulièrement de sa réactivation. Dans un premier temps, une technique de quantification par PCR en temps réel utilisant la chimie des sondes d'hybridation a été mise au point pour déterminer simultanément les charges virales des virus HHV-6 et HCMV dans des échantillons potentiellement infectés par les deux virus. Dans un deuxième temps, une technique de RT-nested PCR couplée à une hybridation en plaque a été développée et a permis la détection de l'ARNm du gène U79/80 d'HHV-6. Initialement, l'objectif était de développer ses deux techniques, et de les évaluer sur les mêmes échantillons afin de voir laquelle était la plus informative. Pour cela chacun de ces deux tests a été appliqué à la détection de la réactivation d'HHV-6 chez des patients transplantés. En pratique, il s'est avéré difficile de conditionner les prélèvements des patients, en particulier pour la RT-PCR, et de mettre au point les deux méthodes de manière simultanée. Les deux techniques ont donc été développées l'une après l'autre, et n'ont donc pas pu être appliquées aux mêmes échantillons.

Cette première partie du travail expérimental a abouti à la rédaction de deux articles. Le premier "Multiplex real-time PCR assay for simultaneous quantification of human cytomegalovirus and herpesvirus-6 in polymorphonuclear and mononuclear cells of transplant recipients" est actuellement sous presse pour publication dans *Journal of Virological Methods*. Le deuxième article "A reverse transcription-nested PCR assay for HHV-6 mRNA early transcript detection after transplantation" est accepté pour publication dans *Journal of Virological Methods* (JVMOL-2005-507).

1. Développement d'une technique de quantification des virus HHV-6 et HCMV par PCR multiplex en temps réel

Le cytomégalovirus humain (HCMV) et l'herpèsvirus humain de type 6 (HHV-6) sont deux *β-herpesvirinae* capables d'infection productive chez les individus immunodéprimés par le SIDA, ou par un traitement immunosuppresseur post-transplantation par exemple. Ces infections peuvent alors être graves, voire mortelles. Afin de mettre en place un traitement adapté, le diagnostic d'une infection à HHV-6 et/ou à HCMV est nécessaire.

Ainsi, le HCMV et l'HHV-6 sont susceptibles de réactiver dans des contextes similaires, peuvent provoquer le même type de symptomatologie, comme nous allons le voir, et sont accessibles au même type de traitement. Il nous a semblé intéressant de développer une technique qui permette la quantification simultanée des deux virus.

Après une brève présentation du HCMV et des complications post-greffe qu'il entraîne, l'article n° 1 "Multiplex real-time PCR assay for simultaneous quantification of human cytomegalovirus and herpesvirus-6 in polymorphonuclear and mononuclear cells of transplant recipients" sera développé.

1.1. Le cytomégalovirus humain

1.1.1. Généralités

Le cytomégalovirus humain (HCMV) est responsable de la maladie des inclusions cytomégaliennes découverte au début du XXe siècle. Le virus a été isolé par trois équipes dans le milieu des années 50 (Smith, 1956 ; Rowe et al., 1956 ; Craig et al., 1957). Comme il l'a été évoqué précédemment, le cytomégalovirus humain (HCMV), ou herpèsvirus humain de type 5 (HHV-5), est lui aussi un *Herpesviridae*, membre de la sous-famille des *β-herpesvirinae*, dont il est par ailleurs le prototype. Les virions du HCMV ont la même structure générale que ceux d'HHV-6 : enveloppe externe, tégument, capsid et core qui contient l'acide nucléique. Le génome du HCMV est un double brin d'ADN linéaire d'environ 230 kpb composé d'un segment long (UL) et d'un segment court (US). Les segments UL et US sont encadrés par des séquences répétées nécessaires à la circularisation du génome lors de la réplication de l'ADN viral et la formation de 4 isomères de génomes. Le

schéma réplicatif du HCMV est identique à celui de l'HHV-6 et comporte les 3 étapes : IE, E et L (Mocarski et Courcelle, 2001). Plusieurs études ont montré que les précurseurs de la moelle osseuse sont un réservoir du HCMV. Le virus serait ensuite transmis aux monocytes du sang périphérique qui permettraient sa dissémination. Enfin la différenciation en macrophages des monocytes infectés de manière latente conduirait à la réactivation du HCMV et à une infection productive (Pass, 2001).

1.1.2. Epidémiologie, modes de transmission

Dans les pays développés, la séroprévalence du HCMV est de 30 à 70 %, mais elle atteint 100 % dans les pays en voie de développement (Pass, 1985 ; Sohn et al., 1991). La transmission nécessite un contact direct avec le virus infectieux, qui s'effectue majoritairement par la salive, mais le virus est aussi transporté par l'urine, les larmes, le sperme, le lait maternel et les sécrétions vaginales des individus infectés. Le HCMV peut également être transmis verticalement de la mère au fœtus ou de la mère à l'enfant, ainsi que par transfusion sanguine, transplantation d'organes ou de cellules souches hématopoïétiques (Pass, 2001).

1.1.3. Pathogenèse

Chez le sujet immunocompétent, la primo-infection est le plus souvent asymptomatique, notamment chez l'enfant, mais elle peut également se traduire par une fièvre isolée ou un syndrome mononucléosique dans 10 % des cas. Par contre, l'infection à HCMV peut être grave chez les individus immunodéprimés. Elle se manifeste par une rétinite et des ulcérations digestives au cours du SIDA. Les infections post-transplantations seront développées ultérieurement.

La transmission verticale mère-enfant est la première cause d'infections virales congénitales ou périnatales dans les pays développés. L'infection congénitale peut être asymptomatique ou présenter une forme sévère si la mère fait une primo-infection pendant la grossesse. La maladie des inclusions cytomégaliennes dans sa forme complète est rencontrée dans 1 à 5 naissances sur 10000, mais des tableaux moins complets surviennent chez environ 5 à 10% des fœtus infectés. La forme sévère se manifeste par des pétéchies, une hépatosplénomégalie et un ictère, mais aussi un retard de croissance intra-utérin, une microcéphalie associée ou non à des calcifications cérébrales et une prématurité. Elle est de mauvais pronostic et s'accompagne d'une forte mortalité. Les enfants survivants présentent un retard mental

associé à une surdité. Les formes moins sévères sont rencontrées chez 10% des fœtus et s'accompagnent d'une partie seulement des signes ou bien les enfants infectés ne présentent pas de signe à la naissance mais développent par la suite des troubles auditifs, une atteinte oculaire, dentaire et psychomotrice. L'infection périnatale peut être à l'origine d'une atteinte pulmonaire (Ranger-Rogez et al., 1999).

1.1.4. Infection à HCMV après transplantation

Malgré les traitements prophylactiques et la surveillance, le HCMV est une grande cause de morbidité et de mortalité dans les contextes d'immunosuppression pour prévenir le rejet de l'organe greffé. L'infection peut être due à la réactivation du virus latent chez le receveur, à une surinfection ou à une primo-infection par le virus du donneur. La réactivation du HCMV a généralement lieu 1 à 3 mois post-greffe et peut être suivie par des manifestations cliniques (maladie à HCMV) environ 15 jours plus tard (Meyers et al., 1990). Elle a lieu chez 30 à 50% des greffés allogéniques de moelle osseuse (BMT) et chez 20 à 60% des transplantés d'organes solides (SOT) (Sissons et Carmichael, 2002). Elle se manifeste par de la fièvre, une leucopénie et des malaises (Pass, 2001). En outre, chez les patients SOT (rein, foie, cœur...), des atteintes viscérales graves ont été observées : sténose artérielle rénale chez les greffés de rein, sténose artérielle coronaire accélérée chez les transplantés cardiaques et des hépatites chez les receveurs hépatiques (Sissons et Carmichael, 2002). Des symptômes gastro-intestinaux et des cas de rejet sont aussi régulièrement rapportés (Griffiths et al., 2000). Chez les receveurs BMT, la pneumonie reste la manifestation clinique la plus fréquente de la maladie à HCMV, avec une fréquence d'environ 15% et une mortalité entre 30 à 52% (Enright et al., 1993). Le HCMV peut également causer des ulcérations gastro-intestinales, des rétinites, une suppression médullaire ou une hépatite (Landolfo et al., 2003).

1.2. Recherche d'une infection active à HHV-6 et à HCMV

L'objectif de ce premier travail expérimental était de mettre au point une technique de PCR multiplex en temps réel permettant la quantification simultanée des génomes de l'HHV-6 (type A et/ou B) et du HCMV sur LightCycler 1.5 (Roche). Le LightCycler combine un thermocycleur rapide à air pulsé et un microspectrofluorimètre pilotés par un ordinateur qui permet l'acquisition de la fluorescence émise et le traitement en temps réel des données. Les données d'amplification sont recueillies au début de la phase exponentielle de la PCR, à l'opposé de la PCR conventionnelle où les produits amplifiés ne sont détectés qu'à la fin de la

réaction, pendant la phase de saturation. Le but de la technique de quantification développée ici est de pouvoir suivre la réplication de l'HHV-6 et du HCMV *in vitro* dans un modèle cellulaire de co-infection, mais aussi *in vivo* pour le suivi de patients transplantés infectés par l'un et/ou l'autre de ces virus.

1.3. Article n°1

Le but du travail présenté dans ce premier article était de pouvoir coupler dans une seule réaction la détection et la quantification des génomes d'HHV-6 et du HCMV dans différents compartiments cellulaires sanguins (cellules mononucléées et polynucléaires du sang périphérique) de patients inclus dans un protocole de suivi post-transplantation. Les patients testés étaient des greffés de moelle osseuse, de rein ou de cœur. Une corrélation entre la quantification et les symptômes cliniques manifestés par les patients a finalement été recherchée.

“Multiplex real-time PCR assay for simultaneous quantification of human cytomegalovirus and herpesvirus-6 in polymorphonuclear and mononuclear cells of transplant recipients”

Cet article est actuellement sous presse pour publication dans *J Virol Methods*, référence : VIRMET 9832.

L'objectif du travail présenté était de développer une technique de quantification simultanée en temps réel et de différenciation des *β-herpesvirinae* HHV-6 et HCMV. Après la mise au point, cet essai a été appliqué à de l'ADN extrait de cellules mononucléées et de polynucléaires isolés du sang périphérique de patients transplantés de cœur, de rein ou de moelle osseuse, puis comparée aux techniques de quantification déjà utilisées dans le laboratoire.

La technique a nécessité le choix de la chimie à utiliser (les sondes d'hybridation), des gènes à amplifier (UL83 pour le HCMV et U65 pour l'HHV-6), de couples d'amorces (CMVp65/F et CMVp65/R, HHV6/F et HHV6/R) et de sondes (CMVp65/Flu et CMVp65/LCRed705, HHV6/Flu et HHV6/LCRed640), ainsi que l'optimisation des conditions réactionnelles et du protocole d'amplification/quantification.

Seules les sondes d'hybridation permettent une quantification simultanée par PCR multiplex sur le LightCycler 1.5 en utilisant deux paires de sondes spécifiques de deux cibles (De Silva et al., 1998). La sonde donneuse de chaque couple (CMVp65/Flu et HHV6/Flu) est marquée par le même fluorophore, la fluorescéine dont la longueur d'onde d'émission $\lambda=530$ nm est détectée par le canal F1 du LightCycler. La sonde acceptrice de chaque couple (CMVp65/LCRed705 et HHV6/LCRed640) est quant à elle marquée par un fluorophore différent, LCRed705 et LCRed640 ayant des longueurs d'onde d'émission différentes $\lambda=705$ nm et $\lambda=640$ nm captées respectivement par le canal F3 et le canal F2 du LightCycler. Lorsque les deux sondes d'un même couple sont éloignées, le transfert d'énergie (FRET) de la sonde donneuse vers la sonde acceptrice ne peut se faire, et seule la sonde marquée à la fluorescéine émet une fluorescence après excitation. Lors de l'amplification, le couple de sondes s'hybride sur la séquence cible et le transfert d'énergie de la sonde donneuse vers la sonde acceptrice a lieu. La sonde marquée au LCRed émet alors une fluorescence qui est proportionnelle au nombre de séquence cible. A la fin de la réaction, l'analyse en F2/F1 permet donc de déterminer le nombre de copies d'HHV-6, alors que F3/F1 permet de déterminer la charge virale du HCMV.

Une recherche bibliographique a permis de choisir les gènes cibles pour la quantification de chaque virus. Comme l'ont rapporté Zal et son équipe (2000), les gènes codant les protéines du tégument sont spécifiques de chaque sous-famille d'herpèsvirus. Les gènes d'HHV-6 et du

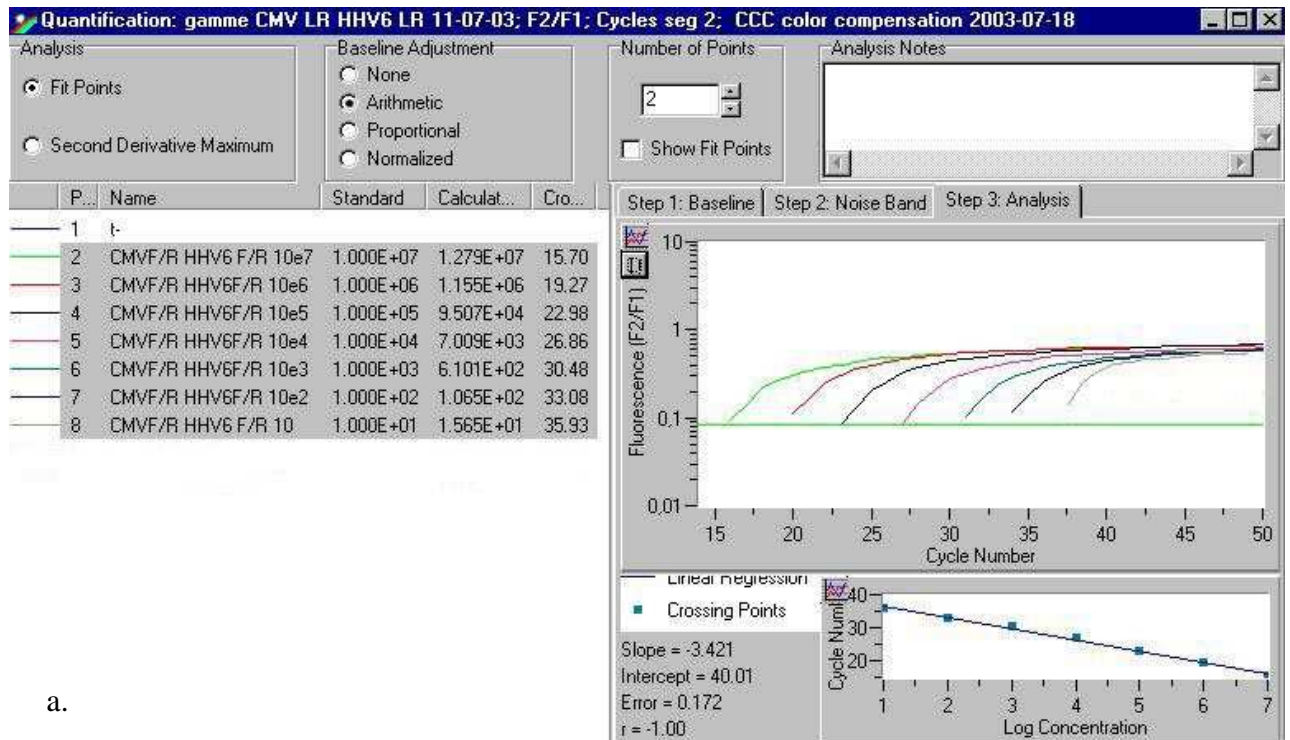
HCMV codant pour chacune de ces protéines ont donc été analysés pour sélectionner les plus spécifiques de chaque virus et les plus divergents entre ces deux virus. Le gène U65 d'HHV-6 et le gène UL83 du HCMV ont ainsi été choisis. Une coopération avec la société Tib-Molbiol a ensuite permis la sélection d'un couple d'amorces (CMVp65/F et CMVp65/R, HHV6/F et HHV6/R) et d'un couple de sondes (CMVp65/Flu et CMVp65/LCRed705, HHV6/Flu et HHV6/LCRed640) pour chaque virus.

Les conditions réactionnelles et les protocoles d'amplification ont dans un premier temps été établis séparément pour chaque virus (simplex), puis optimisés dans un deuxième temps pour quantifier les deux virus en même temps (multiplex). De même, des tests croisés ont été réalisés pour établir la gamme de standards externes. La meilleure courbe étalon a été obtenue avec une gamme contenant les plasmides en quantité égale. Des dilutions sériques de 10 en 10 du mélange 10^7 copies pCR2.1-HHV6FR + 10^7 copies pCR2.1-HCMVFR ont été réalisées jusqu'au mélange de 10 copies de chaque plasmide (Figure 12).

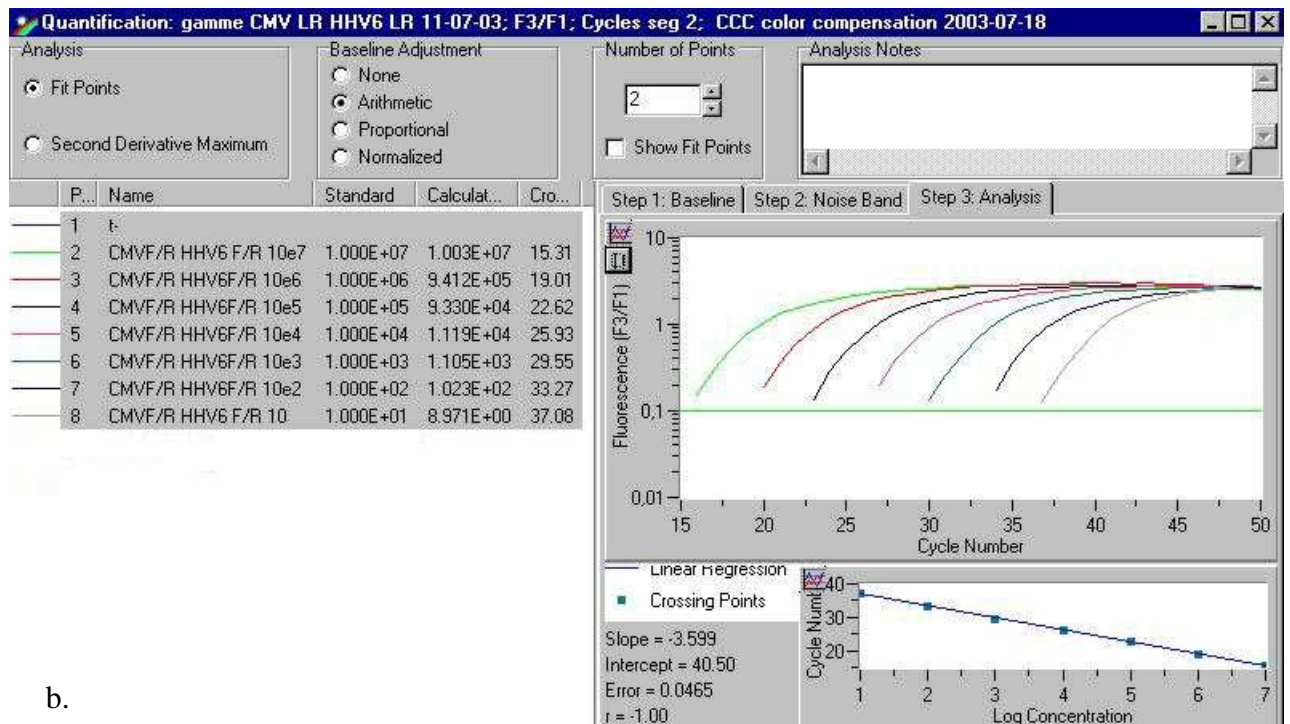
Les tests de sensibilité ont donné un seuil de détection de 10 copies de chaque plasmide par capillaire et les tests de sensibilité ont montré l'absence de réaction croisée avec les autres herpesvirus humain : le système mis au point pour le HCMV ne détecte que le HCMV et celui de l'HHV-6 ne détecte que l'HHV-6. La technique a également été trouvée reproductible entre les essais et au sein d'un même essai.

La mise au point étant faite, la technique a été appliquée à la quantification des génomes d'HHV-6 et du HCMV sur des ADN de patients suivis après transplantation de moelle osseuse, de rein et de cœur. Les ADN ont été extraits de différents compartiments cellulaires : les cellules mononuclées (PBMC) et les polynucléaires (PMNL) du sang périphérique. Ces prélèvements ont été testés préalablement pour la présence de l'un et/ou l'autre virus par une technique de PCR qualitative couplée à une hybridation en plaque (Desachy et al., 2001).

La comparaison avec les deux techniques de quantification déjà utilisées au laboratoire a montré une sensibilité de 100 % pour le HCMV par rapport à l'antigénémie et de 80,6 % pour l'HHV-6 par rapport à la méthode TaqMan (Collot et al., 2002). Il a également été établi que 100 copies de HCMV / μg d'ADN correspondait à la détection de 1 cellule positive par antigénémie.



a.



b.

Figure 12 : Résultats de la PCR quantitative multiplex

a. Analyse en F2/F1, spécifique d'HHV-6. b. Analyse en F3/F1, spécifique du HCMV.
Capillaire 1 : témoin négatif (eau distillée) ; Capillaires 2 à 8 : gamme étalon.

Une corrélation entre la quantification d'HHV-6 et/ou du HCMV et les manifestations cliniques associées à une infection active par ces deux virus a enfin été recherchée. Les résultats obtenus nous ont permis de montrer qu'une valeur de 100 copies / μ g d'ADN pouvait être significative de réactivation. Les réactivations symptomatiques étaient toujours associées à des valeurs > 500 copies / μ g, pour l'HHV-6 comme pour le HCMV.

Ainsi, aucun des receveurs de moelle osseuse testés n'a présenté de réactivation de ces virus et leur charge virale HHV-6 et/ou HCMV a toujours été trouvée inférieure à 100 copies / μ g d'ADN. ces patients étaient peu nombreux et inclus tardivement dans le suivi post-transplantation. Chez les greffés de rein, la réactivation d'HHV-6 a été observée chez 40% des patients, de même 40% des patients ont présenté une réactivation du HCMV. Dans ce groupe, un cas de rejet aigu a été observé, la quantification HHV-6 était alors supérieure à 4000 copies / μ g d'ADN et celle du HCMV était de 187 copies / μ g d'ADN. Deux neutropénies ont pu être associées à HHV-6. Les autres réactivations étaient asymptomatiques et les patients à risque pour une infection active à HCMV ont reçu un traitement prophylactique. Enfin, parmi les 4 patients transplantés cardiaques, 100% (4/4) ont eu une réactivation d'HHV-6 et 75% (3/4) du HCMV. Un rash et une neutropénie dus à HHV-6 ont été observés.

La technique de PCR multiplex quantitative en temps réel développée et présentée dans l'article 1, grâce à sa forte sensibilité (10 copies par capillaire), est un bon outil de détection de la multiplication d'HHV-6 et/ou du HCMV. Cette méthode peut être utilisée dans un but expérimental de suivi d'une infection *in vitro* ou peut être appliquée au suivi de patients receveurs de différents organes afin de détecter une réactivation. Le système développé est original : c'est la première fois qu'une telle méthode mise au point sur LightCycler utilise un couple d'amorces et un couple de sondes marquées différemment pour chaque virus. Deux techniques de PCR multiplex quantitative sur LightCycler ont pourtant été publiées précédemment. La première méthode, développée par Safronetz et al. (2003a), utilise un seul couple d'amorces amplifiant le gène de l'ADN polymérase virale (Johnson et al., 2000) et deux couples de sondes d'hybridation (Flu/LCRed 640 et Flu/LCRed 705) pour la quantification de l'HHV-6 et de l'HHV-7. Cependant, leur technique permet également d'amplifier le VZV. De plus, comme le reconnaissent les auteurs, leur système de typage par courbe de fusion peut distinguer qualitativement le type HHV-6A, HHV-6B ou HHV-7, mais ne peut permettre la quantification de ces virus dans les échantillons contenant des mélanges de populations. Enfin, la technique n'a été testée que sur les lymphocytes de 20 patients

transplantés de cellules souches (SCT), tous HHV-6B positifs et HHV-6A HHV-7 négatifs. La deuxième méthode (Aritaki et al., 2001) a également été appliquée à des receveurs SCT et met en jeu trois couples d'amorces et trois couples de sondes d'hybridation marquées par les mêmes fluorophores (Flu LCRed 640) pour la quantification des génomes d'HHV-6, du HCMV et de l'EBV, l'identification du virus se fait alors à l'aide d'une courbe de fusion. Cette technique a été appliquée à seulement 16 cas cliniques et nécessite un élargissement du panel de patients.

2. Développement d'une technique de RT-nested PCR couplée à une hybridation en plaque pour la détection de transcrits d'HHV-6

Afin de mettre en évidence la réplication d'HHV-6, nous avons mis au point une technique de RT-PCR permettant la détection d'ARNm associés à la multiplication du virus.

Les différents systèmes de RT-PCR et de détection des produits amplifiés seront donc envisagés brièvement, ainsi que les conditions retenues pour la technique développée ici. Enfin, l'article n°2 "A reverse transcription-nested PCR assay for HHV-6 mRNA early transcript detection after transplantation" sera présenté.

2.1. La RT-PCR

La technique de rétrotranscription-amplification génique (RT-PCR) est en fait une succession de deux étapes. L'étape de rétrotranscription consiste à synthétiser le brin complémentaire (ADNc) des ARN à partir d'une amorce oligonucléotidique, grâce à une enzyme à activité ADN polymérase ARN dépendante, la transcriptase inverse (reverse transcriptase). L'ADNc d'intérêt et donc par conséquent l'ARN messenger recherché, est ensuite amplifié au cours de la réaction de PCR.

Lors de la mise au point d'une technique de RT-PCR, différents paramètres doivent être préalablement pris en compte, dont le choix de l'ARN matrice et celui de l'amorçage.

La RT peut être réalisée à partir de deux types d'ARN matrice :

☞ L'ARN total est un mélange de tous les ARN présents au niveau cellulaire : les ARN messagers (ARNm), les ARN de transfert (ARNt) et les ARN ribosomiaux (ARNr), mais aussi éventuellement l'ARN génomique d'un virus à ARN. L'ARN total convient à la majorité des applications.

☞ Les ARN messagers peuvent être extraits avec un oligodT soit à partir de l'ARN total, soit par extraction directe. Ils représentent 3 à 5 % de l'ARN total et leur préparation est longue et coûteuse. Il y a également une perte de matériel à cause d'un

rendement faible, mais aussi à cause du mode d'obtention lui-même : les ARNm sans queue polyA et ceux partiellement dégradés sont éliminés.

Il existe également différents types d'amorçage. Le type d'amorçage choisi conditionne les caractéristiques des ADNc obtenus et doit être adapté à la nature de l'échantillon et aux objectifs poursuivis (Zhang et al., 1999).

☞ L'amorçage aléatoire est constitué par de courtes séquences oligonucléotidiques synthétisées de manière aléatoire et comprenant 6 nucléotides (hexamère). Ces amorces ont statistiquement une chance de se fixer sur l'ensemble des ARN présents dans la matrice. L'amorçage aléatoire est recommandé pour l'amplification de plusieurs cibles à partir de la même préparation d'ADNc.

☞ Les oligodT sont des oligonucléotides de synthèse composés en général de 12 à 18 T, capables de s'hybrider à la région polyA des ARNm. C'est le seul amorçage qui permet d'obtenir des ADNc pleine longueur à partir des ARNm, mais il est également possible d'obtenir des ADNc tronqués de leur partie 5' en cas d'ARNm de grande taille. Ce n'est donc pas le meilleur amorçage si les amorces de PCR sont choisies en position 5' du transcrit. De plus, les ARNm sans queue polyA, ainsi que ceux partiellement dégradés ne sont pas rétrotranscrits.

☞ L'amorçage spécifique fait intervenir une amorce spécifique du transcrit recherché localisée en 3' de la région d'intérêt. Il limite la RT à un transcrit donné.

Au cours de l'étape de RT il est également possible d'ajouter des inhibiteurs de RNases qui inhibent les RNases A, B et C.

Une fois les ADNc simple brin synthétisés, la cible est amplifiée par PCR à l'aide d'amorces spécifiques du transcrit recherché. Au cours de cette étape, il peut être intéressant de réaliser un contrôle d'amplification sans RT. Ceci permet de s'assurer que les cibles amplifiées sont bien issues de la RT et non d'ADN résiduels contaminants. En cas d'amplification positive ou à titre préventif, une étape de traitement à la DNase I peut être réalisée afin d'éliminer toute trace d'ADN contaminant.

2.2. Détection des produits amplifiés

La mise en évidence des produits de PCR est le plus souvent réalisée après migration sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium (BET). Ce composé est un agent intercalant qui se fixe au double brin d'ADN. Ce dernier, ainsi marqué, est révélé par la fluorescence orange émise par le BET après trans-illumination aux ultraviolets (UV). L'intensité du signal observé est alors proportionnelle à la quantité de produit amplifié. Cette méthode est cependant peu spécifique, puisque tous les ADN double brin sont révélés, et reste peu sensible.

Les techniques d'hybridation permettent d'augmenter la spécificité et la sensibilité. Ces hybridations peuvent être réalisées sur membrane ou en microplaque. Dans les deux cas, il est nécessaire de choisir une sonde capable de s'hybrider à l'intérieur du produit amplifié recherché. Un des inconvénients de l'hybridation sur membrane de type Southern est sa longueur. En effet après la migration sur gel, les ADN doivent être transférés sur une membrane, puis hybridés avec la sonde spécifique qui est ensuite révélée par autoradiographie (Sambrook et al., 1989). Par contre, l'hybridation en microplaque est beaucoup plus rapide et est également 100 fois plus sensible que la technique de Southern blot. Le principe de la technique développée par le laboratoire Roche et appliquée dans cet article est présenté dans la figure 13. Il combine une PCR au cours de laquelle la séquence cible est marquée à la digoxigénine® (PCR-ELISA, Dig Labeling) (Figure 13a) à une révélation en milieu liquide (PCR-ELISA, Dig Detection) (Figure 13b).

2.3. La RT-nested PCR HHV-6 U79/80

Au moment de la mise au point de la technique sur des cultures d'HHV-6, nous avons choisi de travailler sur des ARNm, plusieurs coffrets d'extraction ont donc été testés : le FastTract mRNA isolation kit (Invitrogen), le μ MACS™ mRNA isolation kit (Miltenyi Biotec), l'Oligotex direct mRNA isolation kit (Qiagen). Le premier coffret était long à mettre en œuvre et donnait un faible rendement d'extraction, le deuxième était quant à lui rapide, mais la quantité d'ARNm obtenue en fin d'extraction était là aussi trop faible. Enfin, le coffret d'extraction d'ARNm commercialisé par Qiagen donnait de bons rendements pour les ARNm extraits des cellules infectées par HHV-6, mais ce rendement était faible lorsque les ARNm étaient extraits directement du sang. Nous avons donc finalement choisi de travailler sur de l'ARN total extrait de cultures infectées ou directement de sang total dans le cas de patients et

opté pour le QIAamp RNA blood mini kit (Qiagen), coffret recommandé par le fabricant pour ce type d'échantillon.

Par la suite, nous avons opté pour un amorçage aléatoire à l'aide de l'Hexanucleotide Mix de Roche. En effet, nous voulions effectuer une amplification de l'ARNm du gène cellulaire de la β -actine afin de vérifier chaque étape de la technique. Or seul un amorçage aléatoire avec des hexamères permet d'amplifier différents ADNc à partir de la même réaction de rétrotranscription.

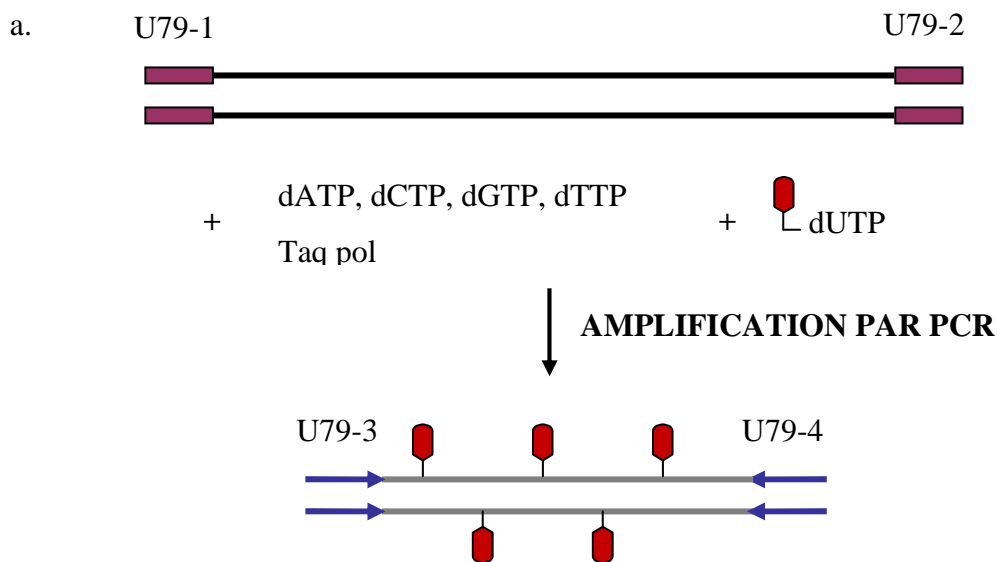
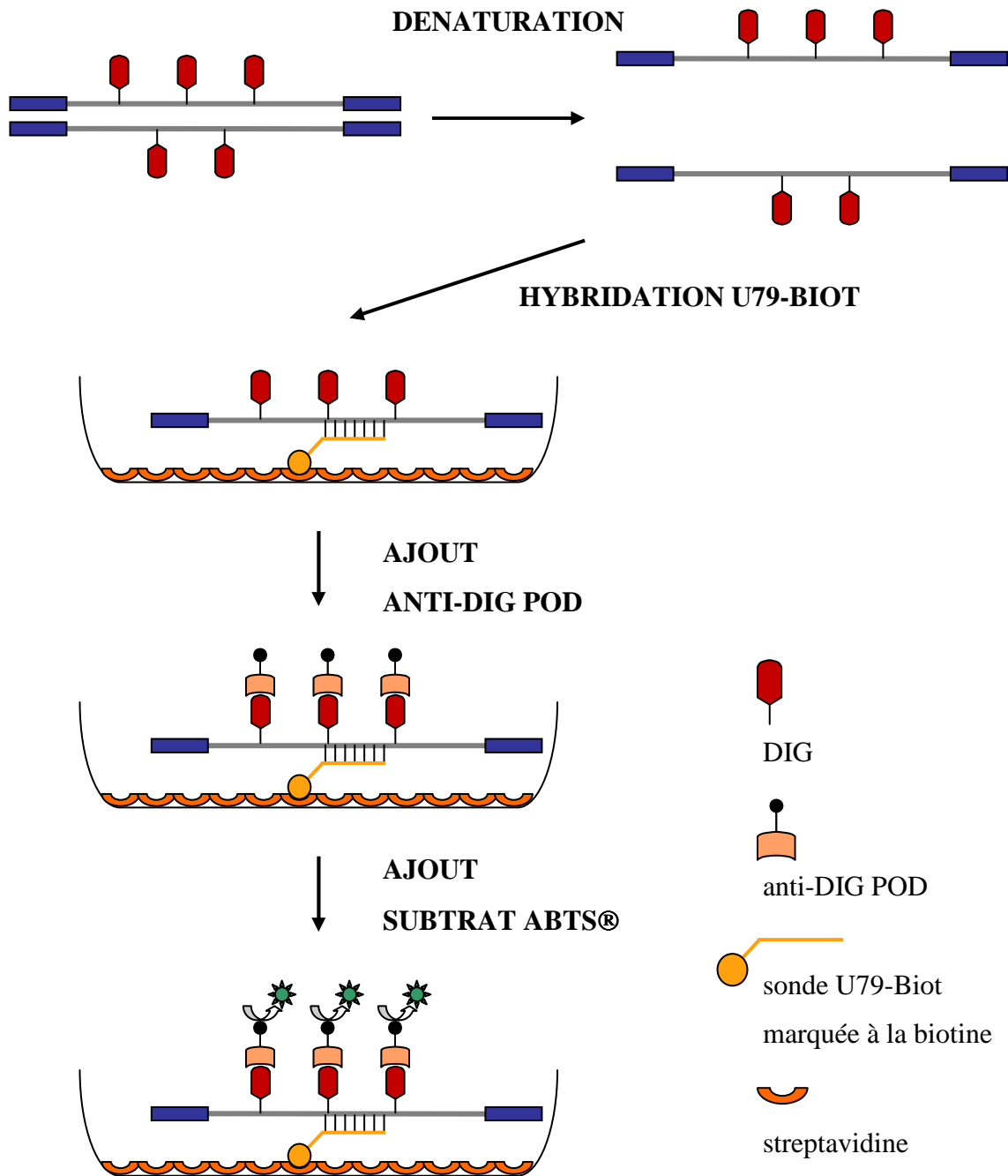


Figure 13 : Les coffrets PCR-ELISA Dig-Detection et Dig-Labeling (Roche)

a. Au cours de la réaction de PCR-ELISA Dig-Labeling, les produits amplifiés sont marqués à la digoxigénine (Dig) par l'incorporation de DIG-dUTP présent en faible quantité dans le mélange réactionnel. b. Les produits d'amplification sont dénaturés, puis incubés sous agitation douce pendant 3 heures à la température d'hybridation de la sonde U79-Biot. Durant cette étape, la sonde marquée à la biotine se fixe à la streptavidine du fond de la microplaque. Une série de lavages élimine les produits non hybridés puis un anticorps anti-Dig couplé à la peroxydase (Anti-DIG POD) est ajouté et incubé 30 minutes à 37 °C. Une nouvelle série de lavages est réalisée et le substrat (ABTS®) de l'enzyme est ajouté. Une incubation de 30 min à 37 °C et à l'obscurité permet le développement d'une coloration verte. Pour finir, une mesure de la densité optique (DO) est effectuée à une longueur d'onde de 405 nm. Les puits ayant une DO supérieurs à 0,2 sont considérés comme positifs.

b.



Les ADNc synthétisés lors de la RT ont ensuite été amplifiés par nested-PCR :

- ☞ La PCR externe a été réalisée avec la Taq polymérase de Qiagen en utilisant les amorces U79-1 et U79-2.
- ☞ La PCR interne a été réalisée avec le coffret PCR-ELISA, Dig-Labeling de Roche, en utilisant les amorces U79-3 et U79-4.

Les produits amplifiés lors de la PCR interne ont finalement été détectés avec le coffret PCR-ELISA, Dig-detection de (Roche) en utilisant la sonde U79-Biot. Ces coffrets PCR-ELISA ont été choisis car ils sont sensibles, spécifiques, faciles d'emploi et d'interprétation.

Les publications concernant des techniques de RT-PCR utilisées pour mettre en évidence la réactivation d'HHV-6 ont montré que la détection des ARNm U79/80 étaient un bon moyen de mettre en évidence une infection active à HHV-6 (Kondo et al., 2002 ; Sashiara et al., 2002). La mise au point d'une RT-PCR permettant de détecter ces transcrits a donc été décidée.

2.4. Article n°2

L'objectif de ce deuxième travail était de mettre au point une technique de RT-PCR permettant de mettre en évidence une infection active à HHV-6. Dans un premier temps, cette technique devait être sensible et montrer à la fois la réactivation de l'HHV-6 de type A et/ou de type B. Puis dans un deuxième temps, une fois la mise au point terminée sur de l'ARN extrait de cellules infectées par HHV-6, cette technique devait pouvoir être appliquée à la détection d'ARNm d'HHV-6 associés à la réactivation virale directement à partir du sang total de patients inclus dans le même protocole de suivi post-transplantation. Une association entre les manifestations cliniques observées chez les patients et la positivité de la réaction a enfin été recherchée.

“A reverse transcription-nested PCR assay for HHV-6 mRNA early transcript detection after transplantation”

accepté pour publication à *J Virol Methods*

n° : JVMOL-2005-507

L'avantage de la mise en évidence de transcrits associés à une infection active à HHV-6 est la non-obligation de déterminer un seuil limite. Diverses techniques de détection d'ARNm d'HHV-6 associés à la réactivation ont été publiées (Tableau IV). L'analyse de ces différentes publications nous a amenés à choisir la détection des transcrits du gène U79/80. La fonction des produits de ce gène n'est pas encore clairement établie, mais ils participent à la réplication de l'ADN viral : ils sont co-localisés à la machinerie de réplication de l'ADN viral. De plus, *in vitro* leurs ARNm sont retrouvés en quantité abondante durant la phase précoce d'une infection (Taniguchi et al., 2000). Par la suite, Kondo et al. (2002) ont rapporté que ces transcrits étaient abondamment exprimés dans les monocytes/macrophages de patients en phase aiguë d'exanthème subit, mais n'étaient pas détectés au cours de la phase de convalescence, même lorsqu'une RT-nested PCR était réalisée. De même, Sashihara et al. (2002) ont montré que la détection de ces transcrits était corrélée aux manifestations cliniques de la réactivation d'HHV-6 chez les greffés de cellules souches de sang de cordon (CBSCT) et était concomitante de la détection de l'ADN d'HHV-6 dans le plasma.

Références	ARNm	Prélèvements biologiques	Contextes cliniques
Norton et al., 1999	U100	PBMC	ES
Chuh et al., 2002	U91	PBL	GCS
Sashihara et al., 2002	U79/80	Sang total	CBSCT
Kondo et al., 2002a	U79/80	Mo/M ϕ	ES
Chapenko et al., 2003	U67	PBMC	SEP
Andre-Granier et al., 2003	U100	cultures de cellules MT-4 infectées par HHV-6B souche HST	
Yoshikawa et al., 2003	U31, U39, U90, U94	PBMC	ES

Tableau IV : Les différentes techniques de RT-PCR HHV-6.

PBMC : cellules mononucléées du sang périphérique ; PBL : leucocytes du sang périphérique ; Mo/M ϕ : monocytes/macrophages. GCS : syndrome de Gianotti-Crosti ; ES : exanthème subit ; SEP : sclérose en plaque ; CBSCT : receveurs de cellules souches de sang de cordon.

A l'aide du logiciel GeneWorks 2.5, les amorces décrites dans ces deux publications ont été testées pour leur capacité à amplifier toutes les souches d'HHV-6. Or ces amorces ne nous ont pas donné satisfaction : les différents couples d'amorces décrits avaient été développés sur les souches d'HHV-6B ne s'hybridant que partiellement avec le type A, et chaque couple présentait également une forte différence de température d'hybridation, diminuant ainsi le rendement de la PCR. Nous avons donc choisi un nouveau système. Après alignement des régions U79/80 des trois souches de référence séquencées et publiées (HHV-6A U1102, HHV-6B HST et HHV-6B Z29), les amorces présentées dans l'article ont été choisies, puis testées pour leur spécificité à amplifier HHV-6 de type A ou B et non un autre organisme (autre herpèsvirus, autre virus...).

Les ARN étant fragiles et facilement dégradés, ils doivent être extraits et manipulés en prenant de multiples précautions. Il faut que les cellules soient lysées en présence d'agent dénaturant les RNases. Par exemple, le β -mercaptoéthanol rompt les ponts disulfures des protéines qui se retrouvent alors sous une forme non fonctionnelle et ne sont plus actives. Il est également important de travailler le plus rapidement possible et dans la glace, en portant des gants et en utilisant un matériel traité contre les RNases ou spécialement adapté au travail de l'ARN. Toutes ces précautions ont été appliquées et de nombreux contrôles ont été réalisés.

Une fois la technique validée sur des ARN extraits de cellules infectées par l'HHV-6, elle a été appliquée aux ARN extraits du sang total des patients transplantés. Les premiers essais se sont montrés infructueux : aucun prélèvement n'a été trouvé positif après que de nombreux échantillons ont été testés. Afin d'augmenter la sensibilité, le couple d'amorces externes a été établi et la RT-nested PCR a été mise au point puis utilisée. Nous avons alors augmenté le nombre de précautions et de contrôles : lors de la distribution des produits de première amplification, les gants ont été changés entre chaque tube et des contrôles négatifs (eau distillée) ont été intercalés dans les différentes séries pour vérifier l'absence de contamination. Dans ce cas, l'ARNm U79/80 d'HHV-6 a été détecté dans des prélèvements. La recherche d'une corrélation entre la positivité de la réaction et la symptomatologie de la réactivation d'HHV-6 a enfin été recherchée. Il a alors été observé que des diarrhées étaient souvent concomitantes de la détection des transcrits d'HHV-6.

A terme, il serait intéressant de pouvoir comparer la technique développée ici avec d'autres techniques de détection d'ARNm déjà établies. Il serait également possible d'améliorer cette

RT-nested PCR en déterminant le nombre de copies d'ARNm U79/80 à l'aide d'une PCR quantitative en temps réel.

Partie 2 : Rôle du facteur de transcription NF- κ B dans la réplication d'HHV-6

Après la mise au point d'outils de détection de la réplication d'HHV-6, la deuxième partie de ce travail de thèse a eu pour but de mieux comprendre les mécanismes moléculaires encore inconnus qui permettent la rupture de la latence d'HHV-6 et qui aboutissent à la réactivation du virus.

Plusieurs publications ont suggéré que le locus IE-A d'HHV-6 pourrait jouer un rôle dans le processus de réactivation virale. Cette réactivation pourrait mettre en jeu le facteur de transcription NF- κ B dont plusieurs sites de liaison sont retrouvés dans la région R3 située en amont du locus IE-A. Dans cette partie du travail de thèse, nous avons étudié l'influence du facteur de transcription NF- κ B sur la multiplication du virus HHV-6. Cette deuxième partie fait actuellement l'objet d'une publication soumise à *Journal of General Virology*.

Après une présentation de la voie de signalisation du facteur de transcription NF- κ B, un rappel bibliographique des publications suggérant un rôle de ce facteur de transcription dans la réactivation d'HHV-6 sera fait. Enfin, l'article n°3 "Impairment of NF- κ B signaling decreases IE gene transcription and HHV-6 type A replication" sera présenté.

1. Les facteurs de transcription NF- κ B

La famille des facteurs de transcription NF- κ B est impliquée dans le contrôle d'un grand nombre de processus cellulaires, tels que les réponses immunitaires, l'inflammation, les processus de développement, la croissance cellulaire et l'apoptose (Ghosh et Karin, 2002 : Karin et Lin, 2002). Dans les cellules de mammifères, NF- κ B constitue une famille de facteurs de transcription qui comprend cinq sous-unités :

- 1) les transactivateurs RelA (p65), RelB et c-Rel
- 2) les sous-unités NF κ B1 (p50 et son précurseur p105) et NF κ B2 (p52 et son précurseur p100)

En position N-terminale, ces 5 sous-unités ont en commun un domaine RHD (Rel Homology Domain) d'environ 300 acides aminés (Figure 14). Ce domaine comprend les propriétés de

liaison à l'ADN (DLA) et de dimérisation (DD). Par contre, seules les protéines transactivatrices Rel possèdent à leurs extrémités C-terminales, un domaine de transactivation (DT) qui permet l'activation des gènes sous le contrôle de NF- κ B (Ballard et al., 1992). Contrairement aux protéines Rel, p50 et p52 sont synthétisées sous formes de précurseurs de grande taille, respectivement p105 et p100, qui doivent subir une maturation par le protéasome : il y a dégradation sélective des extrémités C-terminales qui contiennent des répétitions ankyrine (Xiao et al., 2004).

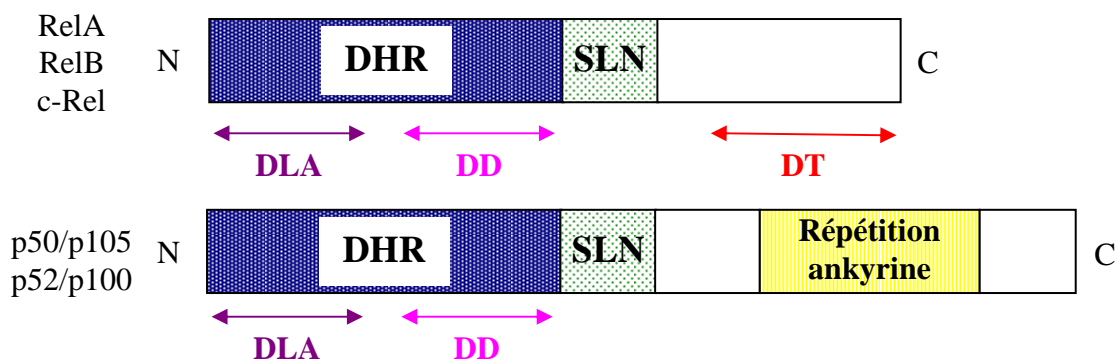


Figure 14 : Structure des sous-unités NF- κ B

DHR : domaine d'homologie à Rel ; SLN : séquence de localisation nucléaire ; DLA : domaine de liaison à l'ADN ; DD : domaine de dimérisation ; DT : domaine de transactivation

La forme prototype de la voie canonique de NF- κ B est un hétérodimère inducible composé des sous-unités p50 et p65. L'activité de NF- κ B est étroitement régulée par l'interaction avec les protéines inhibitrices I κ B : I κ B α , I κ B β , I κ B γ et I κ B ϵ (Ghosh et al., 1998). Ainsi, dans les cellules non stimulées, le dimère p50-p65 est séquestré dans le cytoplasme par I κ B α , ce qui masque la séquence de localisation nucléaire (SLN) et le domaine de liaison à l'ADN (Baeurle et Baltimore, 1989). Après stimulation des cellules, le complexe de kinases IKK (I κ B kinases) est activé. Ce complexe est composé d'au moins trois sous-unités distinctes : IKK α , IKK β qui sont des sous-unités régulatrices et IKK γ qui est une sous-unité catalytique (Rothwarf et Karin, 1999). Le complexe IKK phosphoryle alors I κ B α sur deux résidus sérine (Ser-32 et Ser-36) situés en N-terminal. Cette phosphorylation est le signal pour la polyubiquitination de I κ B α et sa dégradation par le protéasome (Whiteside et al., 1995). Le complexe NF- κ B est alors libéré et sa SLN étant démasquée, il transloque dans le noyau où il

se lie aux sites spécifiques κB (Figure 15). La séquence consensus de ces sites κB est 5'-gggRNNYYCC-3' (où R = purine et Y = pyrimidine). NF- κB induit la transcription de nombreux gènes parmi lesquels les gènes de :

∞ Cytokines : l'IL-1 α (Mori et Prager, 1996), l'IL-1 β (Hiscott et al., 1993), l'IL-2 (Lai et al., 1995), l'IL-6 (Libermann et Baltimore, 1990), l'IL-8 (Kunsch et Rosen, 1993), le TNF- α (Collart et al., 1990), le TNF- β (Messer et al., 1990)...

∞ Récepteurs de cytokines : CCR5 (Liu et al., 1998), l'IL-2R (Ballard et al., 1988), TNF-R (Santee et Owen-Schaub, 1996)...

∞ Molécules d'adhésion : ICAM-1 (van de Strople et al., 1996), ELAM-1 (Schinder et Baichwal, 1994)...

Un des gènes cibles activés par NF- κB est celui qui code pour I $\kappa B\alpha$. L'I $\kappa B\alpha$ nouvellement synthétisée pénètre dans le noyau où elle se lie à NF- κB et le complexe I $\kappa B\alpha$ -p50-p65 est exporté vers le cytoplasme (Arenzana-Seidedos et al., 1995).

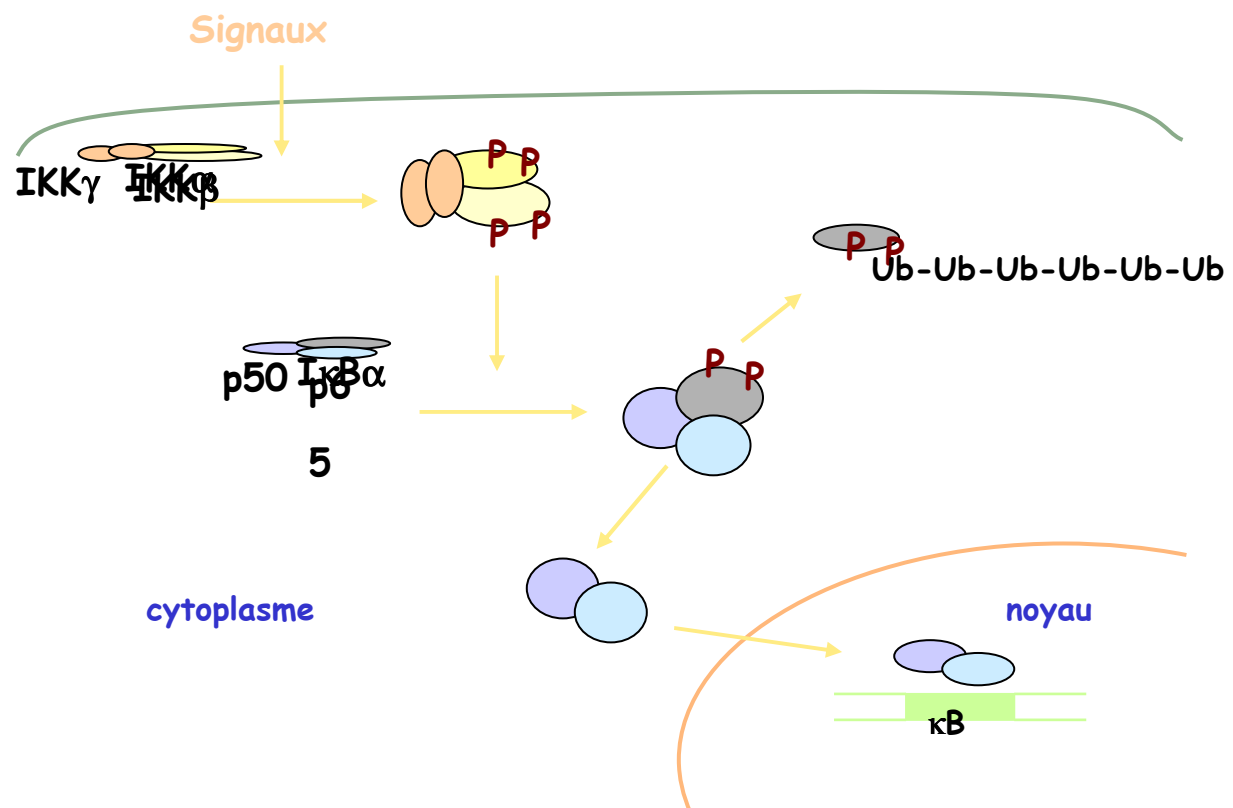


Figure 15 : La voie canonique de la signalisation NF- κB

L'activation du complexe IKK phosphoryle IκBα qui est dégradée. NFκB ainsi libéré entre dans le noyau et active l'expression de gènes.

Ainsi, une étape clef pour contrôler l'activité de NF-κB est la régulation de l'interaction IκBα-NFκB : si IκBα ne peut plus être phosphorylée et donc dégradée, NF-κB reste séquestré dans le cytoplasme et ne peut plus intervenir comme facteur de transcription dans le noyau. Une forme « super-répresseur » de NF-κB, l'IκBα mutée (IκBαMut), a été créée (Whiteside et al., 1995). Cette protéine IκBα est mutée sur les sites de phosphorylation par le complexe IKK : les deux sérines en position 32 et 36 sont remplacées par deux alanines. L'IκBαMut est donc constitutivement liée à NF-κB.

La voie dite non-canonique de NF-κB implique le complexe p100-RelB (Figure 16). Alors que la maturation de p105 est constitutive et co-traductionnelle (Lin et al., 1998), celle de p100 est étroitement régulée par sa phosphorylation inductible et son ubiquitination (Xiao et al., 2001). L'induction de la phosphorylation de p100 et sa maturation passent par NIK (NFκB-inducing kinase) et IKKα (Senftleben et al., 2001), et non par IKKβ et IKKγ. La voie NF-κB spécifique de NIK/IKKα ne peut être stimulée par la plupart des inducteurs de la voie classique, mais répond plutôt aux signaux impliqués dans la maturation des cellules B et l'organogenèse lymphoïde, tels que la lymphotoxine-β (LT-β), le facteur activant les cellules B (BAFF) et le ligand CD40 (Xiao et al., 2001).

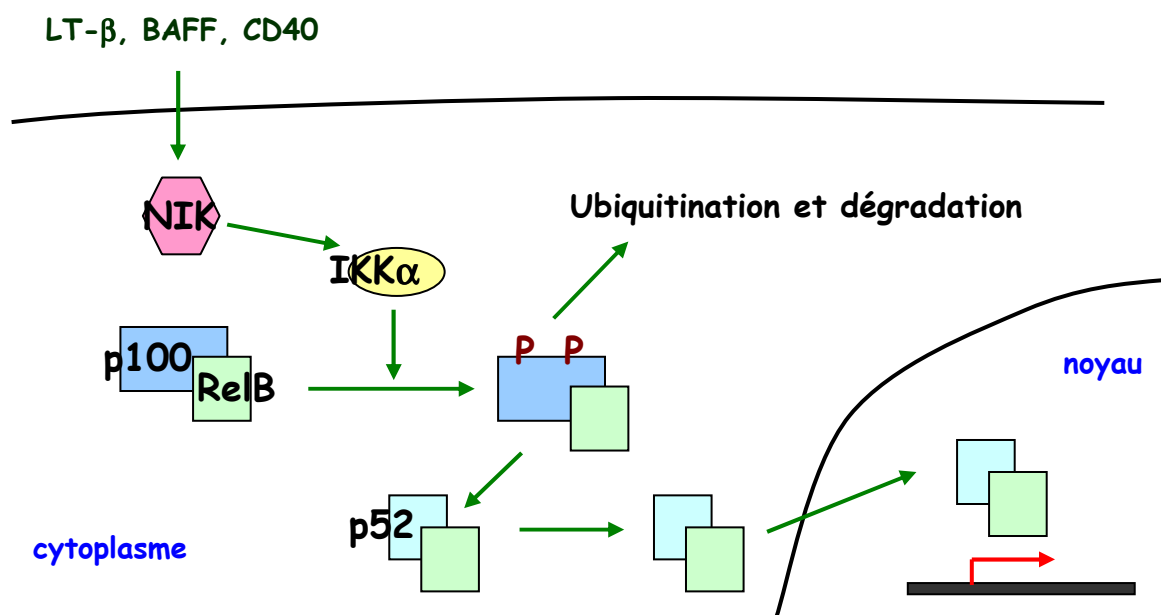


Figure 16 : La voie non canonique de NF-κB

L'activation de NIK (NF κ B-inducing kinase) active IKK α qui phosphoryle p100. La maturation de p100 donne p52. Le dimère p52-RelB transloque dans le noyau où il active la transcription.

2. Arguments en faveur du rôle de NF- κ B dans la stimulation des gènes IE

Depuis la publication des séquences des souches de référence HHV-6A (U1102), HHV-6B (HST) et HHV-6B (Z29), il est établi que la région interne répétée R3 du génome viral est composée de répétitions en tandem contenant des sites *KpnI*. Ainsi, ont été identifiées 28 copies d'un élément de 110 pb sur la souche U1102 (Gompels et al., 1995), 26 copies d'une répétition de 103 à 105 pb sur Z29 (Dominguez et al., 1999) et 24 copies d'une séquence de 104 à 107 pb sur HST (Isegawa et al., 1999). Cette région R3 est localisée en amont du locus IE-A d'HHV-6 qui s'étend de U86 à U91 (Figure 17). Le locus IE-A possède la séquence la plus divergente entre les deux types d'HHV-6 et serait probablement responsable d'une partie des différences biologiques entre HHV-6A et HHV-6B (Dominguez et al., 1999). Ce locus IE-A est l'homologue de position du locus IE majeur (MIE) du HCMV et code deux protéines, IE1 et IE2, correspondant respectivement aux ORF U89 et U86/87. Ces deux protéines sont exprimées à partir d'ARNm épissés et contiennent chacune un exon dérivé du gène U90 (Nikolaou et al., 2003 ; Papanikolaou et al., 2002). Les protéines IE1 et IE2 possèdent des propriétés transactivatrices (Martin et al., 1991).

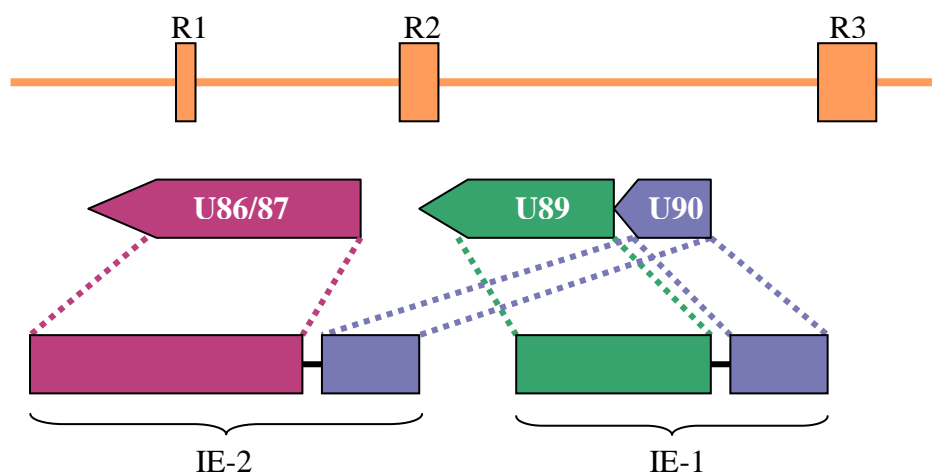


Figure 17 : Le locus IE-A d'HHV-6A souche U1102

Les régions répétées R1, R2 et R3 sont figurées. Les protéines IE-1 et IE-2 correspondent respectivement aux ORF U90/89 et U90/U86-87 (D'après Papanikolaou et al., 2002).

La région R3 contient également des séquences régulatrices en cis qui doivent jouer un rôle dans la régulation transcriptionnelle du locus IE-A, notamment des sites de liaison pour les facteurs de transcription cellulaires PEA3, NF- κ B et AP2 (Dominguez et al., 1999). Or chez le HCMV, il a été montré que le facteur de transcription NF- κ B active le promoteur MIE (Cherrington et Mocarski, 1989 ; Sambucetti et al., 1989), dont la région promotrice contient des sites de liaison pour NF- κ B. Une autre étude a rapporté que la région R3 est impliquée dans l'activation du promoteur du gène IE U95 par interaction avec NF- κ B (Takemoto et al., 2001). Au vu de ces travaux, l'hypothèse que NF- κ B soit un stimulateur de la transcription des gènes IE d'HHV-6 et donc de la multiplication du virus a été avancée.

3. Article n°3

Afin de vérifier notre hypothèse, le blocage de la voie de transduction du signal de NF- κ B a été réalisé en faisant exprimer le super-répresseur I κ B α Mut par transfection de cellules HSB-2 permissives à la croissance d'HHV-6A souche GS. Les cellules HSB-2 transfectées par I κ B α Mut ont été infectées de manière synchrone avec des virions HHV-6A GS. Une analyse quantitative des transcrits de plusieurs gènes IE par PCR en temps réel et de la multiplication du virus par immunofluorescence a été menée et les résultats ont été comparés à ceux obtenus en absence d'I κ B α Mut, c'est-à-dire lorsque NF- κ B peut jouer son rôle de facteur de transcription.

“Impairment of NF- κ B signaling decreases IE gene transcription and HHV-6 type A replication”

soumis à *J Gen Virol*

n° de soumission : JGV paper 81222

Afin de mettre au point la transfection des cellules HSB-2, le pGL3 control vector (Promega), qui code le gène de la *Renilla* luciférase a dans un premier temps été utilisé. Plusieurs rapports ADN/agent transfectant ont été testés, de même que plusieurs agents transfectants (Superfect et Effecten de Qiagen, FuGENE 6 de Roche). Le maximum d'activité luciférase, mesurée avec le Dual Luciferase assay system (Promega) après 24 h de transfection a été obtenu avec le FuGENE6 et le rapport 2 µg d'ADN / 3 µl de FuGENE6. Cette condition a ensuite été utilisée pour une co-transfection pGL3-IκBαMut et nous a donné une bonne expression de luciférase. Nous avons donc choisi de transférer 2 µg de plasmide IκBαMut avec 3 µl de FuGENE6. Après transfection, l'expression de la protéine IκBαMut a été vérifiée par GeneScan : la mutation de l'IκBα cellulaire (IκBαC) en IκBαMut entraîne l'apparition sur l'ADNc d'un site de restriction *NaeI* qui n'est pas retrouvé sur l'IκBαC. Après PCR avec une amorce marquée par FAM et migration en capillaire, l'expression de IκBαMut donne un pic de 100 pb contre 150 pb pour l'IκBαC.

La capacité de IκBαMut à bloquer NF-κB dans le cytoplasme a été testée par une technique de gel retard (EMSA) en utilisant une sonde κB marquée à la digoxigénine (Roche). La fixation de NF-κB sur κB-DIG entraînait alors un retard sur gel. Cette spécificité de liaison a été contrôlée avec un excès de sonde κB non marquée et de sonde AP-1 non marquée. Dans le premier cas, la fixation de NF-κB sur κB non marquée conduisait à la réversion de la liaison et aucun retard n'était observé, alors que dans le deuxième cas l'excès de sonde AP-1 non marquée ne réversait pas ce retard. Le dimère NF-κB a été identifié en ajoutant de l'anticorps anti-p50 ou anti-p65 à la réaction de liaison. La fixation de ces anticorps au complexe NFκB-κB entraînait alors un "super-retard". Les résultats nous ont permis de conclure que lorsque l'IκBαMut était exprimée, NF-κB était principalement dans le cytoplasme, et que NF-κB impliquée était un hétérodimère p50-p65. Une analyse par western blot a permis de vérifier que lors de la préparation des extraits nucléaires et cytoplasmiques nécessaires à l'EMSA, les extraits nucléaires ne contenaient pas de protéines du cytoplasme et réciproquement. Ainsi, la

protéine GAPDH spécifique du cytoplasme n'a été détectée que dans les extraits cytoplasmiques, alors que la protéine histone H1 spécifique du noyau n'était, quant à elle, présente que dans les extraits nucléaires.

La méthode de quantification des ARNm IE a nécessité le clonage des 4 gènes d'intérêt pour l'établissement des gammes de standards externes. En parallèle, les techniques de quantification des ARNm ont été optimisées en faisant varier les conditions réactionnelles et les protocoles d'amplification-quantification, de manière à n'obtenir en fin de réaction que les produits amplifiés spécifiques de nos transcrits et non des dimères d'amorces. La présence de ces dimères pourrait alors fausser les résultats en fixant eux aussi le SYBR Green I utilisé pour la quantification ; le nombre de copies déterminé serait alors erroné. Après les premiers essais sur le LightCycler, il est également apparu nécessaire de rajouter une étape de purification des ADNc sur membrane de silice (QIAquick PCR purification kit, Qiagen). Sans cette étape, la présence d'un inhibiteur dans les ADNc empêchait toute quantification. Chaque étape utilisant les ARNm a été contrôlée par amplification du gène de la β -actine, comme précédemment décrit pour l'Article n°2.

L'absence de lignée cellulaire dans laquelle HHV-6 serait présent à l'état latent et pour lequel la réactivation pourrait être induite a contraint à mettre au point un système d'infection synchrone. Ce système a été choisi afin que tous les virions soient dans la même phase du cycle réplicatif et pour étudier la période très précoce (jusqu'à 8 h post-infection) de celui-ci. L'obtention d'un stock de virions titrés, suffisant pour pouvoir réaliser toutes les manipulations, a été longue du fait de la culture *in vitro* délicate et peu productive d'HHV-6. De grandes quantités de culture virale ont dû être conservées à -80 °C pour pouvoir être ultracentrifugées afin de concentrer les particules infectieuses.

La méthode choisie pour vérifier notre hypothèse utilise un mécanisme indirect : nous avons recherché si l'effet de l'inhibition de la voie de signalisation de NF- κ B par son super-répresseur I κ B α Mut diminuait la multiplication du virus. Les résultats obtenus montrent que lorsque NF- κ B ne peut plus agir en tant que facteur de transcription parce qu'il est constitutivement séquestré dans le cytoplasme, les quantités de transcrits des gènes IE d'HHV-6 et le nombre de cellules infectées sont diminuées par rapport aux conditions normales. Nous en avons donc conclu que le facteur de transcription NF- κ B joue un rôle important dans la réplication du virus HHV-6.

Le rôle du facteur de transcription NF- κ B dans la réplication du HCMV a également été étudié par une autre équipe. A l'inverse de ce que nous avons observé pour l'HHV-6, Benedict et al. (2004) ont montré que :

☞ Les éléments de réponse à NF- κ B situés dans le promoteur IE majeur (MIEP) ne sont pas requis pour la réplication du cytomégalo virus murin (MCMV) : la mutation des sites κ B n'affecte pas la réplication de ce virus

☞ La voie canonique de NF- κ B n'est pas nécessaire à la réplication ni du MCMV, ni du HCMV : la transfection stable de I κ B α Mut n'altère pas la réplication virale.

☞ L'expression de HCMV IE ne requiert pas NF- κ B : les quantifications des ARNm *ie1* par PCR en temps réel et de la protéine IE1 par western blot sont équivalentes dans les cellules exprimant I κ B α Mut et dans les cellules normales exprimant I κ B α C.

Par contre, la réplication de l'HSV-1 nécessite, quant à elle, NF- κ B : la production de particules virales est diminuée dans les cellules dépourvues de NF- κ B (p50^{-/-} et/ou p65^{-/-}), mais l'accumulation de l'ADN viral et de protéines d'HSV-1 n'est pas affectée. Le rôle de NF- κ B serait alors de permettre le passage de la synthèse de l'ADN viral vers son encapsidation et l'assemblage des virions (Taddeo et al., 2004).

Puisque l'inhibition de la voie canonique de NF- κ B diminue la réplication d'HHV-6, l'utilisation de molécules capables d'inhiber cette voie de signalisation pourrait être un bon moyen d'enrayer la multiplication d'HHV-6. De tels composés ont été utilisés pour empêcher la multiplication du HCMV et de l'HSV-1. Ainsi, le dérivé anilino AS602868 qui inhibe spécifiquement l'IKK β du complexe IKK a été testé pour sa capacité à inhiber la réplication du HCMV (Caposio et al., 2004). *In vitro*, en présence d'AS602868, l'expression des protéines IE1 et IE2 du HCMV est bloquée dès la phase IE du cycle réplication, de même que les étapes suivantes comme le montre l'expression diminuée du gène précoce UL44, qui code le facteur de processivité de l'ADN polymérase virale, et du gène tardif UL99. La synthèse de l'ADN est également inhibée d'une manière dose dépendante, cette inhibition est réversible : le retrait de la drogue permet la reprise de la synthèse d'ADN viral. Ainsi, l'inhibition de IKK β entraîne une inhibition significative dose-dépendante de la production de particules virales de HCMV. De plus, l'AS602868 n'affecte pas la viabilité cellulaire. Les prostaglandines cyclopentenones (CyPG) sont également de puissants inhibiteurs de l'IKK β .

Leur action sur l'infection par HSV-1 a été rapportée par Amici et al. (2001) qui ont montré que l'activation de NF- κ B induite par HSV-1 est inhibée en présence de CyPG et résulte en une activité antivirale. A terme, il serait intéressant de rechercher l'effet de ces molécules sur l'HHV-6.

Dans notre étude, nous n'avons pas observé d'arrêt de la transcription ou de la multiplication du virus HHV-6. Cela laisse penser que des voies annexes de signalisation seraient mises en place pour stimuler la réplication. Ainsi il serait intéressant d'étudier la voie de signalisation non canonique de NF- κ B. De même le rôle des sites de liaison des facteurs PEA3 et AP2 présents dans la région R3 pourrait être examiné. Parallèlement à ce qui a été trouvé pour le HCMV (Staak et al., 1997), le rôle des drogues induisant une augmentation de la quantité d'AMPc pourrait être étudié dans la réactivation d'HHV-6.

CONCLUSION GENERALE

L'objectif de mon travail de thèse était double : développer des outils moléculaires permettant la mesure ou la mise en évidence de la multiplication d'HHV-6 et étudier le rôle du facteur de transcription NF- κ B dans la stimulation de la réplication d'HHV-6.

Après l'établissement de l'environnement bibliographique, la première partie du travail de thèse de ce mémoire a concerné la mise au point des techniques de détection d'une infection active à HHV-6. Pour cela, deux méthodes ont été développées :

- ☞ Un système de PCR quantitative multiplex permettant de déterminer la charge virale HCMV, HHV-6A et/ou HHV-6B
- ☞ Une technique de RT-PCR couplée à une hybridation en plaque permettant la mise en évidence de transcrits associés à la réactivation d'HHV-6

Ces outils ont dans un premier temps étaient optimisés sur des cultures cellulaires d'HHV-6A (souche GS) et d'HHV-6B (souche HST). Par la suite, ne disposant pas de lignée cellulaire dans laquelle l'HHV-6 serait présent à l'état latent et où la réactivation pourrait être induite, nous avons, dans un deuxième temps, travaillé sur des prélèvements sanguins de patients transplantés. En effet, les greffés de moelle osseuse (BMT) et d'organes solides (SOT) sont de bons modèles d'étude de la réactivation d'HHV-6 et représentent un bon terrain d'application des outils moléculaires développés. De plus, à mon arrivée au laboratoire, le début d'un protocole clinique de suivi de la réactivation d'HHV-6 après transplantation nous a fourni les échantillons nécessaires.

La technique de PCR quantitative multiplex en temps réel s'est avérée intéressante pour le suivi des patients. Elle combine dans une seule réaction la détermination des charges virales de deux *β -herpesvirinae*, HCMV et/ou HHV-6, qui sont deux pathogènes importants pouvant induire des maladies graves voire mortelles après transplantation. Le grand nombre de prélèvements testés (170 échantillons), nous a donné une bonne corrélation avec les autres techniques de quantification précédemment utilisées. Ceci nous a également permis d'établir un seuil de discrimination entre le virus latent et le virus répliatif, seuil en dessous duquel le virus détecté peut être considéré comme latent. De même nous avons pu déterminer que les réactivation symptomatiques étaient associées à des quantifications $>$ à 500 copies/ μ g d'ADN pour HHV-6 et/ou HCMV. Cependant, cette technique de PCR quantitative multiplex en

temps réel, bien que fiable pour le suivi des patients transplantés reste moins sensible que les techniques développées en simplex.

La technique de RT-PCR développée sur l'ARNm du gène U79/80 d'HHV-6 est elle aussi sensible : elle combine une nested-PCR à une hybridation en plaque. Le nombre de prélèvements positifs est cependant faible : 32 (15%) sur 206 prélèvements de sang total testés. De nombreux prélèvements sont positifs sans symptomatologie associée à la réactivation d'HHV-6. Une amélioration de cette technique pourrait passer par la mise au point de la quantification des messagers U79/80 d'HHV-6.

Ces deux techniques ont donné satisfaction lorsqu'elles ont été appliquées aux prélèvements de patients transplantés. Le but initial était cependant de pouvoir appliquer ces deux techniques aux mêmes prélèvements afin de pouvoir les comparer. Malheureusement, la mise au point des techniques et la gestion des prélèvements n'ont pas permis l'application en parallèle de ces deux systèmes de détection de la réactivation d'HHV-6.

Au cours de la deuxième partie de mon travail de thèse, nous avons voulu étudier le rôle de la voie canonique du facteur de transcription NF- κ B dans le déclenchement de la réactivation d'HHV-6, un tel rôle ayant été démontré pour d'autres herpèsvirus. Ne disposant pas d'un système d'infection latente, nous avons choisi de regarder comment le facteur NF- κ B pouvait stimuler la réplication du virus HHV-6 au cours de la phase très précoce (IE) du cycle d'infection lytique et quelles étaient les conséquences au niveau de la multiplication du virus. Les résultats ont été obtenus de manière indirecte : nous avons utilisé le super-répresseur I κ B α Mut qui, ne pouvant être phosphorylé, séquestre NF- κ B dans le cytoplasme et l'empêche de jouer son rôle de facteur de transcription dans le noyau. Une diminution de la multiplication du virus a alors été observée. L'absence d'arrêt de la multiplication d'HHV-6, laisse supposer que la voie canique de NF- κ B intervient, mais certainement pas toute seule. Ainsi, il serait intéressant d'étudier la voie non canonique de NF- κ B, mais aussi d'autres facteurs de transcription.

Etant donné le rôle joué par le facteur de transcription NF- κ B dans l'initiation de la réplication et donc dans la réactivation d'HHV-6, un moyen d'enrayer cette réactivation pourrait être l'inhibition de la voie de signalisation de NF- κ B dans les cellules infectées. Ceci

a été démontré *in vitro* pour le HCMV et l'HSV-1 en utilisant des inhibiteurs de l'IKK β , mais aucune application *in vivo* n'a été rapportée. Avec la découverte récente du PanHV-6, des essais *in vivo* pourraient peut être menés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ablashi, D.V., Agut, H., Berneman, Z., Campadelli-Fiume, G., Carrigan, D.R., Ceccerini-Nelli, L., Chandran, B., Chou, S., Collandre, H., Cone, R., Dambaugh, T.R., Dewhurst, S., DiLuca, D., Foa`-Tomasi, L., Fleckenstein, B., Frenkel, N., Gallo, R., Gompels, U.A., Hall, C., Jones, M., Lawrence, G., Martin, M.E., Montagnier, L., Neipel, F., Nicholas, J., Pellett, P.E., Razzaque, A., Torrelli, G., Thomson, B.J., Salahuddin, S.Z., Wyatt, L. and Yamanishi, K., 1993. Human herpesvirus-6 strain groups: a nomenclature. *Arch Virol* 129, 363-6.
- Acott, P.D., Lee, S.H., Bitter-Suermann, H., Lawen, J.G. and Crocker, J.F., 1996. Infection concomitant with pediatric renal allograft rejection. *Transplantation* 62, 689-91.
- Adams, O., Krempe, C., Kogler, G., Wernet, P. and Scheid, A., 1998. Congenital infections with human herpesvirus 6. *J Infect Dis* 178, 544-6.
- Agut, H., Aubin, J.T. and Huraux, J.M., 1991. Homogeneous susceptibility of distinct human herpesvirus 6 strains to antivirals in vitro. *J Infect Dis* 163, 1382-3.
- Akashi, K., Eizuru, Y., Sumiyoshi, Y., Minematsu, T., Hara, S., Harada, M., Kikuchi, M., Niho, Y. and Minamishima, Y., 1993. Brief report: severe infectious mononucleosis-like syndrome and primary human herpesvirus 6 infection in an adult. *N Engl J Med* 329, 168-71.
- Alvarez-Lafuente, R., De las Heras, V., Bartolome, M., Picazo, J.J. and Arroyo, R., 2004. Relapsing-remitting multiple sclerosis and human herpesvirus 6 active infection. *Arch Neurol* 61, 1523-7.
- 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, 213-22.
- Andre-Garnier, E., Milpied, N., Boutolleau, D., Saiagh, S., Billaudel, S. and Imbert-Marcille, B.M., 2004. Reactivation of human herpesvirus 6 during ex vivo expansion of circulating CD34+ haematopoietic stem cells. *J Gen Virol* 85, 3333-6.

- Amici, C., Belardo, G., Rossi, A. and Santoro, M.G., 2001. Activation of IkappaB kinase by herpes simplex virus type 1. A novel target for anti-herpetic therapy. *J Biol Chem* 276, 28759-66.
- Ansari, A. and Emery, V.C., 1999. The U69 gene of human herpesvirus 6 encodes a protein kinase which can confer ganciclovir sensitivity to baculoviruses. *J Virol* 73, 3284-91.
- 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, 777-82.
- Arenzana-Seisdedos, F., Thompson, J., Rodriguez, M.S., Bachelerie, F., Thomas, D. and Hay, R.T., 1995. Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 15, 2689-96.
- Aritaki, K., Ohyashiki, J.H., Suzuki, A., Ojima, T., Abe, K., Shimizu, N., Yamamoto, K., Ohyashiki, K. and Hoshika, A., 2001. A rapid monitoring system of human herpesviruses reactivation by LightCycler in stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 28, 975-80.
- Asada, H., Klaus-Kovtun, V., Golding, H., Katz, S.I. and Blauvelt, A., 1999. Human herpesvirus 6 infects dendritic cells and suppresses human immunodeficiency virus type 1 replication in coinfecting cultures. *J Virol* 73, 4019-28.
- Asano, Y., Yoshikawa, T., Suga, S., Kobayashi, I., Nakashima, T., Yazaki, T., Kajita, Y. and Ozaki, T., 1994. Clinical features of infants with primary human herpesvirus 6 infection (exanthem subitum, roseola infantum). *Pediatrics* 93, 104-8.
- Asano, Y., Yoshikawa, T., Suga, S., Yazaki, T., Hirabayashi, S., Ono, Y., Tsuzuki, K. and Oshima, S., 1989. Human herpesvirus 6 harbouring in kidney. *Lancet* 2, 1391.

- 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, 482-3.
- Baeuerle, P.A. and Baltimore, D., 1989. A 65-kappaD subunit of active NF-kappaB is required for inhibition of NF-kappaB by I kappaB. *Genes Dev* 3, 1689-98.
- Baillargeon, J., Piper, J. and Leach, C.T., 2000. Epidemiology of human herpesvirus 6 (HHV-6) infection in pregnant and nonpregnant women. *J Clin Virol* 16, 149-57.
- Baldanti, F., Michel, D., Simoncini, L., Heuschmid, M., Zimmermann, A., Minisini, R., Schaarschmidt, P., Schmid, T., Gerna, G. and Mertens, T., 2002. Mutations in the UL97 ORF of ganciclovir-resistant clinical cytomegalovirus isolates differentially affect GCV phosphorylation as determined in a recombinant vaccinia virus system. *Antiviral Res* 54, 59-67.
- Ballard, D.W., Bohnlein, E., Lowenthal, J.W., Wano, Y., Franza, B.R. and Greene, W.C., 1988. HTLV-I tax induces cellular proteins that activate the kappa B element in the IL-2 receptor alpha gene. *Science* 241, 1652-5.
- Ballard, D.W., Dixon, E.P., Peffer, N.J., Bogerd, H., Doerre, S., Stein, B. and Greene, W.C., 1992. The 65-kDa subunit of human NF-kappa B functions as a potent transcriptional activator and a target for v-Rel-mediated repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1875-9.
- Bandobashi, K., Daibata, M., Kamioka, M., Tanaka, Y., Kubonishi, I., Taguchi, H., Ohtsuki, Y. and Miyoshi, I., 1997. Human herpesvirus 6 (HHV-6)-positive Burkitt's lymphoma: establishment of a novel cell line infected with HHV-6. *Blood* 90, 1200-7.
- Barone, S.R., Kaplan, M.H. and Krilov, L.R., 1995. Human herpesvirus-6 infection in children with first febrile seizures. *J Pediatr* 127, 95-7.

- Basara, N., Blau, I.W., Willenbacher, W., Kiehl, M.G. and Fauser, A.A., 2000. New strategies in the treatment of graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 25 Suppl 2, S12-5.
- Bême, D. Gare aux rejets de greffes ! [en ligne]. In *Greffes : éviter le rejet*. Disponible sur http://www.doctissimo.fr/html/dossiers/greffes_transplantation/articles/sa_7783_greffes_mecanisme_rejet.html (Page consultée le 11/04/2005).
- Benedict, C.A., Angulo, A., Patterson, G., Ha, S., Huang, H., Messerle, M., Ware, C.F. and Ghazal, P., 2004. Neutrality of the canonical NF-kappaB-dependent pathway for human and murine cytomegalovirus transcription and replication in vitro. *J Virol* 78, 741-50.
- Beovic, B., Pecaric-Meglic, N., Marin, J., Bedernjak, J., Muzlovic, I. and Cizman, M., 2001. Fatal human herpesvirus 6-associated multifocal meningoencephalitis in an adult female patient. *Scand J Infect Dis* 33, 942-4.
- Bethge, W., Beck, R., Jahn, G., Munding, P., Kanz, L. and Einsele, H., 1999. Successful treatment of human herpesvirus-6 encephalitis after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 24, 1245-8.
- Bhattarakosol, P., Pancharoen, C. and Mekmullica, J., 2001. Seroprevalence of anti-human herpes virus-6 IgG antibody in children of Bangkok, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 32, 143-7.
- Birnbaum, T., Padovan, C.S., Sporer, B., Rupprecht, T.A., Ausserer, H., Jaeger, G. and Pfister, H.W., 2005. Severe meningoencephalitis caused by human herpesvirus 6 type B in an immunocompetent woman treated with ganciclovir. *Clin Infect Dis* 40, 887-9.
- Black, J.B. and Pellett, P.E., 1999. Human herpesvirus 7. *Rev Med Virol* 9, 245-62.
- 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, 179-86.
- Braun, D.K., Dominguez, G. and Pellett, P.E., 1997. Human herpesvirus 6. *Clin Microbiol Rev* 10, 521-67.
- Briggs, M., Fox, J. and Tedder, R.S., 1988. Age prevalence of antibody to human herpesvirus 6. *Lancet* 1, 1058-9.
- Buchbinder, S., Elmaagacli, A.H., Schaefer, U.W. and Roggendorf, M., 2000. Human herpesvirus 6 is an important pathogen in infectious lung disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 26, 639-44.
- Burns, W.H. and Sandford, G.R., 1990. Susceptibility of human herpesvirus 6 to antivirals in vitro. *J Infect Dis* 162, 634-7.
- Campadelli-Fiume, G., Mirandola, P. and Menotti, L., 1999. Human herpesvirus 6: An emerging pathogen. *Emerg Infect Dis* 5, 353-66.
- Caposio, P., Dreano, M., Garotta, G., Gribaudo, G and Landolfo, S., 2004. Human cytomegalovirus stimulates cellular IKK2 activity and requires the enzyme for productive replication. *J Virol* 78, 3190-5.
- 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, 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, 3307-10.
- Challoner, P.B., Smith, K.T., Parker, J.D., MacLeod, D.L., Coulter, S.N., Rose, T.M., Schultz, E.R., Bennet, J.L., Garber, R.L. and Chang, M., 1995. Plaque-associated

- expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 7440-4.
- Chapenko, S., Millers, A., Nora, Z., Logina, I., Kukaine, R. and Murovska, M., 2003. Correlation between HHV-6 reactivation and multiple sclerosis disease activity. *J Med Virol* 69, 111-7.
- Chatenoud, L., 2003. CD3-specific antibody-induced active tolerance: from bench to bedside. *Nat Rev Immunol* 3, 123-32.
- Cherrington, J.M. and Mocarski, E.S., 1989. Human cytomegalovirus ie1 transactivates the alpha promoter-enhancer via an 18-base-pair repeat element. *J Virol* 63, 1435-40.
- Chuh, A.A., Chan, H.H., Chiu, S.S., Ng, H.Y. and Peiris, J.S., 2002. A prospective case control study of the association of Gianotti-Crosti syndrome with human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 infections. *Pediatr Dermatol* 19, 492-7.
- Clark, D.A., 2000. Human herpesvirus 6. *Rev Med Virol* 10, 155-73.
- Clark, D.A., Ait-Khaled, M., Wheeler, A.C., Kidd, I.M., McLaughlin, J.E., Johnson, M.A., Griffiths, P.D. and Emery, V.C., 1996. Quantification of human herpesvirus 6 in immunocompetent persons and post-mortem tissues from AIDS patients by PCR. *J Gen Virol* 77 (Pt 9), 2271-5.
- Collart, M.A., Baeuerle, P. and Vassalli, P., 1990. Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 10, 1498-506.
- 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, 2445-51.

- Cone, R.W., Huang, M.L., Ashley, R. and Corey, L., 1993a. Human herpesvirus 6 DNA in peripheral blood cells and saliva from immunocompetent individuals. *J Clin Microbiol* 31, 1262-7.
- Cone, R.W., Hackman, R.C., Huang, M.L., Bowden, R.A., Meyers, J.D., Metcalf, M., Zeh, J., Ashley, R. and Corey, L., 1993b. Human herpesvirus 6 in lung tissue from patients with pneumonitis after bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 329, 156-61.
- Cone, R.W., Huang, M.L., Ashley, R. and Corey, L., 1994. Human herpesvirus 6 DNA in peripheral blood cells and saliva from immunocompetent individuals. *J Clin Microbiol* 32, 2633.
- Cone, R.W., Huang, M.L., Hackman, R.C. and Corey, L., 1996. Coinfection with human herpesvirus 6 variants A and B in lung tissue. *J Clin Microbiol* 34, 877-81.
- Craig, J.M., Macauley, J.C., Weller, T.H. and Wirth, P., 1957. Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 94, 4-12.
- Daibata, M., Hatakeyama, N., Kamioka, M., Nemoto, Y., Hiroi, M., Miyoshi, I. and Taguchi, H., 2001. Detection of human herpesvirus 6 and JC virus in progressive multifocal leukoencephalopathy complicating follicular lymphoma. *Am J Hematol* 67, 200-5.
- Daibata, M., Taguchi, T., Nemoto, Y., Taguchi, H. and Miyoshi, I., 1999. Inheritance of chromosomally integrated human herpesvirus 6 DNA. *Blood* 94, 1545-9.
- De Bolle, L., Manichanh, C., Agut, H., De Clercq, E. and Naesens, L., 2004. Human herpesvirus 6 DNA polymerase: enzymatic parameters, sensitivity to ganciclovir and determination of the role of the A961V mutation in HHV-6 ganciclovir resistance. *Antiviral Res* 64, 17-25.
- De Bolle, L., Naesens, L. and De Clercq, E., 2005. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clin Microbiol Rev* 18, 217-45.

- De Bolle, L., Van Loon, J., De Clercq, E. and Naesens, L., 2005. Quantitative analysis of human herpesvirus 6 cell tropism. *J Med Virol* 75, 76-85.
- De Silva, D., Reiser, A., Herrmann, M., Tabiti, K. and Wittwer, C., 1998. Rapid genotyping and quantification on the LightCycler with hybridization probes. *Biochemica* 2, 12-5.
- Denes, E., Magy, L., Pradeau, K., Alain, S., Weinbreck, P. and Ranger-Rogez, S., 2004. Successful treatment of human herpesvirus 6 encephalomyelitis in immunocompetent patient. *Emerg Infect Dis* 10, 729-31.
- Desachy, A., Ranger-Rogez, S., Francois, B., Venot, C., Traccard, I., Gastinne, H., Denis, F. and Vignon, P., 2001. Reactivation of human herpesvirus type 6 in multiple organ failure syndrome. *Clin Infect Dis* 32, 197-203.
- 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, 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, 1783-6.
- Dewhurst, S., McIntyre, K., Schnabel, K. and Hall, C.B., 1993. Human herpesvirus 6 (HHV-6) variant B accounts for the majority of symptomatic primary HHV-6 infections in a population of U.S. infants. *J Clin Microbiol* 31, 416-8.
- Dhepakson, P., Mori, Y., Jiang, Y.B., Huang, H.L., Akkapaiboon, P., Okuno, T. and Yamanishi, K., 2002. Human herpesvirus-6 rep/U94 gene product has a single-stranded DNA-binding activity. *J Gen Virol* 83, 847-54.

- 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, 199-210.
- Di Luca, D., Mirandola, P., Ravaioli, T., Dolcetti, R., Frigatti, A., Bovenzi, P., Sighinolfi, L., Monini, P. and Cassai, E., 1995. Human herpesviruses 6 and 7 in salivary glands and shedding in saliva of healthy and human immunodeficiency virus positive individuals. *J Med Virol* 45, 462-8.
- 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, 1135-40.
- Dockrell, D.H., Smith, T.F. and Paya, C.V., 1999. Human herpesvirus 6. *Mayo Clin Proc* 74, 163-70.
- 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, 8040-52.
- Drobyski, W.R., Dunne, W.M., Burd, E.M., Knox, K.K., Ash, R.C., Horowitz, M.M., Flomenberg, N. and Carrigan, D.R., 1993. Human herpesvirus-6 (HHV-6) infection in allogeneic bone marrow transplant recipients: evidence of a marrow-suppressive role for HHV-6 in vivo. *J Infect Dis* 167, 735-9.
- Emery, V.C., Atkins, M.C., Bowen, E.F., Clark, D.A., Johnson, M.A., Kidd, I.M., McLaughlin, J.E., Phillips, A.N., Strappe, P.M. and Griffiths, P.D., 1999. Interactions between beta-herpesviruses and human immunodeficiency virus in vivo: evidence for increased human immunodeficiency viral load in the presence of human herpesvirus 6. *J Med Virol* 57, 278-82.

- Enders, G., Biber, M., Meyer, G. and Helftenbein, E., 1990. Prevalence of antibodies to human herpesvirus 6 in different age groups, in children with exanthema subitum, other acute exanthematous childhood diseases, Kawasaki syndrome, and acute infections with other herpesviruses and HIV. *Infection* 18, 12-5.
- Enright, H., Haake, R., Weisdorf, D., Ramsay, N., McGlave, P., Kersey, J., Thomas, W., McKenzie, D. and Miller, W., 1993. Cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation. Risk factors and response to therapy. *Transplantation* 55, 1339-46.
- Fillet, A.M., Raphael, M., Visse, B., Audouin, J., Poirel, L. and Agut, H., 1995. controlled study of human herpesvirus 6 detection in acquired immunodeficiency syndrome-associated non-Hodgkin's lymphoma. The french study group of HIV-associated tumors. *J Med Virol* 45, 106-12.
- 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, 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, 1263-71.
- Flamand, L., Stefanescu, I. and Menezes, J., 1996. Human herpesvirus-6 enhances natural killer cell cytotoxicity via IL-15. *J Clin Invest* 97, 1373-81.
- Foa-Tomasi, L., Avitabile, E. and Campadelli-Fiume, G., 1995. Selection of a monoclonal antibody specific for variant B human herpesvirus 6-infected mononuclear cells. *J Virol Methods* 51, 289-96.
- 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, 839-43.

- Fujiwara, N., Namba, H., Ohuchi, R., Isomura, H., Uno, F., Yoshida, M., Nii, S. and Yamada, M., 2000. Monitoring of human herpesvirus-6 and -7 genomes in saliva samples of healthy adults by competitive quantitative PCR. *J Med Virol* 61, 208-13.
- 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, 27-35.
- Ghosh, S. and Karin, M., 2002. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109 Suppl, S81-96.
- Ghosh, S., May, M.J. and Kopp, E.B., 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16, 225-60.
- Goedhard, J.G., Galama, J.M. and Wagenvoort, J.H., 1995. Active human herpesvirus 6 infection in an adolescent male. *Clin Infect Dis* 20, 1070-1.
- 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, 29-51.
- Griffiths, P.D., Ait-Khaled, M., Bearcroft, C.P., Clark, D.A., Quaglia, A., Davies, S.E., Burroughs, A.K., Rolles, K., Kidd, I.M., Knight, S.N., Noibi, S.M., Cope, A.V., Phillips, A.N. and Emery, V.C., 1999. Human herpesviruses 6 and 7 as potential pathogens after liver transplant: prospective comparison with the effect of cytomegalovirus. *J Med Virol* 59, 496-501.
- Griffiths, P.D., Clark, D.A. and Emery, V.C., 2000. Betaherpesviruses in transplant recipients. *J Antimicrob Chemother* 45 Suppl T3, 29-34.
- Hall, C.B., 1997. Human herpesviruses at sixes, sevens, and more. *Ann Intern Med* 127, 481-3.

- Hall, C.B., Caserta, M.T., Schnabel, K.C., Long, C., Epstein, L.G., Insel, R.A. and Dewhurst, S., 1998. Persistence of human herpesvirus 6 according to site and variant: possible greater neurotropism of variant A. *Clin Infect Dis* 26, 132-7.
- 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, 432-8.
- He, J., McCarthy, M., Zhou, Y., Chandran, B. and Wood, C., 1996. Infection of primary human fetal astrocytes by human herpesvirus 6. *J Virol* 70, 1296-300.
- Hentrich, M., Oruzio, D., Jager, G., Schlemmer, M., Schleuning, M., Schiel, X., Hiddemann, W. and Kolb H.J., 2005. Impact of human herpesvirus-6 after haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 128, 66-72.
- Herbein, G., Strasswimmer, J., Altieri, M., Woehl-Jaegle, M.L., Wolf, P. and Obert, G., 1996. Longitudinal study of human herpesvirus 6 infection in organ transplant recipients. *Clin Infect Dis* 22, 171-3.
- Hiscott, J., Marois, J., Garoufalidis, J., D'Addario, M., Roulston, A., Kwan, I., Pepin, N., Lacoste, J., Nguyen, H., Bensi, G. and et al., 1993. Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. *Mol Cell Biol* 13, 6231-40.
- Hoshino, K., Nishi, T., Adachi, H., Ito, H., Fukuda, Y., Dohi, K. and Kurata, T., 1995. Human herpesvirus-6 infection in renal allografts: retrospective immunohistochemical study in Japanese recipients. *Transpl Int* 8, 169-73.
- Humar, A., Kumar, D., Raboud, J., Caliendo, A.M., Moussa, G., Levy, G. and Mazzulli, T., 2002a. Interactions between cytomegalovirus, human herpesvirus-6, and the recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *Am J Transplant* 2, 461-6.

- Humar, A., Kumar, D., Caliendo, A.M., Moussa, G., Ashi-Sulaiman, A., Levy, G. and Mazzulli, T., 2002b. Clinical impact of human herpesvirus-6 infection after liver transplantation. *Transplantation* 73, 599-604.
- Imbert-Marcille, B.M., Tang, X.W., Lepelletier, D., Besse, B., Moreau, P., Billaudel, S. and Milpied, N., 2000. Human herpesvirus 6 infection after autologous or allogeneic stem cell transplantation: a single-center prospective longitudinal study of 92 patients. *Clin Infect Dis* 31, 881-6.
- 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, 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, 6104-12.
- Jacobs, F., Knoop, C., Brancart, F., Gilot, P., Melot, C., Byl, B., Delforge, M.L., Estenne, M. and Liesnard, C., 2003. Human herpesvirus-6 infection after lung and heart-lung transplantation: a prospective longitudinal study. *Transplantation* 75, 1996-2001.
- Jacobs, U., Ferber, J. and Klehr, H.U., 1994. Severe allograft dysfunction after OKT3-induced human herpes virus-6 reactivation. *Transplant Proc* 26, 3121.
- Jarrett, R.F., Gledhill, S., Qureshi, F., Crae, S.H., Madhok, R., Brown, I., Evans, I., Krajewski, A., O'Brien, C.J. and Cartwright, R.A., 1988. Identification of human herpesvirus 6-specific DNA sequences in two patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* 2, 496-502.
- Johnson, G., Nelson, S., Petric, M. and Tellier, R., 2000. Comprehensive PCR-based assay for detection and species identification of human herpesviruses. *J Clin Microbiol* 38, 3274-9.

- Johnston, R.E., Geretti, A.M., Prentice, H.G., Clark, A.D., Wheeler, A.C., Potter, M. and Griffiths, P.D., 1999. HHV-6-related secondary graft failure following allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 105, 1041-3.
- Kadokia, M.P., Rybka, W.B., Stewart, J.A., Patton, J.L., Stamey, F.R., Elsayy, M., Pellet, P.E. and Armstrong, J.A., 1996. Human herpesvirus 6: infection and disease following autologous and allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 87, 5341-54
- Kahan, B.D., 2003. Individuality: the barrier to optimal immunosuppression. *Nat Rev Immunol* 3, 831-8.
- Karin, M. and Lin, A., 2002. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 3, 221-7.
- Karras, A., Thervet, E. and Legendre, C., 2004. Hemophagocytic syndrome in renal transplant recipients: report of 17 cases and review of literature. *Transplantation* 77, 238-43.
- Kashanchi, F., Araujo, J., Doniger, J., Muralidhar, S., Hoch, R., Khleif, S., Mendelson, E., Thompson, J., Azumi, N., Brady, J.N., Luppi, M., Torelli, G. and Rosenthal, L.J., 1997. Human herpesvirus 6 (HHV-6) ORF-1 transactivating gene exhibits malignant transforming activity and its protein binds to p53. *Oncogene* 14, 359-67.
- Kato, Z., Kozawa, R., Teramoto, T., Hashimoto, K., Shinoda, S. and Kondo, N., 2003. Acute cerebellitis in primary human herpesvirus-6 infection. *Eur J Pediatr* 162, 801-3.
- Knox, K.K. and Carrigan, D.R., 1996. Chronic myelosuppression associated with persistent bone marrow infection due to human herpesvirus 6 in a bone marrow transplant recipient. *Clin Infect Dis* 22, 174-5.
- 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, 1401-8.

- Kondo, K., Nagafuji, H., Hata, A., Tomomori, C. and Yamanishi, K., 1993. Association of human herpesvirus 6 infection of the central nervous system with recurrence of febrile convulsions. *J Infect Dis* 167, 1197-200.
- Kondo, K. and Mocarski, E.S., 1995. Cytomegalovirus latency and latency-specific transcription in hematopoietic progenitors. *Scand J Infect Dis Suppl* 99, 63-7.
- 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, 364-9.
- Kondo, K., Shimada, K., Sashihara, J., Tanaka-Taya, K. and Yamanishi, K., 2002b. Identification of human herpesvirus 6 latency-associated transcripts. *J Virol* 76, 4145-51.
- 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, 2258-64.
- Krueger, G.R. and Ablashi, D.V., 2003. Human herpesvirus-6: a short review of its biological behavior. *Intervirology* 46, 257-69.
- Krueger, G.R., Ablashi, D.V., Josephs, S.F., Salahuddin, S.Z., Lembke, U., Ramon, A. and Bertram, G., 1991. Clinical indications and diagnostic techniques of human herpesvirus-6 (HHV-6) infection. *In Vivo* 5, 287-95.
- Kunsch, C. and Rosen, C.A., 1993. NF-kappa B subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter. *Mol Cell Biol* 13, 6137-46.
- Lacoste, V., Verschoor, E.J., Nerrienet, E. and Gessain, A., 2005. A novel homologue of human herpesvirus 6 in chimpanzees. *J Gen Virol* 86, 2135-40.

- Lacroix, S., Stewart, J.A., Thouless, M.E. and Black, J.B., 2000. An immunoblot assay for detection of immunoglobulin M antibody to human herpesvirus 6. *Clin Diagn Lab Immunol* 7, 823-7.
- Lai, J.H., Horvath, G., Subleski, J., Bruder, J., Ghosh, P. and Tan, T.H., 1995. RelA is a potent transcriptional activator of the CD28 response element within the interleukin 2 promoter. *Mol Cell Biol* 15, 4260-71.
- Landolfo, S., Gariglio, M., Gribaudo, G. and Lembo, D., 2003. The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther* 98, 269-97.
- Lau, Y.L., Peiris, M., Chan, G.C., Chan, A.C., Chiu, D. and Ha, S.Y., 1998. Primary human herpes virus 6 infection transmitted from donor to recipient through bone marrow infusion. *Bone Marrow Transplant* 21, 1063-6.
- Lautenschlager, I., Hockerstedt, K., Linnavuori, K. and Taskinen, E., 1998. Human herpesvirus-6 infection after liver transplantation. *Clin Infect Dis* 26, 702-7.
- Lautenschlager, I., Linnavuori, K. and Hockerstedt, K., 2000. Human herpesvirus-6 antigenemia after liver transplantation. *Transplantation* 69, 2561-6.
- Leung, D.Y. and Bloom, J.W., 2003. Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol* 111, 3-22; quiz 23.
- Levy, J.A., 1997. Three new human herpesviruses (HHV6, 7, and 8). *Lancet* 349, 558-63.
- Li, C., Goodrich, J.M. and Yang, X., 1997. Interferon-gamma (IFN-gamma) regulates production of IL-10 and IL-12 in human herpesvirus-6 (HHV-6)-infected monocyte/macrophage lineage. *Clin Exp Immunol* 109, 421-5.
- Liebermann, T.A. and Baltimore, D., 1990. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol Cell Biol* 10, 2327-34.

- Lin, L., DeMartino, G.N. and Greene, W.C., 1998. Cotranslational biogenesis of NF-kappaB p50 by the 26S proteasome. *Cell* 92, 819-28.
- Liu, R., Zhao, X., Gurney, T.A. and Landau, N.R., 1998. Functional analysis of the proximal CCR5 promoter. *AIDS Res Hum Retroviruses* 14, 1509-19.
- Ljungman, P., Wang, F.Z., Clark, D.A., Emery, V.C., Remberger, M., Ringden, O. and Linde, A., 2000. High levels of human herpesvirus 6 DNA in peripheral blood leucocytes are correlated to platelet engraftment and disease in allogeneic stem cell transplant patients. *Br J Haematol* 111, 774-81.
- Locatelli, G., Santoro, F., Veglia, F., Gobbi, A., Lusso, P. and Malnati, M.S., 2000. Real-time quantitative PCR for human herpesvirus 6 DNA. *J Clin Microbiol* 38, 4042-8.
- Luppi, M., Barozzi, P., Garber, R., Maiorana, A., Bonacorsi, G., Artusi, T., Trovato, R., Marasca, R. and Torelli, G., 1998. Expression of human herpesvirus-6 antigens in benign and malignant lymphoproliferative diseases. *Am J Pathol* 153, 815-23.
- 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, 754-9.
- Lusso, P., Malnati, M., De Maria, A., Balotta, C., DeRocco, S.E., Markham, P.D. and Gallo, R.C., 1991. 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, 685-91.
- Lusso, P., Markham, P.D., Tschachler, E., di Marzo Veronese, F., Salahuddin, S.Z., Ablashi, D.V., Pahwa, S., Krohn, K. and Gallo, R.C., 1988. In vitro cellular tropism of human B-lymphotropic virus (human herpesvirus-6). *J Exp Med* 167, 1659-70.
- Luttichau, H.R., Clark-Lewis, I., Jensen, P.O., Moser, C., Gerstoft, J. and Schwartz, T.W., 2003. A highly selective CCR2 chemokine agonist encoded by human herpesvirus 6. *J Biol Chem* 278, 10928-33.

- Macé, M.; Manichanh, C., Bonnafeous, P., Precigout, S., Boutolleau, D., Gautheret-Dejean, A. and Agut, H., 2003. Real-time PCR as a versatile tool for investigating the susceptibility of human herpesvirus 6 to antiviral agents. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 3021-4.
- Mackenzie, I.R., Carrigan, D.R. and Wiley, C.A., 1995. Chronic myelopathy associated with human herpesvirus-6. *Neurology* 45, 2015-7.
- MacLean, H.J. and Douen, A.G., 2002. Severe amnesia associated with human herpesvirus 6 encephalitis after bone marrow transplantation. *Transplantation* 73, 1086-9.
- Maeda, T., Okuno, T., Hayashi, K., Nagata, M., Ueda, M., Terashima, K., Kawashima, T., Miyamoto, H., Mori, T. and Yamada, Y., 1997. Outcomes of infants whose mothers are positive for human herpesvirus-6 DNA within the genital tract in early gestation. *Acta Paediatr Jpn* 39, 653-7.
- Maeda, Y., Teshima, T., Yamada, M. and Harada, M., 2000. Reactivation of human herpesviruses after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation and bone marrow transplantation. *Leuk Lymphoma* 39, 229-39.
- Maeda, Y., Teshima, T., Yamada, M., Shinagawa, K., Nakao, S., Ohno, Y., Kojima, K., Hara, M., Nagafuji, K., Hayashi, S., Fukuda, S., Sawada, H., Matsue, K., Takenaka, K., Ishimaru, F., Ikeda, K., Niiya, K. and Harada, M., 1999. Monitoring of human herpesviruses after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation and bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 105, 295-302.
- 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, 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, 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, 5381-90.
- Matsuda, Y., Hara, J., Miyoshi, H., Osugi, Y., Fujisaki, H., Takai, K., Ohta, H., Tanaka-Taya, K., Yamanishi, K. and Okada, S., 1999. Thrombotic microangiopathy associated with reactivation of human herpesvirus-6 following high-dose chemotherapy with autologous bone marrow transplantation in young children. *Bone Marrow Transplant* 24, 919-23.
- McGavin, J.K. and Goa, K.L., 2001. Ganciclovir: an update of its use in the prevention of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Drugs* 61, 1153-83.
- Messer, G., Weiss, E.H. and Baeuerle, P.A., 1990. Tumor necrosis factor beta (TNF-beta) induces binding of the NF-kappa B transcription factor to a high-affinity kappa B element in the TNF-beta promoter. *Cytokine* 2, 389-97.
- Meyers, J.D., Ljungman, P. and Fisher, L.D., 1990. Cytomegalovirus excretion as a predictor of cytomegalovirus disease after marrow transplantation: importance of cytomegalovirus viremia. *J Infect Dis* 162, 373-80.
- Milne, R.S., Mattick, C., Nicholson, L., Devaraj, P., Alcami, A. and Gompels, U.A., 2000. RANTES binding and down-regulation by a novel human herpesvirus-6 beta chemokine receptor. *J Immunol* 164, 2396-404.
- 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, 3837-44.
- Mocarski, E.S. and Courcelle, C.T., 2001. Cytomegalovirus and their replication, in: Knipe D.M., Howley, P.M. (Eds), *Fields Virology Fourth Edition Volume 2*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 2629-73

- Moog, R. and Muller, N., 1998. Technical aspects and performance in collecting peripheral blood progenitor cells. *Ann Hematol* 77, 143-7.
- Mookerjee, B.P. and Vogelsang, G., 1997. Human herpes virus-6 encephalitis after bone marrow transplantation: successful treatment with ganciclovir. *Bone Marrow Transplant* 20, 905-6.
- Mori, N. and Prager, D., 1996. Transactivation of the interleukin-1alpha promoter by human T-cell leukemia virus type I and type II Tax proteins. *Blood* 87, 3410-7.
- Mori, Y., Yang, X., Akkapaiboon, P., Okuno, T. and Yamanishi, K., 2003. Human herpesvirus 6 variant A glycoprotein H-glycoprotein L-glycoprotein Q complex associates with human CD46. *J Virol* 77, 4992-9.
- Morris, C., Luppi, M., McDonald, M., Barozzi, P. and Torelli, G., 1999. Fine mapping of an apparently targeted latent human herpesvirus type 6 integration site in chromosome band 17p13.3. *J Med Virol* 58, 69-75.
- Morris, D.J., Littler, E., Arrand, J.R., Jordan, D., Mallick, N.P. and Johnson, R.W., 1989. Human herpesvirus 6 infection in renal-transplant recipients. *N Engl J Med* 320, 1560-1.
- Mukai, T., Yamamoto, T., Kondo, T., Kondo, K., Okuno, T., Kosuge, H. and Yamanishi, K., 1994. Molecular epidemiological studies of human herpesvirus 6 in families. *J Med Virol* 42, 224-7.
- Nigro, G., Luzi, G., Krzysztofiak, A., D'Orio, F. and Aiuti, F., 1995. Detection of IgM antibodies to human herpesvirus 6 in Romanian children with nonprogressive human immunodeficiency virus disease. *Pediatr Infect Dis J* 14, 891-4.
- Nii, S., Yoshida, M., Uno, F., Kurata, T., Ikuta, K. and Yamanishi, K., 1990. Replication of human herpesvirus 6 (HHV-6): morphological aspects. *Adv Exp Med Biol* 278, 19-28.

- Nikolaou, K., Varinou, L., Inoue, N. and Arsenakis, M., 2003. Identification and characterization of gene products of ORF U90/89 of human herpesvirus 6. *Acta Virol* 47, 17-26.
- Nishimaki, K., Okada, S., Miyamura, K., Ohno, I., Ashino, Y., Sugawara, T., Kondo, T. and Hattori, T., 2003. The possible involvement of human herpesvirus type 6 in obliterative bronchiolitis after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 32, 1103-5.
- Nitsche, A., Muller, C.W., Radonic, A., Landt, O., Ellerbrok, H., Pauli, G. and Siegert, W., 2001. Human herpesvirus 6A DNA Is detected frequently in plasma but rarely in peripheral blood leukocytes of patients after bone marrow transplantation. *J Infect Dis* 183, 130-3.
- Norton, R.A., Caserta, M.T., Hall, C.B., Schnabel, K., Hocknell, P. and Dewhurst, S., 1999. Detection of human herpesvirus 6 by reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 37, 3672-5.
- Novoa, L.J., Nagra, R.M., Nakawatase, T., Edwards-Lee, T., Tourtellotte, W.W. and Cornford, M.E., 1997. Fulminant demyelinating encephalomyelitis associated with productive HHV-6 infection in an immunocompetent adult. *J Med Virol* 52, 301-8.
- 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, 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.
- Okuno, T., Takahashi, K., Balachandra, K., Shiraki, K., Yamanishi, K., Takahashi, M. and Baba, K., 1989. Seroepidemiology of human herpesvirus 6 infection in normal children and adults. *J Clin Microbiol* 27, 651-3.

- Paloczi, K., 1999. Immunophenotypic and functional characterization of human umbilical cord blood mononuclear cells. *Leukemia* 13 Suppl 1, S87-9.
- 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, 89-101.
- Parker, C.A. and Weber, J.M., 1993. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of IgG and IgM antibodies to human herpesvirus type 6. *J Virol Methods* 41, 265-75.
- Pascual, J., Marcen, R. and Ortuno, J., 2001. Anti-interleukin-2 receptor antibodies: basiliximab and daclizumab. *Nephrol Dial Transplant* 16, 1756-60.
- Pass, R.F., 1985. Epidemiology and transmission of cytomegalovirus. *J Infect Dis* 152, 243-8.
- Pass R.F., 2001. Cytomegalovirus, in: Knipe D.M., Howley, P.M. (Eds), *Fields Virology Fourth Edition Volume 2*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 2675-705
- Paterson, D.L., Singh, N., Gayowski, T., Carrigan, D.R. and Marino, I.R., 1999. Encephalopathy associated with human herpesvirus 6 in a liver transplant recipient. *Liver Transpl Surg* 5, 454-5.
- Pellet, P.E. and Black, J.B., 1996. Human herpesvirus 6, in: Knipe D.M., Howley, P.M. (Eds), *Fields Virology Third Edition Volume 2*. Lippincott-Raven publishers, Philadelphia, pp. 2587-608.
- Pellet, P.E. and Dominguez, G., 2001. Human herpesviruses 6A, 6B, and 7 and their replication, in: Knipe D.M., Howley, P.M. (Eds), *Fields Virology Fourth Edition Volume 2*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 2769-84.
- Portolani, M., Cermelli, C., Moroni, A., Bertolani, M.F., Di Luca, D., Cassai, E. and Sabbatini, A.M., 1993. Human herpesvirus-6 infections in infants admitted to hospital. *J Med Virol* 39, 146-51.

- Prichard, M.N., Gao, N., Jairath, S., Mulamba, G., Krosky, P., Coen, D.M., Parker, B.O. and Pari, G.S., 1999. A recombinant human cytomegalovirus with a large deletion in UL97 has a severe replication deficiency. *J Virol* 73, 5663-70.
- Pruksananonda, P., Hall, C.B., Insel, R.A., McIntyre, K., Pellett, P.E., Long, C.E., Schnabel, K.C., Pincus, P.H., Stamey, F.R., Dambaugh, T.R. and et al., 1992. Primary human herpesvirus 6 infection in young children. *N Engl J Med* 326, 1445-50.
- Ranger, S., Patillaud, S., Denis, F., Himmich, A., Sangare, A., M'Boup, S., Itoua-N'Gaporo, A., Prince-David, M., Chout, R., Cevallos, R. and et al., 1991. Seroepidemiology of human herpesvirus-6 in pregnant women from different parts of the world. *J Med Virol* 34, 194-8.
- Ranger-Rogez, S., Venot, C., Aubard, Y., Denis, F. et Freymuth, F., 1999. Cytomégalovirus, dans les virus transmissibles de la mère à l'enfant. Editions John Libbey Eurotext, Montrouge, France, pp. 214-39.
- Rapaport, D., Engelhard, D., Tagger, G., Or, R. and Frenkel, N., 2002. Antiviral prophylaxis may prevent human herpesvirus-6 reactivation in bone marrow transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 4, 10-6.
- Rapp, J.C., Krug, L.T., Inoue, N., Dambaugh, T.R. and Pellett, P.E., 2000. U94, the human herpesvirus 6 homolog of the parvovirus nonstructural gene, is highly conserved among isolates and is expressed at low mRNA levels as a spliced transcript. *Virology* 268, 504-16.
- Ratnamohan, V.M., Chapman, J., Howse, H., Bovington, K., Robertson, P., Byth, K., Allen, R. and Cunningham, A.L., 1998. Cytomegalovirus and human herpesvirus 6 both cause viral disease after renal transplantation. *Transplantation* 66, 877-82.
- Reddy, S. and Manna, P., 2005. Quantitative detection and differentiation of human herpesvirus 6 subtypes in bone marrow transplant patients by using a single real-time polymerase chain reaction assay. *Biol Blood Marrow Transplant* 11, 530-41.

- Reymen, D., Naesens, L., Balzarini, J., Holy, A., Dvorakova, H. and De Clercq, E., 1995. Antiviral activity of selected acyclic nucleoside analogues against human herpesvirus 6. *Antiviral Res* 28, 343-57.
- 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, 1408-11.
- Robert, C., Aubin, J.T., Visse, B., Fillet, A.M., Huraux, J.M. and Agut, H., 1996. Difference in permissiveness of human fibroblast cells to variants A and B of human herpesvirus-6. *Res Virol* 147, 219-25.
- Roberts, J.P., Ascher, N.L., Feduska, N.J. Chap 48 Organ Transplantation [en ligne]. In Current surgical diagnosis & treatment - 11th Ed. Disponible sur : <http://online.stratref.com.ezproxy.umassmed.edu/document.asp> (Page consultée le 13/04/2005).
- Rogers, J., Rohal, S., Carrigan, D.R., Kusne, S., Knox, K.K., Gayowski, T., Wagener, M.M., Fung, J.J. and Singh, N., 2000. Human herpesvirus-6 in liver transplant recipients: role in pathogenesis of fungal infections, neurologic complications, and outcome. *Transplantation* 69, 2566-73.
- Roizman, B. and Pellet, P.E., 2001. The family Herpesviridae: a brief introduction, in: Knipe D.M., Howley, P.M. (Eds), *Fields Virology Fourth Edition Volume 2*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 2381-97
- Rosenfeld, C.S., Rybka, W.B., Weinbaum, D., Carrigan, D.R., Knox, K.K., Andrews, D.F. and Shadduck, R.K., 1995. Late graft failure due to dual bone marrow infection with variants A and B of human herpesvirus-6. *Exp Hematol* 23, 626-9.
- Rossi, C., Delforge, M.L., Jacobs, F., Wissing, M., Pradier, O., Remmelink, M., Byl, B., Thys, J.P. and Liesnard, C., 2001. Fatal primary infection due to human herpesvirus 6 variant A in a renal transplant recipient. *Transplantation* 71, 288-92.

- Rothwarf, D.M. and Karin, M., 1999. The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Sci STKE* 1999, RE1.
- Rotola, A., Ravaioli, T., Gonelli, A., Dewhurst, S., Cassai, E. and Di Luca, D., 1998. U94 of human herpesvirus 6 is expressed in latently infected peripheral blood mononuclear cells and blocks viral gene expression in transformed lymphocytes in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13911-6.
- Rowe, W.P., Hartley, J.W., Waterman, S., Turner, H.C. and Huebner, R.J., 1956. Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proc Soc Exp Biol Med* 92, 418-24.
- Russell, P.S. Section 12 Immunology; Allergic Disorders; Chap 149 Transplantation [en ligne]. In *The Merck manual of diagnosis and therapy*. Disponible sur : <http://online.stratref.com.ezproxy.umassmed.edu/document.asp> (Page consultée le 15/04/2005).
- Safronetz, D., Humar, A. and Tipples, G.A., 2003a. Differentiation and quantitation of human herpesviruses 6A, 6B and 7 by real-time PCR. *J Virol Methods* 112, 99-105.
- Safronetz, D., Petric, M., Tellier, R., Parvez, B. and Tipples, G.A., 2003b. Mapping ganciclovir resistance in the human herpesvirus-6 U69 protein kinase. *J Med Virol* 71, 434-9.
- 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, 596-601.
- Sambucetti, L.C., Cherrington, J.M., Wilkinson, G.W. and Mocarski, E.S., 1989. NF-kappa B activation of the cytomegalovirus enhancer is mediated by a viral transactivator and by T cell stimulation. *Embo J* 8, 4251-8.

- Sambrook, J., Fritsh, E.F. and Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Santee, S.M. and Owen-Schaub, L.B., 1996. Human tumor necrosis factor receptor p75/80 (CD120b) gene structure and promoter characterization. *J Biol Chem* 271, 21151-9.
- 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, 817-27.
- Sashihara, J., Tanaka-Taya, K., Tanaka, S., Amo, K., Miyagawa, H., Hosoi, G., Taniguchi, T., Fukui, T., Kasuga, N., Aono, T., Sako, M., Hara, J., Yamanishi, K. and Okada, S., 2002. High incidence of human herpesvirus 6 infection with a high viral load in cord blood stem cell transplant recipients. *Blood* 100, 2005-11.
- Schindler, U. and Baichwal, V.R., 1994. Three NF-kappa B binding sites in the human E-selectin gene required for maximal tumor necrosis factor alpha-induced expression. *Mol Cell Biol* 14, 5820-31.
- Secchiero, P., Carrigan, D.R., Asano, Y., Benedetti, L., Crowley, R.W., Komaroff, A.L., Gallo, R.C. and Lusso, P., 1995. Detection of human herpesvirus 6 in plasma of children with primary infection and immunosuppressed patients by polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 171, 273-80.
- Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F.R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S.C. and Karin, M., 2001. Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* 293, 1495-9.
- Simmons, A., Demmrich, Y., La Vista, A. and Smith, K., 1992. Replication of human herpesvirus 6 in epithelial cells in vitro. *J Infect Dis* 166, 202-5.
- Singh, N. and Carrigan, D.R., 1996. Human herpesvirus-6 in transplantation: an emerging pathogen. *Ann Intern Med* 124, 1065-71.

- Singh, N., Carrigan, D.R., Gayowski, T. and Marino, I.R., 1997. Human herpesvirus-6 infection in liver transplant recipients: documentation of pathogenicity. *Transplantation* 64, 674-8.
- 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, 1355-7.
- Sissons, J.G. and Carmichael, A.J., 2002. Clinical aspects and management of cytomegalovirus infection. *J Infect* 44, 78-83.
- Smith, M.G., 1956. Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 92, 424-30.
- Sobue, R., Miyazaki, H., Okamoto, M., Hirano, M., Yoshikawa, T., Suga, S. and Asano, Y., 1991. Fulminant hepatitis in primary human herpesvirus-6 infection. *N Engl J Med* 324, 1290.
- Sohn, Y.M., Oh, M.K., Balcarek, K.B., Cloud, G.A. and Pass, R.F., 1991. Cytomegalovirus infection in sexually active adolescents. *J Infect Dis* 163, 460-3.
- Soldan, S.S., Fogdell-Hahn, A., Brennan, M.B., Mittleman, B.B., Ballerini, C., Massacesi, L., Seya, T., McFarland, H.F. and Jacobson, S., 2001. Elevated serum and cerebrospinal fluid levels of soluble human herpesvirus type 6 cellular receptor, membrane cofactor protein, in patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50, 486-93.
- Soul-Lawton, J., Seaber, E., On, N., Wootton, R., Rolan, P. and Posner, J., 1995. Absolute bioavailability and metabolic disposition of valaciclovir, the L-valyl ester of acyclovir, following oral administration to humans. *Antimicrob Agents Chemother* 39, 2759-64.
- Staak, K., Prosch, S., Stein, J., Priemer, C., Ewert, R., Docke, W.D., Kruger, D.H., Volk, H.D. and Reinke, P., 1997. Pentoxifylline promotes replication of human cytomegalovirus in vivo and in vitro. *Blood* 89, 3682-90.

- 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, 495-506.
- Suga, S., Yoshikawa, T., Kajita, Y., Ozaki, T. and Asano, Y., 1998. Prospective study of persistence and excretion of human herpesvirus-6 in patients with exanthem subitum and their parents. *Pediatrics* 102, 900-4.
- Sumiyoshi, Y., Kikuchi, M., Ohshima, K., Takeshita, M., Eizuru, Y. and Minamishima, Y., 1995. A case of human herpesvirus-6 lymphadenitis with infectious mononucleosis-like syndrome. *Pathol Int* 45, 947-51.
- Taddeo, B., Zhang, W., Lakeman, F. and Roizman, B., 2004. Cells lacking NF-kappaB or in which NF-kappaB is not activated vary with respect to ability to sustain herpes simplex virus 1 replication and are not susceptible to apoptosis induced by a replication-incompetent mutant virus. *J Virol* 78, 11615-21.
- 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, 3161-3.
- Takatsuka, H., Wakae, T., Mori, A., Okada, M., Fujimori, Y., Takemoto, Y., Okamoto, T., Kanamaru, A. and Kakishita, E., 2003. Endothelial damage caused by cytomegalovirus and human herpesvirus-6. *Bone Marrow Transplant* 31, 475-9.
- Takeda, K., Okuno, T., Isegawa, Y. and Yamanishi, K., 1996. Identification of a variant A-specific neutralizing epitope on glycoprotein B (gB) of human herpesvirus-6 (HHV-6). *Virology* 222, 176-83.
- Takemoto, M., Shimamoto, T., Isegawa, Y. and Yamanishi, K., 2001. The R3 region, one of three major repetitive regions of human herpesvirus 6, is a strong enhancer of immediate-early gene U95. *J Virol* 75, 10149-60.

- Taniguchi, T., Shimamoto, T., Isegawa, Y., Kondo, K. and Yamanishi, K., 2000. Structure of transcripts and proteins encoded by U79-80 of human herpesvirus 6 and its subcellular localization in infected cells. *Virology* 271, 307-20.
- Thompson, B.J., Efstathiou, S. and Honess, R.W., 1991. Acquisition of the human adeno-associated virus type-2 rep gene by human herpesvirus type-6. *Nature* 351, 78-80.
- Tiacci, E., Luppi, M., Barozzi, P., Gurdo, G., Tabilio, A., Ballanti, S., Torelli, G. and Aversa, F., 2000. Fatal herpesvirus-6 encephalitis in a recipient of a T-cell-depleted peripheral blood stem cell transplant from a 3-loci mismatched related donor. *Haematologica* 85, 94-7.
- Tokimasa, S., Hara, J., Osugi, Y., Ohta, H., Matsuda, Y., Fujisaki, H., Sawada, A., Kim, J.Y., Sashihara, J., Amou, K., Miyagawa, H., Tanaka-Taya, K., Yamanishi, K. and Okada, S., 2002. Ganciclovir is effective for prophylaxis and treatment of human herpesvirus-6 in allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 29, 595-8.
- Torre, D., Mancuso, R. and Ferrante, P., 2005. Pathogenic mechanisms of meningitis/encephalitis caused by human herpesvirus-6 in immunocompetent adult patients; *Clin Infect Dis* 41, 422-3.
- Torelli, G., Marasca, R., Luppi, M., Selliri, L., Ferrari, S., Narni, F., Mariano, M.T., Federico, M., Ceccherini-Nelli, L., Bendinelli, M., Montagnani, G., Montorsi, M. and Artusi, T., 1991. Human herpesvirus-6 in human lymphomas: identification of specific sequences in Hodgkin's lymphomas by polymerase chain reaction. *Blood* 15, 2251-8.
- Torelli, G., Barozzi, P., Marasca, R., Cocconcelli, P., Merelli, E., Ceccherini-Nelli, L., Ferrari, S. and Luppi, M., 1995. Targeted integration of human herpesvirus 6 in the p arm of chromosome 17 of human peripheral blood mononuclear cells in vivo. *J Med Virol* 46, 178-88.
- Torrisi, M.R., Gentile, M., Cardinali, G., Cirone, M., Zompetta, C., Lotti, L.V., Frati, L. and Faggioni, A., 1999. Intracellular transport and maturation pathway of human herpesvirus 6. *Virology* 257, 460-71.

- Ueda, K., Kusuhara, K., Hirose, M., Okada, K., Miyazaki, C., Tokugawa, K., Nakayama, M. and Yamanishi, K., 1989. Exanthem subitum and antibody to human herpesvirus-6. *J Infect Dis* 159, 750-2.
- Valente, G., Secchiero, P., Lusso, P., Abete, M.C., Jemma, C., Reato, G., Kerim, S., Gallo, R.C. and Palestro, G., 1996. Human herpesvirus 6 and Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease: a controlled study by polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Am J Pathol* 149, 1501-10.
- van de Stolpe, A., Caldenhoven, E., Stade, B.G., Koenderman, L., Raaijmakers, J.A., Johnson, J.P. and van der Saag, P.T., 1994. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate- and tumor necrosis factor alpha-mediated induction of intercellular adhesion molecule-1 is inhibited by dexamethasone. Functional analysis of the human intercellular adhesion molecular-1 promoter. *J Biol Chem* 269, 6185-92.
- Van den Bosch, G., Locatelli, G., Geerts, L., Faga, G., Ieven, M., Goossens, H., Bottiger, D., Oberg, B., Lusso, P. and Berneman, Z.N., 2001. Development of reverse transcriptase PCR assays for detection of active human herpesvirus 6 infection. *J Clin Microbiol* 39, 2308-10.
- van Leeuwen, L., Guiffre, A.K., Sewell, W.A., Vos, B.J., Rainer, S. and Atkinson, K., 1997. Administration of mycophenolate mofetil in a murine model of acute graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Transplantation* 64, 1097-101.
- van Loon, N.M., Gummuluru, S., Sherwood, D.J., Marentes, R., Hall, C.B. and Dewhurst, S., 1995. Direct sequence analysis of human herpesvirus 6 (HHV-6) sequences from infants and comparison of HHV-6 sequences from mother/infant pairs. *Clin Infect Dis* 21, 1017-9.
- Wang, F.Z., Linde, A., Dahl, H. and Ljungman, P., 1999. Human herpesvirus 6 infection inhibits specific lymphocyte proliferation responses and is related to lymphocytopenia after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 24, 1201-6.

- Ward, K.N. and Gray, J.J., 1994. Primary human herpesvirus-6 infection is frequently overlooked as a cause of febrile fits in young children. *J Med Virol* 42, 119-23.
- Whiteside, S.T., Ernst, M.K., LeBail, O., Laurent-Winter, C., Rice, N. and Israel, A., 1995. N- and C-terminal sequences control degradation of MAD3/I kappa B alpha in response to inducers of NF-kappa B activity. *Mol Cell Biol* 15, 5339-45.
- Wilborn, F., Brinkmann, V., Schmidt, C.A., Neipel, F., Gelderblom, H. and Siegert, W., 1994. Herpesvirus type 6 in patients undergoing bone marrow transplantation: serologic features and detection by polymerase chain reaction. *Blood* 83, 3052-8.
- Wu, Z., Mu, G. and Wang, L., 1997. Seroprevalence of human herpesvirus-6 in healthy population in two provinces of north China. *Chin Med Sci J* 12, 111-4.
- Xiao, G., Fong, A. and Sun, S.C., 2004. Induction of p100 processing by NF-kappaB-inducing kinase involves docking IkappaB kinase alpha (IKKalpha) to p100 and IKKalpha-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* 279, 30099-105.
- Xiao, G., Harhaj, E.W. and Sun, S.C., 2001. NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol Cell* 7, 401-9.
- Yakupoglu, Y.K. and Kahan, B.D., 2003. Sirolimus: a current perspective. *Exp Clin Transplant* 1, 8-18.
- 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, 1065-7.
- Yoshida, H., Matsunaga, K., Ueda, T., Yasumi, M., Ishikawa, J., Tomiyama, Y. and Matsuzawa, Y., 2002. Human herpesvirus 6 meningoencephalitis successfully treated with ganciclovir in a patient who underwent allogeneic bone marrow transplantation from an HLA-identical sibling. *Int J Hematol* 75, 421-5.

- 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, 73-84.
- Yoshikawa, T., Akimoto, S., Nishimura, N., Ozaki, T., Ihira, M., Ohashi, M., Morooka, M., Suga, S., Asano, Y., Takemoto, M. and Nishiyama, Y., 2003. Evaluation of active human herpesvirus 6 infection by reverse transcription-PCR. *J Med Virol* 70, 267-72.
- Yoshikawa, T. and Asano, Y., 2000. Central nervous system complications in human herpesvirus-6 infection. *Brain Dev* 22, 307-14.
- Yoshikawa, T., Asano, Y., Ihira, M., Suzuki, K., Ohashi, M., Suga, S., Kudo, K., Horibe, K., Kojima, S., Kato, K., Matsuyama, T. and Nishiyama, Y., 2002. Human herpesvirus 6 viremia in bone marrow transplant recipients: clinical features and risk factors. *J Infect Dis* 185, 847-53.
- Yoshikawa, T., Ihira, M., Furukawa, H., Suga, S., Asonuma, K., Tanaka, K. and Asano, Y., 1998. Four cases of human herpesvirus 6 variant B infection after pediatric liver transplantation. *Transplantation* 65, 1266-9.
- Yoshikawa, T., Ihira, M., Ohashi, M., Suga, S., Asano, Y., Miyazaki, H., Hirano, M., Suzuki, K., Matsunaga, K., Horibe, K., Kojima, S., Kudo, K., Kato, K., Matsuyama, T. and Nishiyama, Y., 2001. Correlation between HHV-6 infection and skin rash after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 28, 77-81.
- Yoshikawa, T., Nakashima, T., Asano, Y., Suga, S., Yazaki, T., Kojima, S., Mukai, T. and Yamanishi, K., 1992. Endonuclease analyses of DNA of human herpesvirus-6 isolated from blood before and after bone marrow transplantation. *J Med Virol* 37, 228-31.
- 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, 1381-4.

- Zal, B., Pinto-Basto, J., Milne, R., Li, M.S., Jeeachee, M. and Baboonian, C., 2000. Immunological analysis of the tegument phosphoprotein ppUL83 of human cytomegalovirus. *J Virol Methods* 85, 183-92.
- Zerr, D.M., Gooley, T.A., Yeung, L., Huang, M.L., Carpenter, P., Wade, J.C., Corey, L. and Anasetti, C., 2001. Human herpesvirus 6 reactivation and encephalitis in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Clin Infect Dis* 33, 763-71.
- Zerr, D.M., Corey, L., Kim, H.W., Huang, M.L., Nguy, L. and Boeckh, M., 2005. Clinical outcomes of human herpesvirus 6 reactivation after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 40, 932-40.
- Zhang, J. and Byrne, C.D., 1999. Differential priming of RNA templates during cDNA synthesis markedly affects both accuracy and reproducibility of quantitative competitive reverse-transcriptase PCR. *Biochem J* 337 (Pt 2), 231-41.
- Zhao, J., Fan, H., Mu, G., Shen, X. and Cheng, X., 1997. Detection of human herpesvirus 6 (HHV-6) DNA in salivary glands by the polymerase chain reaction. *Chin Med Sci J* 12, 126-8.

ANNEXE

Parallèlement au travail de thèse exposé dans ce manuscrit, une revue de la littérature concernant les herpèsvirus humains et le facteur nécrosant les tumeurs de type alpha (TNF- α) a été publiée.

"Inter-relation entre virus herpès humains et *tumor necrosis factor* α "

K. Pradeau, S. Collot-Teixeira, F. Denis, S. Alain, S. Ranger-Rogez

Virologie 2004, 8 : 39-51.

Dans cet article, nous avons, dans un premier temps, présenté le TNF- α , son mode d'action et son rôle dans l'organisme. Puis, dans un deuxième temps, nous avons établi les relations existant entre le TNF- α et les herpèsvirus humains. Nous avons ainsi rapporté que :

- ☞ La production de TNF- α est stimulée par les herpèsvirus
- ☞ Le TNF- α est un agent antiviral
- ☞ La réactivation du HCMV est induite par le TNF- α
- ☞ Les herpèsvirus induisent l'apoptose ou à l'inverse la prolifération cellulaire via les voies de signalisation du TNF- α

Une participation aux travaux de E. Denes et al a également été apportée.

"Successful treatment of human herpesvirus 6 encephalomyelitis in immunocompetent patient"

E. Denes, L. Magy, K. Pradeau, S. Alain, P. Weinbreck, S. Ranger-Rogez

Emerging Infectious Diseases 2004, 10 (4) : 729-31.

Ces deux articles sont présentés ici.

Réactivation de l'herpèsvirus humain de type 6 (HHV-6) : outils de détection et mécanismes moléculaires

RESUME

L'herpèsvirus humain de type 6 (HHV-6) est un virus très répandu qui reste dans l'organisme sous une forme latente après la primo-infection. Cette latence virale est entrecoupée d'épisodes de réactivation, s'accompagnant d'une production de nombreuses particules infectieuses. La réactivation semble anodine chez le sujet sain, mais peut être très grave dans différents contextes d'immunodépression, notamment après transplantation. A l'heure actuelle, les mécanismes permettant le maintien de la latence ou à l'inverse ceux entraînant la réactivation sont inconnus. L'objectif de ce travail de thèse était double. Dans un premier temps, des outils moléculaires permettant la détection de la multiplication d'HHV-6 ont été développés. Pour cela une technique de quantification par PCR en temps réel a été mise au point. De même la détection des ARNm du virus associés à sa réplication par une RT-PCR a été réalisée. Afin de tester ces outils de détection dans un contexte de réactivation, elles ont été appliquées à des prélèvements sanguins de patients transplantés. Les deux méthodes se sont alors révélées efficaces pour mettre en évidence la réactivation d'HHV-6. Puis dans un deuxième temps, l'effet de l'expression du facteur de transcription NF- κ B sur la transcription des gènes très précoces du virus a été recherché. Pour cela, un super-répresseur de NF- κ B (IkB α Mut) a été transfecté dans des cellules favorables à la croissance virale. En inhibant la voie canique de signalisation de NF- κ B, une diminution de la réplication du virus, mise en évidence par une baisse de la transcription des ARNm viraux à l'aide d'une technique de RT-PCR quantitative et par une réduction du nombre de cellules en immunofluorescence, a été observée. Un rôle important du facteur de transcription NF- κ B dans la multiplication du virus HHV-6 a ainsi été démontré.

Mots clés : HHV-6, réactivation, PCR quantitative multiplex en temps réel, RT-PCR, facteur de transcription NF- κ B

Human herpesvirus 6 (HHV-6) reactivation: detection methods and molecular mechanisms

ABSTRACT

Human herpesvirus 6 (HHV-6) is a widespread virus that remains for life in a latent state after primary infection. But HHV-6 may reactivate, producing many infectious particles. This reactivation seems harmless in healthy subject, but can be very serious in various contexts of immunosuppression, such as organ transplant recipients. Actually, the mechanisms allowing the maintenance of latency or contrary those involving the reactivation are unknown. The objective of this work was double. In the first time, molecular methods to detect HHV-6 multiplication were developed: a real time quantitative PCR method and a RT-PCR assay allowing the detection of viral mRNAs associated with HHV-6 replication were carried out. In order to test these detection techniques in a context of reactivation, they were applied to blood samples from transplanted patients. The two methods were proved to be effective to highlight the reactivation of HHV-6. Then in the second time, the effect of NF- κ B transcription factor on immediate early genes transcription of HHV-6 was investigated. For this purpose, a NF- κ B super-repressor (IkB α Mut) was transfected in cells permissive to HHV-6 growth. By inhibiting the canonical pathway of NF- κ B induction, a reduction in the replication of the virus, demonstrated by a decrease in viral mRNA transcription using a quantitative RT-PCR method and by a reduction in the number of infected cells using an immunofluorescence assay, was observed. Thus an important role for NF- κ B transcription factor in the multiplication of virus HHV-6 was shown.

Key words: HHV-6 reactivation, multiplex quantitative real-time PCR, RT-PCR, NF- κ B transcription factor