

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Bio-Santé N°524

FACULTE DE MEDECINE DE LIMOGES

UMR 7276 CNRS

Thèse n° [...]

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie, Sciences, Santé

Spécialité : Immunologie, oncologie et infectiologie

Présentée et soutenue publiquement par :

Mustafa AL JAWHARI

Le 31 janvier 2014

***Intégration génomique de l'herpèsvirus humain de type 6
(HHV-6) : étude des modifications chromosomiques
associées et de l'éventuelle réactivation en présence de
drogues***

Thèse dirigée par le Professeur Sylvie ROGEZ ; Co-directeur : Dr Jeanne COOK-MOREAU

Jury :

Président

Mme Catherine Yardin, Professeur Universitaire-Praticien Hospitalier, Limoges.

Rapporteurs

M. Henri AGUT, Professeur Universitaire-Praticien Hospitalier, Paris.

M. Vincent DESCAMPS, Professeur Universitaire-Praticien Hospitalier, Paris.

Examineurs

Mme Jeanne COOK-MOREAU, MCU, Limoges.

Mme Radhia M'KACHER, HDR, Paris

Mme Sylvie ROGEZ, Professeur Universitaire-Praticien Hospitalier, Limoges.

Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier les Professeurs Michel Cogne et Jean Feuillard, qui m'ont accueilli dans leur service.

Je tiens à remercier le Professeur Sylvie Rogez de m'avoir accompagné et encadré tout au long de ma thèse.

Je remercie également Jeanne Cook Moreau pour ses nombreux conseils.

Mes remerciements s'adressent également au Dr. Radhia M'KACHER qui m'a aidé généreusement et Luc qui a participé aussi à ce travail. Merci à Madame Laure Sabatier, directeur du laboratoire LRO à l'IRSN, au Pr. Catherine Yardin de m'avoir permis d'effectuer des manipulations au sein de son laboratoire.

Pr. Henri AGUT et Pr. Vincent DESCAMPS, merci d'avoir accepté d'être parmi le jury de ma thèse en tant que rapporteur.

Je tiens à remercier également la région du Limousin pour le soutien financier.

J'adresse aussi mes remerciements au Pr. Nathalie Gachard et au Pr. Arnaud Jaccard du service d'hématologie du CHU de limoges. Merci à Claire LaForest et Estelle Troixdec.

Je n'oublie pas de remercier les techniciennes du service d'hématologie du CHU de limoges, les techniciens du service de virologie du CHU de limoges, les techniciennes de l'hôpital mère- enfant et les techniciennes du LRO du CEA-IRSN à Fontenay-aux-Roses.

Je tiens également à remercier Mme Sylvie Delbasse, Mme Roselyne Mozet, Martine Gatet et Mr Bertrand Courtioux.

Merci à tous mes collègues surtout Rima Zein El Din et Mona Farhat. Merci à Faten Saad, Hazar Almouhammad. Bassel, Adnan et Nor.

Un grand merci pour toute ma famille, surtout mes grands-parents, papa, maman, ma sœur Soha, mon frère Mohamad-Hussein et ma chérie Nour, je ne m'imagine jamais être capable de finir ce travail sans leur support et leur amour.

Abréviations

A

AAV: adeno associated virus
ACV: aciclovir
ADN: acide désoxyribonucléique
AHS : anticonvulsant hypersensitivity syndrome
AITL: angioimmunoblastic lymphomes
ALT: alternative lengthening telomeres
amoles: attomoles
APB: ALT-associated PML
ARNm: acide ribonucléique messager
ATF: ativating transcription factor
ATM: ataxia telangiectasia mutated
ATP: adénosine-5'-triphosphate
ATR: ataxia telangiectasia and Rad3 related

B

BMT: bone marrow transplant
BSA: Bovine Serum Albumin

C

CBMCs : cordon blood mononucleus cells
CD: complexe d'immunocompatibilité
CDB: cassure double brin
CDV: cidofovir
CHU: centre hospitalier et universitaire
CIHHV-6: chromosomally integrated HHV-6
CMV: cytomégalovirus
CMV423 : 2-chloro-3-pyridin-3yl-5,6,7,8-tetrahydroindolizine-1-carboxamide.
CSB: cassure simple brin
CT low: low concentration
Cy3: Cyanine 3
CycG1: CyclineG1

D

DAPI: 4',6'-diamidino-2-phénylindole
DCK1: dyskérine 1

dCMP : déoxycytosine monophosphate
dCTP: désoxytidine triphosphate
dGTP: désoxyguanosine triphosphate
dGMP: désoxyguanosine monophosphate
DIG: Digoxigenin
DIHS : drug-induced hypersensitivity syndrom
DR: direct repeats
DRESS: drug reaction (ou rash) with eosinophilia and systemic symptoms
DRL: direct repeats left
DRR: direct repeats right
dntp: désoxy-adénine triphosphate

E

E: early
EBV: Epstein - Barr virus
ECP: effet cytopathogène
ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay
ERK1/2: extracellular signal-regulated kinases ½
ES: exanthème subit

F

FAM: 6-carboxyfluorescein
FCS: fetal calf serum
FISH: fluorescent immunostaining hybridation
FITC: isothiocyanate de fluorescéine

G

GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate désydrogénase
GCV: ganciclovir
gp: glycoprotéine
GVHD: graft-versus-host disease
Gy: Gray

H

HBLV: human B-lymphotropic herpesvirus
HCMV: human cytomegalovirus
HDACi: histone deacetylase inhibitor
HDF: human diploid fibroblasts
HDP-CDV: hexadécyloxypropyl-cidofovir
HEPES: acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HHV: human herpes Virus
HLA: human leucocyte antigen
HPV: papillomavirus humains
hTERT: human telomerase reverse transcriptase
gH2AX: gamma phosphorylated histone 2A
HPRT1: hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 1 human
hTERT: human telomerase reverse transcriptase
hTR : telomerase RNA compone

I

Id2: inhibitor of DNA binding 2
IE: immediate early
IFA: immunofluorescence assay
IFN-γ: interféron-γ
Ig: immunoglobuline
IL: immediate Late
IS: Internal Standard
ITR: répétitions terminales inversées

K

Kb: kilobase
KSHV: *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*

L

L: late
LANA: antigène nucléaire associé à la latence

LCL: lymphoblastoid cell line
LDGCB: lymphome B diffus à grandes cellules
LEMP: leucoencéphalopathie multifocale progressive
LTR: long terminal repeat

M

MAPK: mitogen-activated protein kinases
MCP: major capsid protein
MDV: Marek disease des volailles
M-FISH: multi-FISH
Mms21: non-structural maintenance of chromosomes element 2 homolog
mTOR: mammalian target of rapamycin
MYC-MAX: facteur X associé à MYC

N

NAWM: substance blanche d'apparence normale
NEB: New England Biolabs
NDP: nucléoside diphosphate
NFKB: nuclear factor kappa B
NFX: nuclear factor X box-binding protéin
NK: natural killer
Nse2: non-Smc element-2

O

OBP: origine binding protein
ORF: open reading frame
ori-lyt: origine de replication lytique

P

PBS: Phosphate Buffer Saline
PCR: polymerisation chain reaction
PHA: phytohémagglutinine

PHFAs: astrocytes humains fœtaux primaires
PINX1: PIN2/TRF1-interacting télomerase inhibitor 1
PML: promyelocytic leukemia
PNA: peptide nucleic acids
POT: protection of telomers
PBMCs: peripheral blood mononuclear cells
PKC: protein kinase C
PHA: phytohémagglutinin
PIKK: phosphatidylinositol-3-OH-kinase-like
PML: promyelocytic leukemia
PPD: para-phénylènediamine
pRB: protéine du rétinoblastome

R

RAP: repressor/activator protein
RH: recombinaison homologue
RS: Reed-Sternberg
RTA: activité relative de la télomérase
RT-PCR: reverse transcriptase-polymerisation chain reaction

S

SB: sodium butyrate
SCE: échange de télomères entre les chromatides sœurs
SCP: small capsid protein
SESNI: sestrin 1
SIDA: syndrome d'immunodéficience acquise
SNC: système nerveux central
SOT: solid organ transplant
Ssc: saline-sodium citrate buffer
Sset: saline-sodium citrate buffer Tween
SUMO-ligase: small ubiquitin-related modifier ligase
SVF: sérum de veau fœtal

T

TA: température ambiante
TAMRA: 6-carboxytetramethylrhodamine
TIN2: TRF1-interacting nuclear protein 2
TK: thymidine kinase
TMB: 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine
TNF: tumor necrosis factor
TPA: 12-O-tétradecanoylphorbol-13-acetate
TPP1: TIN2-interacting protein 1
TRAP: telomere repeat amplification protocol
TRF: thyrotropin-releasing factor
TRS: telomere repeat sequences
trs: terminal resolution site
TSA: trichostatine

U

U: région unique
UK: United Kingdom
USA: United States of America
USF: Upstream Stimulating Factor
UV: ultraviolet

V

val-ACV: valacyclovir
val-GCV: valganciclovir
VCV: valganciclovir
VIIH: Virus de l'immunodéficience humaine
vTR: télomérase virale
VZV: Varicelle and Zona virus
VPA: valproate de sodium

Z

ZMAT3: zinc finger, matrin-type 3

Table des matières

INTRODUCTION	9
INTRODUCTION GÉNÉRALE	10
PARTIE 1 : L'HERPESVIRUS HUMAIN DE TYPE 6	11
I. HERPESVIRUS : CLASSIFICATION.....	11
II. DECOUVERTE	13
III. MORPHOLOGIE DE L'HHV-6.....	14
IV. STRUCTURE GENOMIQUE	15
V. TROPISME	19
VI. CYCLE REPLICATIF	20
VI.1. <i>Attachement, entrée dans la cellule hôte</i>	20
VI.2. <i>Transcription et production de protéines virales</i>	21
VI.3. <i>Clivage, encapsidation</i>	23
VI.4. <i>Bourgeoisement et libération du virion</i>	23
VII. EFFET DU VIRUS SUR LES CELLULES HOTES	24
VIII. EPIDEMIOLOGIE, TRANSMISSION	26
IX. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFECTION ET PATHOLOGIE ASSOCIEE.....	27
IX.1. <i>Infection primaire</i>	27
IX.2. <i>Persistance</i>	28
IX.3. <i>Latence</i>	28
IX.4. <i>Réactivation</i>	29
X. PATHOLOGIES ASSOCIEES A L'INFECTION PAR HHV-6	29
X.1. <i>Maladies associées à la primo-infection</i>	29
X.2. <i>Maladies associées à la latence et/ou à la réactivation de l'HHV-6</i> :.....	30
XI. DIAGNOSTIC.....	35
XI.1. <i>Diagnostic direct</i>	35
XI.2. <i>Diagnostic indirect : Sérologie</i>	37
XII. TRAITEMENTS	37
XII.1. <i>Thérapie antivirale</i>	37
XII.2. <i>Efficacité et avenir</i>	42
PARTIE 2 : INTÉGRATION CHROMOSOMIQUE DE L'HHV-6	44
I. INTRODUCTION GENERALE	44
II. DECOUVERTE	44

III.	PREVALENCE	45
IV.	DIAGNOSTIC.....	46
	<i>IV.1. Biologie moléculaire</i>	47
	<i>IV.2. Hybridation in situ</i>	48
V.	ACQUISITION DU CIHHV-6.....	48
	<i>V.1. Hérité</i>	48
	<i>V.2. Transplantation</i>	50
VI.	REACTIVATION DU CIHHV-6.....	50
VII.	MECANISME DE L'INTEGRATION.....	52
VIII.	U94REP ET REP68/78.....	55
	<i>VIII.1. Rep 68/78 de l'AAV-2</i>	55
	<i>VIII.2. U94 de l'HHV-6</i>	56
IX.	STRUCTURE DU VIRUS INTEGRE	59
X.	PATHOLOGIES ASSOCIEES	59
XI.	LE TELOMERE	62
	<i>XI.1. Problème de la réplication des extrémités d'ADN</i>	62
	<i>XI.2. La télomérase</i>	63
	<i>XI.3. Complexe de Shelterin</i>	67
	<i>XI.4. ALT</i>	69
XII.	VIRUS ET TELOMERES.....	73
PARTIE 3 : SYNDROME D'HYPERSENSIBILITÉ MÉDICAMENTEUSE		78
I.	HISTORIQUE : DEFINITION ET NOMENCLATURE	78
II.	EPIDEMIOLOGIE	79
III.	SYMPTOMES ET PROGRESSION CLINIQUE	80
IV.	DIAGNOSTIC.....	82
V.	PATHOGENESE ET IMPLICATION VIRALE	84
VI.	ROLE DE L'HHV-6 DANS LE DRESS	85
VII.	PREVENTION ET TRAITEMENT	88
OBJECTIFS.....		89
TRAVAIL EXPÉRIMENTAL.....		90
INTRODUCTION AUX ARTICLES I ET II.....		91
ARTICLE I : SALIVA POLYMERASE CHAIN REACTION ASSAY FOR DETECTION AND FOLLOW-UP OF HERPESVIRUS REACTIVATION IN PATIENTS WITH DRUG REACTION WITH EOSINOPHILIA AND SYSTEMIC SYMPTOMS (DRESS).		95

ARTICLE II: LACK OF SIGNIFICANT REACTIVATION OF CHROMOSOMALLY INTEGRATED HHV-6B IN B LYMPHOBLASTOID CELL LINE IN PRESENCE OF FOUR DRUGS RESPONSIBLE FOR DRESS.....	101
DISCUSSION DES ARTICLES I ET II	122
TRAVAUX D'ARTICLE III.....	125
I. INTRODUCTION.....	125
II. MATÉRIELS.....	132
III. MÉTHODES.....	133
III.1. PCR QUANTITATIVE	133
III.2. TYPAGE DU VIRUS HHV-6	133
III.3. OBTENTION DES LIGNEES CELLULAIRES.....	134
III.4. OBTENTION DE METAPHASES.....	134
III.4.1. A partir de PBMC	134
III.4.2. A partir de cultures de lignées cellulaires	136
III.5. SYNTHÈSE DE LA SONDE DE L'HHV-6	136
III.6. FISH (FLUORESCENCE <i>IN SITU</i> HYBRIDIZATION)	138
III.6.1. Détection de l'ADN du CIHHV-6	138
III.6.2. Doubles marquages, virus/chromosome	138
III.6.3. Marquage des télomères et centromères	138
III.6.4. Double marquage virus-subtélomères.....	139
III.6.5. Multi-FISH.....	140
III.7. IMMUNOFLUORESCENCE, ETUDES DE L'EXPRESSION DES PROTEINES IMPLIQUÉES DANS LA SIGNALISATION DES DOMMAGES A L'ADN	141
III.8. IRRADIATION	142
III.9. QRT-PCR, DETECTION DES TRANSCRITS CODANT DES PROTEINES INDUITES PAR P53	142
III.10. ACTIVITE DE LA TELOMERASE	143
IV. RÉSULTATS	146
IV.1. DETECTION DU CIHHV-6.....	146
IV.1.1 . « Screening » par qPCR.....	146
IV.1.2 Détection du CIHHV-6 par FISH	146
IV.2. LOCALISATION DU CIHHV-6	148
IV.3. OBTENTION DES LIGNEES	151
IV.4. ETUDE DE DYSFONCTIONNEMENT TELOMERIQUE	151
IV.4.1. Quantification des aberrations télomériques : délétion perte et doublet	151

IV.4.2. Perte dans la région subtélomérique au niveau du chromosome porteur du virus.....	152
IV.4.3 Mesure de l'activité de la télomérase	156
IV.5. LES ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES	158
IV.6. EXPRESSION BASALE DES PROTEINES IMPLIQUEES DANS LA REPARATION DES CASSURES DOUBLE BRIN	160
IV.7. RADIOSENSIBILITE DES LIGNEES, EXPRESSION GENIQUE	161
V. DISCUSSION DE L'ARTICLE III.....	163
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	169
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	172

Liste des figures

Figure 1 : Ultrastructure des herpèsvirus.....	15
Figure 2 : Représentation schématique de l'organisation du génome de l'HHV-6.....	17
Figure 3 : Distribution des blocs de gènes de l'HHV-6B.	18
Figure 4 : Schéma représentatif de contrôle d'expression des gènes viraux.....	22
Figure 5 : Cycle réplcatif de l'HHV-6.	24
Figure 6 : Effet cytopathogène de l'HHV-6A sur cellules lymphoblastoïdes HSB-2 (grossissement x200).....	25
Figure 7 : Exanthème subit chez un nourrisson causé par l'HHV-6B.....	30
Figure 8 : Détection de l'HHV-6 par immunofluorescence en FITC (vert).....	36
Figure 9 : Guanosine Vs les analogue nucléosidiques, ganciclovir et aciclovir	39
Figure 10 : Mécanisme d'action des 4 principales molécules anti-HHV-6.	41
Figure 11 : Schéma d'un chromosome métaphasique.....	45
Figure 12 : Marquage (en vert) du CIHHV-6 par FISH.....	48
Figure 13 : séquences terminales répétées de l'HHV-6.	53
Figure 14 : mécanisme de l'intégration du génome de l'HHV-6 au niveau des télomères chromosomiques.....	54
Figure 15 : (a) Représentation schématique du génome d'AAV-2.....	56
Figure 16 : Les différentes hypothèses des conséquences d'HHV-6 sur la cellule hôte.	61
Figure 17 : Représentation schématique du problème de la réplcation des extrémités d'ADN.	63
Figure 18 : La télomérase.	64
Figure 19 : Mécanisme de l'intervention de la télomérase dans la réparation des extrémités télomériques (protozoaire).	66

Figure 20 : Représentation schématique de la structure moléculaire du télomère.	69
Figure 21 : Complexe moléculaire présent lors du rallongement des télomères par la voie ALT.	71
Figure 22 : Mécanisme alternatif de rallongement des télomères indépendant de la télomérase. (a) Unequal T-SCE; (b) recombinaison homologe dépendante de la réplication d'ADN.....	72
Figure 23 : Cycle Cellulaire.	76
Figure 24 : Progression clinique et biologique d'un DRESS.	81
Figure 25 : Les deux hypothèses possibles lors du DRESS.....	87
Figure 26 : Schéma représentatif d'une réponse aux dommages de l'ADN.....	130
Figure 27 : Principe de la technique de mesure de l'activité relative de la télomérase.	145
Figure 28 : Marquage FISH du HHV-6 en FITC (vert) à partir des métaphases des patients CDA et GAN.	147
Figure 29 : Exemple de double marquage HHV-6 (en vert)/centromère (cep) du chromosome portant le virus intégré, effectué sur les lignées CDA, DPL et GAN et les PBMC du CoAN.	148
Figure 30 : Exemple de double marquage HHV-6 (en vert)/subtélomère du chromosome portant le virus intégré (en rouge), effectué sur les patientes CoAN et JOD.....	149
Figure 31 : Marquage métaphasique de la patiente GAN. (a) Marquage télomère /centromère. (b) Marquage CIHHV-6(vert)/subtélomère du chromosome 20 (rouge).....	153
Figure 32 : Marquage de la totalité des télomères et centromères. L'exemple de la lignée CDA et la patiente JOD.....	154
Figure 33 : Etude de l'instabilité au niveau des télomères. Résultats exprimés en pourcentage de survenue des 3 aspects, délétion, perte ou doublement du télomère.....	155
Figure 34 : Exemple de la perte survenue dans la région subtélomérique du chromosome porteur du virus pour la patient CoAN (virus en vert et subtélomère en rouge) et dans la lignée GAN (virus en rouge et subtélomère en vert).	156
Figure 35 : (a) Activité relative de la télomérase; CT Low est l'activité de la télomérase mesurée pour l'échantillon contrôle. Elle est égale à 100% et sert de référence pour la mesure de l'activité relative	

de la télomérase pour les deux lignées CoAN et DPL avec deux quantités différentes de protéines, 0,5 et 1 µg. (b) Un zoom sur le graphe (a) montrant l'activité de l'échantillon référence CT Low de 100%.
..... 157

Figure 36 : (a) Exemple d'un dicentrique des chromosomes 13 présent au sein du génome de la patiente CoAN (à gauche, marquage M-FISH, à droite marquage des télomères/centromères). (b) Exemple de la délétion récurrente au niveau du chromosome 2 porteur de CIHHV-6 chez la patiente JOD (à gauche, coloration M-FISH, à droite marquage simple du CIHHV-6 en vert). 160

Figure 37 : L'expression des protéines γ H2AX, 53BP1, PML et ATM sur 1000 cellules pour chacune des lignées CoAN, GAN et DPL, mise en évidence par immunofluorescence..... 161

Figure 38 : Variation du niveau d'expression des transcrits de GycG1, PUMA, P21, ZMAT3, SESN1 dans des lignées irradiées à 2Gy, exprimée en nombre de fois par rapport à celle obtenue pour des cellules non irradiées, 2h et 24 h après irradiation..... 162

Liste des Tableaux

Tableau I : Caractéristiques des 8 herpèsvirus humains	12
Tableau II : Récapitulatif des cas de CIHHV-6 rapportés dans la littérature.	46
Tableau III : Caractéristiques de la protéine U94 de l'HHV'6 et des protéines Rep68 et Rep68/78 de l'AAV-2.....	58
Tableau IV : Médicaments susceptibles de déclencher un syndrome de DRESS (liste non exhaustive)79	
Tableau V : Les critères de diagnostic du DRESS selon diverses classifications.	83
Tableau VI : Critères du diagnostic d'un DRESS.....	91
Tableau VII : Répartition des 249 patients d'hématologie en fonction de leurs pathologies.....	132
Tableau VIII : Amorces utilisées pour la synthèse de la sonde HHV-6.	137
Tableau IX : Tableau récapitulatif des résultats obtenus pour les 5 patients positifs.	150
Tableau X : Tableau récapitulatif des aberrations observées chez les patients JOD, CDA et CoAN et dans les deux lignées GAN et DPL détectées par M-FISH.	159

INTRODUCTION

Introduction générale

L'herpèsvirus de type 6 est un virus ubiquitaire qui infecte presque 100% de la population mondiale. Le virus est responsable de la roséole infantile chez les nourrissons. Il est lié à des symptômes graves chez les immunodéficients alors que l'infection des adultes immunocompétents est généralement asymptomatique.

Les HHV-6A et B ont la particularité de pouvoir s'intégrer dans le génome humain. Cette forme de virus a été baptisée « CIHHV-6 » (chromosomally integrated HHV-6). Le CIHHV-6 est retrouvé dans toutes les cellules nucléées du corps au niveau des télomères de deux chromatides sœurs. Il est transmis verticalement par l'hérédité.

A ce jour, le mécanisme d'intégration de l'HHV-6 reste à élucider et le CIHHV-6 n'est toujours pas lié à aucune pathologie alors que la prévalence de cette forme de virus dans la population mondiale est estimée de 1 à 2%.

La taille du génome viral (environ 160 Kb) intégrant le chromosome humain nous a intrigué et poussé à nous demander si cette intégration passerait inaperçue ou à l'inverse, elle pourrait induire des instabilités quelconques dans le génome intégré surtout qu'elle semble avoir lieu au niveau des télomères connus pour leur fonction à assurer l'instabilité du chromosome et donc du génome.

En général, une réactivation de l'HHV-6 latent dans certaines circonstances peut conduire à de graves complications notamment chez les patients transplantés.

Bien que la réactivation de certains herpèsvirus (EBV, CMV, HHV-7) ait été rapportée lors de la maladie du DRESS, la réactivation accrue de l'HHV-6 a souvent été observée durant ce syndrome d'hypersensibilité médicamenteuse.

Normalement, lorsqu'un HHV-6 est en stade de latence, son ADN est présent dans le noyau de la cellule hôte sous une forme épisomale circulaire. Depuis la découverte de la forme intégrée de l'HHV-6, elle était considérée comme un stade de latence n'aboutissant pas à la formation de virions. Alors nous étions curieux pour savoir si des médicaments incriminés dans le DRESS pourraient faire réactiver le CIHHV-6 ou pas.

PARTIE 1 : L'HERPESVIRUS HUMAIN DE TYPE 6

I. Herpèsvirus : classification

Les herpèsvirus appartiennent à la famille des *Herpesviridae* dont les membres ont en commun notamment la structure des virions. Environ 100 herpèsvirus ont été caractérisés, infectant les animaux ou les humains (Braun *et al.*, 1997). A ce jour, 8 virus sont identifiés comme étant strictement humains (Tableau I).

En se reposant sur certains critères dont la structure du génome, le pourcentage de GC de la séquence nucléotidique, les sites de latence et le tropisme *in vitro*, les herpèsvirus humains sont classés en trois sous-familles : α , β et γ et 6 genres (De Bolle *et al.*, 2005)

Les *Alphaherpesvirinae* comportent : les herpès simplex virus de type 1 (HSV-1) et de type 2 (HSV-2) ainsi que le virus de la varicelle et du zona (VZV). Ces virus sont neurotropes et ont un cycle répliatif court, d'environ 15 à 18h heures pour HSV et de 9 à 12 heures pour VZV (Reichelt *et al.*, 2009). Les *Betaherpesvirinae* regroupent le cytomégalovirus humain (HCMV), l'herpèsvirus humain de type 6 (HHV-6), et l'herpèsvirus humain de type 7 (HHV-7). Ces virus sont lymphotropes et ont un cycle répliatif relativement long (48-72 heures). Les *Gammaherpesvirinae* comprennent le virus d'Epstein-Barr (EBV) et l'herpèsvirus humain de type 8, lié au sarcome de Kaposi (HHV-8 initialement appelé KSHV). Ils infectent spécifiquement les lymphocytes B et les cellules épithéliales avec un cycle de répliation d'environ 48 à 72h.

Les herpèsvirus humains sont caractérisés par leur capacité à rester dans un état de latence ou de persistance dans l'hôte qu'ils infectent, puis à se réactiver ultérieurement notamment pendant des épisodes d'immunosuppression (Krueger et Ablashi, 2003).

Famille	Sous-familles	Genres	Virus	Taille du génome	Culture <i>in vitro</i>	Principaux sièges de la latence	Principales pathologies associées
Herpesviridae humains	<i>Alphaherpesvirinae</i>	Simplexvirus	HHV-1 (HSV-1)	152 kb	Nombreux systèmes cellulaires	Neurones, ganglions sensitifs	Lésions faciales, labiales et oculaires, encéphalites
			HHV-2 (HSV-2)				Lésions génitales, herpès néonatal disséminé,
		Varicellovirus	HHV-3 (VZV)	126 kb			Fibroblastes humains
	<i>Betaherpesvirinae</i>	<i>Roseolovirus</i>	HHV-6	140-170 kb	Lymphocytes et lymphoblastes humains	Monocytes	Roséole infantile
			HHV-7	145-153 kb		Lymphocytes, cellules endothéliales	Non formellement associé à une maladie
		Cytomégalovirus	HHV-5 (HCMV)	229 kb	Fibroblastes humains	Cellules hématopoiétiques CD34+, monocytes	Syndrome mononucléosique, infections congénitales
	<i>Gammaherpesvirinae</i>	<i>Lymphocryptovirus</i>	HHV-4 (EBV)	172 kb	Lignées cellulaires de lymphocytes B	Lymphocytes B	Mononucléose infectieuse, lymphome de Burkitt, lymphome de Hodgkin, carcinome nasopharyngé
		<i>Rhadinovirus</i>	HHV-8	140 kb			Sarcome de Kaposi, lymphome des séreuses, maladie de Castleman,

Tableau I : Caractéristiques des 8 herpèsvirus humains

II. Découverte

En 1986, Salahuddin et ses collaborateurs ont été les premiers à isoler et caractériser un nouvel herpèsvirus à partir de cellules mononucléées du sang périphérique de 6 patients souffrant de désordres lymphoprolifératifs, dont deux étaient aussi porteurs du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Salahuddin *et al.*, 1986). Ce nouveau virus isolé s'est révélé être un herpèsvirus, différent des autres herpès sur les plans génomique et antigénique ainsi que pour ses propriétés de croissance. Le virus a été nommé initialement «HBLV» (Human B-Lymphotropic herpèsvirus), à cause de son tropisme pour les cellules B *in vitro* (Josephs *et al.*, 1986). Cependant d'autres études ont mis en évidence un tropisme préférentiel pour les lymphocytes T CD4+. Par conséquent, il a été rebaptisé HHV-6, une appellation indépendante du tropisme cellulaire du virus (Ablashi *et al.*, 1987; Lusso *et al.*, 1988).

Ultérieurement et en se basant sur des critères moléculaires et biologiques, deux groupes d'isolats d'HHV-6 ont été distingués (Schirmer *et al.*, 1991). Ils diffèrent par les séquences nucléotidiques de leurs génomes, le profil de restriction par les endonucléases, leur réactivité vis-à-vis d'anticorps monoclonaux spécifiques et par leurs propriétés de croissance *in vitro* (Ablashi *et al.*, 1991). En conséquence, ils ont été désignés comme deux types différents, nommés HHV-6A et HHV-6B (Dominguez *et al.*, 1999).

Des souches prototypes ont été identifiées pour chacun des deux types d'HHV-6 :

➤ Pour l'HHV-6A :

- La souche « GS », isolée aux Etats-Unis, à partir d'un patient atteint de désordre lymphoprolifératif (Salahuddin *et al.*, 1986).
- La souche « U1102 », issue d'un patient originaire d'Ouganda et séropositif pour le VIH (Downing *et al.*, 1987).

➤ Pour l'HHV-6B :

- La souche « HST », isolée à partir d'un patient japonais atteint d'exanthème subit (Yamanishi *et al.*, 1988).
- La souche « Z29 », issue d'un patient originaire de Zambie et séropositif pour le VIH (Lopez *et al.*, 1988).

III. Morphologie de l'HHV-6

Le diamètre du virion de l'HHV-6 est d'environ 200nm (2000 Angstroms) (Biberfeld *et al.*, 1987; Yoshida *et al.*, 1989). Comme pour tous les herpèsvirus, son ultrastructure est composée de quatre éléments structuraux (Figure 1) (Pellett et Dominguez, 2001):

- Un core cylindrique, dense aux électrons, d'environ 60 nm de diamètre contenant le génome viral sous forme d'un ADN bicaténaire, linéaire,
- Une nucléocapside de symétrie icosaédrique de diamètre allant de 90 à 110 nm. La protéine « MCP » (Major Capsid Protein) constitue la structure de base des blocs de capside. Les protéines MCP sont arrangées en 150 hexamères et 12 pentamères soit 162 capsomères. D'autres composants minoritaires de la capside comprennent par exemple la « SCP » (Small Capsid Protein) et la protéase virale.
- Un tégument se présentant sous forme d'une couche fibreuse dépourvue de structure apparente, composé d'un mélange de phosphoprotéines (U11, U14, U25...) et d'enzymes nécessaires à la réplication de l'ADN. Cette couche occupe l'espace entre l'enveloppe et la nucléocapside avec une épaisseur comprise entre 20 et 40 nm,
- Une enveloppe composée d'une bicouche lipidique dérivée de la membrane de la cellule hôte, dans laquelle des glycoprotéines virales sont encastrées (gB, gM, gN, gO, gH, gL et gQ) et jouent un rôle dans l'adsorption du virus et la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire, ce qui permet la pénétration du virus dans la cellule

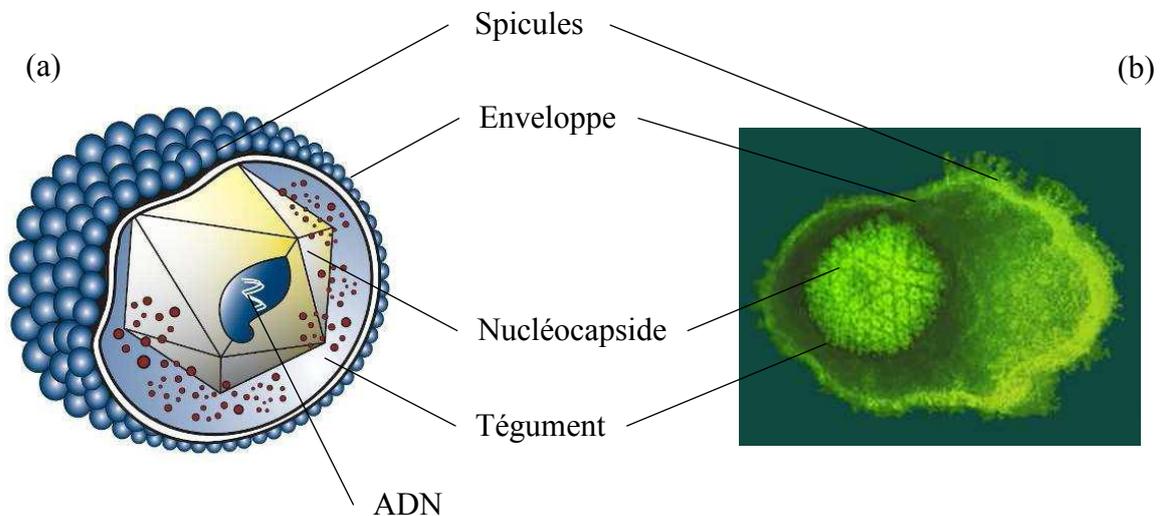


Figure 1 : Ultrastructure des herpesvirus

(a), représentation schématique (http://www.nishikigoionline.com/phpbb2/album_pic.php?pic_id=13572)

(b), photographie en microscopie électronique (<http://web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/hsv-3bc.gif>)

IV. Structure génomique

Les ADN viraux de deux souches d'HHV-6B (Z29 et HST) et de la souche U1102 d'HHV-6A, ont été entièrement séquencés (Gompels *et al.*, 1995; Dominguez *et al.*, 1999; Isegawa *et al.*, 1999). Le génome de l'HHV-6 est composé d'une molécule d'ADN double brin linéaire de 160 kb pour le type B et 162 kb pour le virus type A. L'architecture génomique (Figure 2) consiste en un segment central d'environ 141 kb de séquence unique « U », flanqué de deux répétitions directes terminales, orientées dans le même sens, appelées DRL (*Direct Repeats Left*) et DRR (*Direct Repeats Right*) de 8 à 9 kb, (selon le nombre de passage du virus *in vitro*). La séquence unique est interrompue par trois répétitions intermédiaires R1, R2 et R3, dans la région IE-A (*immediate early A*). Les répétitions directes contiennent des éléments génétiques qui sont nécessaires pour la réplication et l'encapsidation de l'ADN viral (Lindquister et Pellett, 1991). Les DR comprennent aussi deux petits blocs de séquences répétées en tandem, similaires à celles trouvées au niveau des télomères des chromosomes humains (TTAGGG)_n, appelés TRS (*Telomere Repeat Sequences*) (Thomson *et*

al., 1994). Il a été supposé que ceci pourrait intervenir dans l'intégration virale dans le génome humain. Cette hypothèse sera discutée plus en détail dans la partie « intégration de l'HHV-6 dans le génome humain ». Aux extrémités du génome, il existe des éléments *pac1* et *pac2* adjacents aux motifs répété (TTAGGG)_n. Ils permettent la circularisation du génome (par une simple liaison de tête-à-queue) en formant une jonction (*pac2-x-pac1*) où x est un site putatif de clivage jouant un rôle dans l'encapsidation du génome.

Le génome de l'HHV-6B contient 97 gènes codant 119 cadres de lecture ouverts (ORFs), dont 9 absents chez l'HHV-6A, nommés B1 à B9 (Figure 3). En même temps, 9 autres ORFs de l'HHV-6A n'ont pas de correspondance chez l'HHV-6B, du fait de mutations dans le cadre de lecture (Dominguez *et al.*, 1999). Les ORFs encodés dans les répétitions directes terminales sont identifiés par le préfixe « DR » allant de DR1 à DR7, alors que ceux de la région unique sont nommés « U » pour « unique », allant de U1 à U100, à partir de l'extrémité gauche du génome.

Plusieurs gènes de l'HHV-6 sont conservés et présents dans le génome de tous les herpesvirus. Ils sont regroupés en 7 blocs (annotés de I à VII) au sein de la région unique. Ils codent principalement des protéines structurales du virion et des enzymes nécessaires pour le métabolisme nucléotidique. Un bloc supplémentaire comportant 17 gènes (U2 à U19) est spécifique aux β -herpesvirinae. Il existe également des gènes spécifiques aux roseolovirus comme par exemple U20-21, U23-24, U26, U85 et U100. Enfin deux gènes sont spécifiques aux deux HHV-6 : U83 et U94. U83 code une chimiokine fonctionnelle jouant un rôle important dans la propagation de l'HHV-6 *in vivo*, par l'activation et l'acheminement des cellules mononucléées vers les sites de la réplication virale (Zou *et al.*, 1999). Le produit du gène U94, lui, joue un rôle dans la régulation de l'expression des gènes viraux, permettant d'instaurer et/ou maintenir l'état d'infection latente (Rotola *et al.*, 1998).

Dans l'ensemble, l'homologie de séquence nucléotidique entre l'HHV-A et l'HHV-6B est de 90%, ce pourcentage variant en fonction des régions. Certaines régions sont conservées entre les deux types à plus de 95% (U94, 98%), et d'autres montrent des divergences plus élevées, avec une homologie inférieure à 75% (IE-1, 31%) (Dominguez *et al.*, 1999).

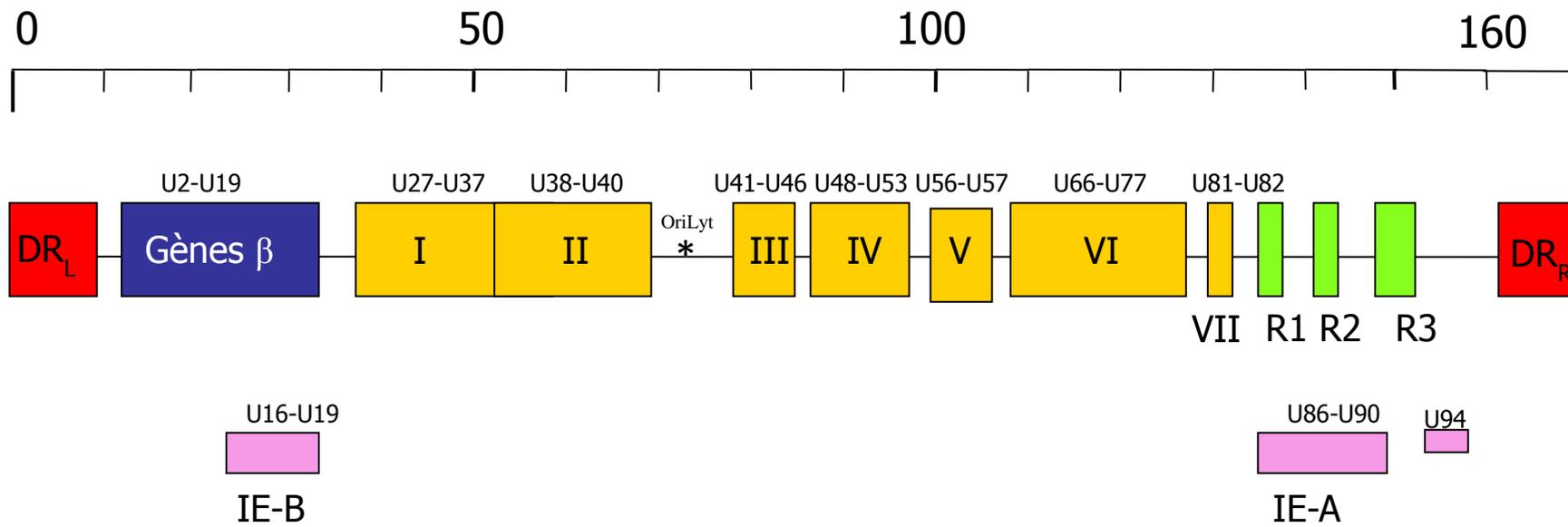


Figure 2 : Représentation schématique de l'organisation du génome de l'HHV-6

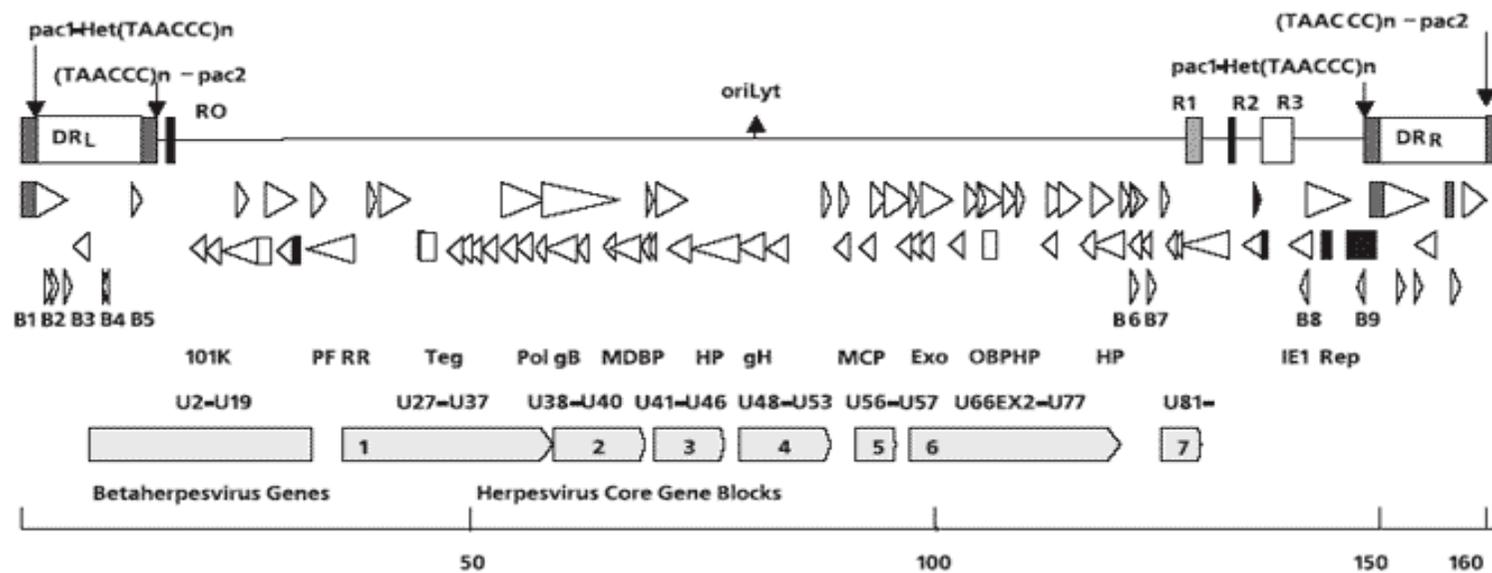


Figure 3 : Distribution des blocs de gènes de l'HHV-6B.

B1-B9, ORF uniques de l'HHV-6B ; U2-U19 gènes conservés caractéristiques des bêtaherpesvirinae ; 101K, protéine antigénique du virion, produit du gène U11 ; PF, Factor-séquence de la polymérase ; RR, ribonucléotide réductase ; Teg, grande protéine de tégument ; Pol, ADN polymérase ; gB, glycoprotéine B ; MDBP, protéine majeure de liaison à l'ADN ; HP, complexe protéique hélicase/primase ; gH, glycoprotéine H ; MCP, protéine majeure de capsid ; Exo, exonucléase alcaline ; OBP, protéine de liaison à l'origine ; IE1, gène très précocel ; Rep, gène homologue à rep de l'adeno-associated virus type 2 (AAV-2). D'après Dominguez et al.

V. Tropisme

L'HHV-6 ne peut se répliquer que dans des cellules d'origine humaine.

In vitro, les 2 types de l'HHV-6 se répliquent efficacement dans des cellules T CD4+ (Takahashi *et al.*, 1989). La souche GS de l'HHV-6A est souvent propagée dans la lignée humaine lymphoblastoïde T HSB-2 alors que la souche U1102 est fréquemment cultivée sur la lignée lymphocytaire T, J JHAN (Wyatt *et al.*, 1990). La lignée lymphocytaire T, Molt-3 est utilisée pour cultiver la souche Z29, alors que les cellules lymphoblastoïdes T humaines MT4 sont les plus adaptées pour cultiver la souche HST (Naesens *et al.*, 2006). D'autres types cellulaires sont infectés avec succès par l'HHV-6A et l'HHV-6B mais qui présentent une faible permissivité aux virus, tels que les cellules tueuses naturelles NK, les fibroblastes, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les cellules microgliales, les astrocytes fœtaux et les oligodendrocytes (Albright *et al.*, 1998). Cependant, seul l'HHV-6A peut provoquer une infection productive dans les cellules astrocytaires humaines. La réplication virale semble être moins efficace dans les cellules mononuclées du sang périphérique ou des lymphocytes du sang de cordon qu'elle ne l'est dans les lymphocytes T (Ablashi *et al.*, 1987; Luka *et al.*, 1990; Simmons *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1994).

In vivo, l'HHV-6A et l'HHV-6B se répliquent de manière efficace dans les lymphocytes T CD4+ (Lusso *et al.*, 1988; Takahashi *et al.*, 1989; Lusso et Gallo, 1995). Les lymphocytes T CD8+ ne sont infectables que par l'HHV-6A (Grivel *et al.*, 2003). Cependant les molécules CD4 et CD8 ne sont pas des récepteurs membranaires du virus. *In vivo*, l'HHV-6 peut infecter une gamme plus large de cellules et il est possible de le trouver dans le tissu amygdalien, les glandes salivaires, le cerveau, le foie, et le tissu endothélial.

L'HHV-6A et certaines souches de l'HHV-6B sont capables d'infecter les cellules grâce à leur récepteur CD46 qui est une glycoprotéine ubiquitaire exprimée à la surface de la majorité des cellules humaines (Santoro *et al.*, 1999). Elle intervient dans la régulation de l'activation du complément (Riley-Vargas *et al.*, 2004). Récemment, une étude publiée dans PNAS, a montré que la molécule CD134 (membre de la superfamille des récepteurs au TNF, Tumor Necrosis Factor) est un récepteur cellulaire spécifique pour l'entrée de l'HHV-6B (HST et Z29).

VI. Cycle répliatif

VI.1. Attachement, entrée dans la cellule hôte

L'HHV-6 entre dans la cellule hôte par un mécanisme d'endocytose. Le type A et certaines souches de type B, utilisent la glycoprotéine membranaire CD46 en tant que récepteur pour la fusion et l'entrée dans la cellule cible (Santoro *et al.*, 1999) (Figure 4). CD46 se lie aux fractions C3b et C4b du complément et les inactive, conduisant à la protection de la cellule hôte des dommages causés par les facteurs du complément. (Liszewski *et al.*, 1991).

Les herpèsvirus possèdent plusieurs glycoprotéines associées à leur enveloppe. Les glycoprotéines gL, gH, gM, gN et gB sont présentes chez tous les herpèsvirus et jouent un rôle dans l'entrée du virus dans la cellule cible. La glycoprotéine gQ, est unique aux Roséolovirus, elle se lie au complexe gH/gL pour former le complexe gH/gL/gQ codé respectivement par les gènes U48, U82 et U100. Il a été décrit que dans le cas de l'HHV-6A, ce complexe sert de ligand pour le récepteur CD46 (Mori *et al.*, 2003a; Mori *et al.*, 2003b). Puisque l'entrée du virus ne se fait pas dans toutes les cellules, ainsi l'existence d'un corécepteur encore inconnu est évidente.

Récemment, une équipe japonaise a montré que la glycoprotéine gB de l'HHV-6B et l'HHV-6A avec le complexe gH/gL/gQ1/gQ2 sont nécessaires et suffisants pour la fusion de l'enveloppe virale à la membrane cellulaire (Tanaka *et al.*, 2013).

Tang et ses collaborateurs ont montré que certains HHV-6B (HST et Z29) rentrent dans la cellule par le récepteur CD134 en interagissant avec le complexe gH/gL/gQ1/gQ2 (Tang *et al.*, 2013).

gH et gL peuvent former un complexe avec gO (codé par U47), ce complexe gH/gL/gO se lie à un autre récepteur que le CD46 et qui n'est toujours pas identifié (Pedersen et Hollsberg, 2006).

Après la fusion de l'enveloppe virale à la membrane cellulaire, la nucléocapside ainsi que la majorité des protéines de tégument sont libérées dans la cellule. Certaines de ces protéines permettent l'initialisation de la synthèse des composants viraux par les cellules. Cependant, toutes les protéines du tégument ne sont pas détachées de la capsidie lors de l'entrée. Il a été démontré que les protéines de tégument qui sont proximales de la capsidie

restent associées à la capsid jusqu'à ce qu'elle se fixe sur les pores nucléaires. La nucléocapside virale entrant est transportée à travers le cytoplasme, très probablement par interaction avec le réseau de microtubules, jusqu'aux pores nucléaires où le génome de l'ADN viral est libéré dans le nucléoplasme.

VI.2. Transcription et production de protéines virales

Le virus utilise la machinerie transcriptionnelle et traductionnelle de la cellule infectée pour produire 3 classes de protéines virales : très précoces ou *immediate early* (IE), précoces ou *early* (E) et tardives ou *late* (L) (Figure 4, 5).

Les protéines IE ou α sont synthétisées quelques heures après l'infection, les ARNm sont en effet souvent détectés 3h après l'infection. Elles sont pour la majorité des protéines transactivatrices régulant l'expression d'autres gènes.

Les protéines E ou β sont impliquées dans le métabolisme et la réplication de l'ADN (par exemple l'ADN polymérase virale, produit du gène *U38*). L'expression des gènes E dépend de la synthèse des protéines IE. Leurs ARNm peuvent être détectés entre 3 et 8h après l'infection.

Les protéines L ou γ sont parfois glycosylées. Leur expression est partiellement ou totalement dépendante de la réplication de l'ADN viral. Ce sont des composantes de la particule virale mature. Certaines sont des protéines de structure du virion, comme des protéines de la capsid (par exemple MCP, produit du gène *U57*), ou de l'enveloppe (par exemple gH, produit du gène *U48*), d'autres sont impliquées dans l'assemblage du virion. Les ARNm des gènes tardifs sont détectés entre 8 et 72h après l'infection.

Il existe des mécanismes de rétrocontrôle négatif dans la cascade transcriptionnelle du génome de l'HHV-6 (Figure 4) : les protéines les plus tardives peuvent réguler négativement la transcription des gènes les plus précoces.

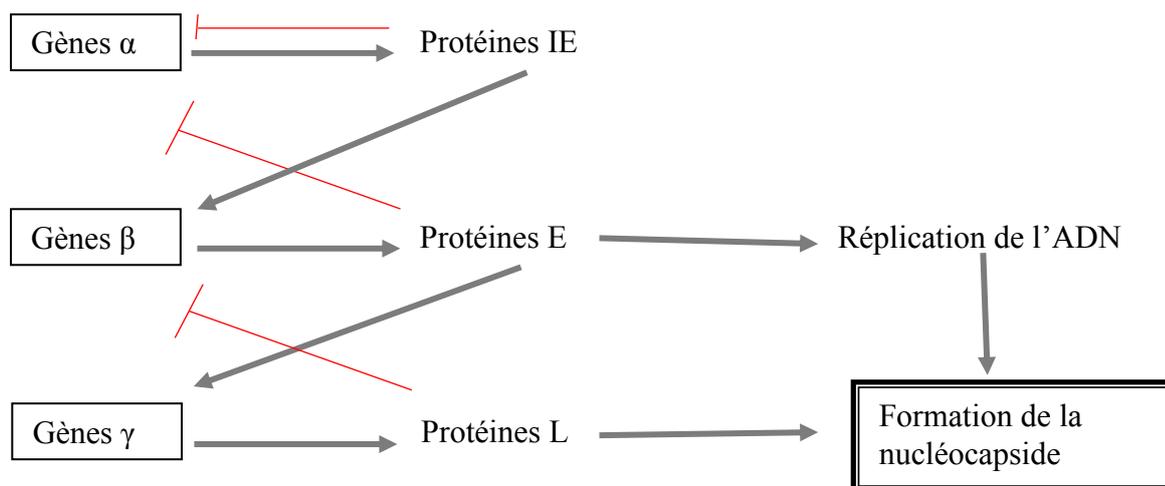


Figure 4 : Schéma représentatif de contrôle d'expression des gènes viraux

Après son entrée dans le noyau, l'ADN viral se circularise par juxtaposition des DRs.

La réplication de l'ADN est contrôlée par 7 facteurs codés par des gènes viraux. Tout d'abord, la protéine de liaison à l'origine (Origine Binding Protein, OBP), codée par *U73* et présentant 97% d'homologie de séquence en acides aminés entre l'HHV-6A et HHV-6B, se lie à l'origine de réplication « ori-lyt » localisée entre le gène *U41* codant la protéine majeure de liaison et le gène *U42* codant un transactivateur (conservé chez les herpesvirus). La liaison de « OBP » à « ori-lyt » provoque une dénaturation d'une partie de l'épisome qui va donner lieu à un « gap » ou « bulle de réplication » se traduisant par un espacement entre les deux brins d'ADN. Cette bulle sera maintenue stable par un complexe hélicase/primase (composé des produits des gènes *U43*, *U74* et *U77*) qui fournit également les amorces ARN qui serviront plus tard à la synthèse du brin d'ADN. Dans la bulle de réplication, l'ADN simple brin est stabilisé par la protéine majeure de liaison à l'ADN (codée par *U41*), jusqu'à ce que la synthèse du deuxième brin soit catalysée par l'ADN polymérase (pU38) sous l'action d'un facteur de processivité codé par *U27*. Il existe aussi quatre protéines codées par les gènes *U79* et *U80* qui sont soupçonnées être impliquées dans la réplication de l'ADN, mais leur rôle n'est pas encore connu (Taniguchi *et al.*, 2000).

Au fur et à mesure de la synthèse de nouveau brin d'ADN, un cercle roulant de réplication est formé. Ceci génère de longs concatémères correspondants à plusieurs copies du génome les unes à la suite des autres.

VI.3. Clivage, encapsidation

Certaines des protéines γ produites (comme la MCP, la SCP, des protéines d'échafaudage...) s'auto-assemblent sous forme d'hexamères et de pentamères, qui serviront à former les pro-capsides. Ces dernières sont des capsomères creux permettant la pénétration du génome viral.

La jonction formée par pac1 et pac2 (pac2-a-a-pac1) est considérée comme un substrat de clivage et d'encapsidation de l'ADN. Le clivage au niveau de la jonction pac2-pac1 va libérer le génome tout en fournissant de l'énergie (par hydrolyse de l'ATP) pour permettre l'insertion de l'ADN viral dans la capside. L'encapsidation du génome est terminée lorsqu'un deuxième évènement de clivage survient au niveau de la jonction pac2-pac1 suivante. Les détails de ce mécanisme sont toujours inconnus.

VI.4. Bourgeonnement et libération du virion

Les capsides matures sortent du noyau vers le cytoplasme, elles acquièrent d'une manière temporaire, une membrane intermédiaire dépourvue de glycoprotéines. Une fois dans le cytoplasme, et au sein de l'appareil de Golgi ou du tégusome (où les glycoprotéines virales s'accumulent), les capsides acquièrent un tégument et une enveloppe secondaire pourvue de spicules. Ceux-ci seront successivement glycosylés dans des vésicules de transport avant la sortie de la particule virale mature dans le milieu extracellulaire par exocytose (Torrissi *et al.*, 1999).

En revanche, il n'y a pas de glycoprotéines virales d'HHV-6 détectées au niveau de la membrane cellulaire de la cellule infectée, ce qui n'est pas le cas pour les autres herpesvirus. Le temps total pour la libération de nouveaux virions est de 72 h après l'infection (Figure 5).

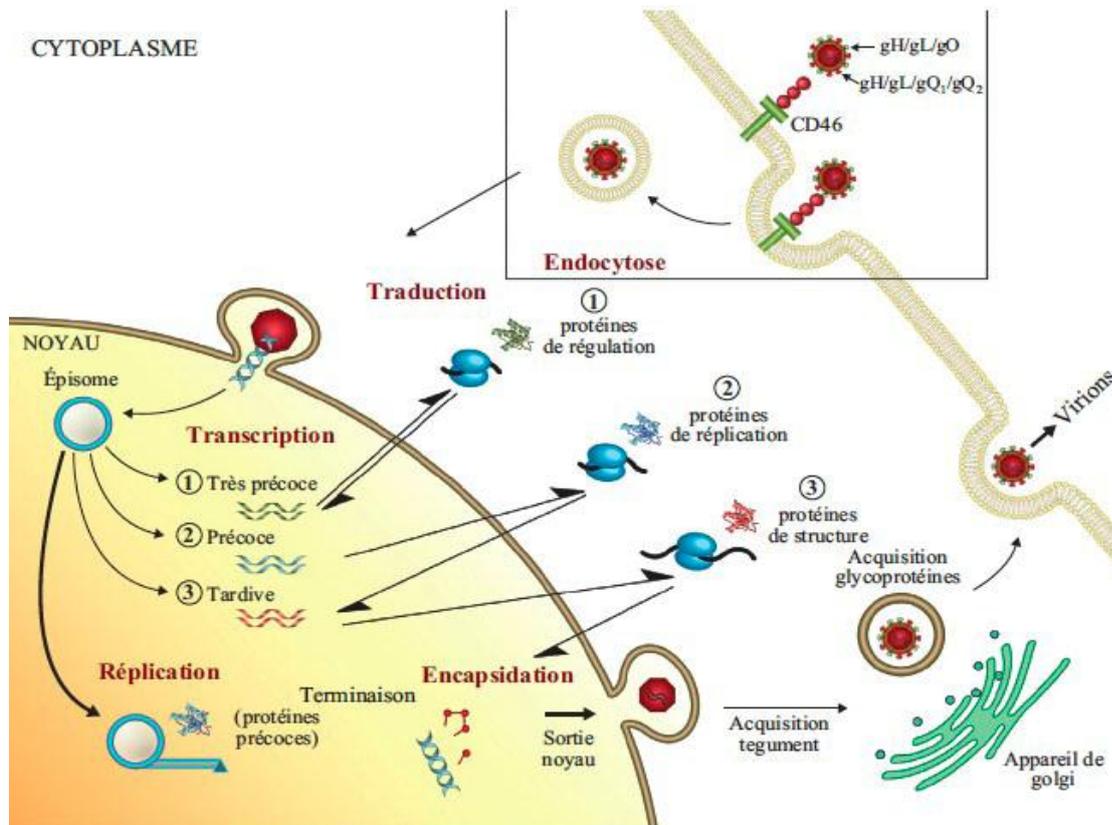


Figure 5 : Cycle réplcatif de l'HHV-6.

(TREMPE *et al.*, 2011)

VII. Effet du virus sur les cellules hôtes

L'infection par l'HHV-6 peut avoir différents effets sur la cellule-hôte, comprenant une marginalisation de la chromatine qui a été observée d'une manière considérable dans des cellules MT4 infectées par l'HHV-6B (Nii *et al.*, 1990). Un arrêt de la réplication de l'ADN (Di Luca *et al.*, 1990) et une stimulation généralisée de la synthèse protéique de la cellule dépendante de la réplication de l'ADN viral, ont été observés au niveau de lymphocytes de sang de cordon infectés (Balachandran *et al.*, 1989; Black *et al.*, 1992).

Ceci provoque un effet cytopathogène (ECP) classique, caractérisé par une «ballonnisation» des cellules infectées et conduit à la formation de cellules géantes multinucléées (*syncytia*) (Salahuddin *et al.*, 1986) (Figure 6). L'HHV-6 peut aussi moduler la fluidité membranaire de la cellule et l'expression des récepteurs, ce qui pourra probablement avoir une influence sur la surinfection par d'autres virus (Clark, 2000).

Comme certains virus (HIV, EBV, CMV...) l'HHV-6 est capable de moduler l'expression des cytokines et des lymphokines de la cellule-hôte, dans le but d'échapper au système immunitaire et de survivre. L'infection *in vitro* des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) par l'HHV-6 induit une augmentation de la production d'IFN- α , d'IL-1 β et de TFN- α (Flamand *et al.*, 1991; Arena *et al.*, 1997; Mossman, 2002). Mayne *et al.* ont observé que l'infection de la lignée lymphocytaire T, Sup-T1 par l'HHV-6A ou bien l'HHV-6B conduit à l'augmentation de l'expression des gènes de l'IL-18, du récepteur de l'IL-2, des membres des récepteurs de la superfamille des TNF- α , des MAP kinases (protéines kinases activées par des mitogènes), et des protéines de signalisation Janus kinase (Mayne *et al.*, 2001). En revanche, il a été montré que cette infection conduit à la diminution de l'expression d'IL-10, d'IL14 (Torelli *et al.*, 1995), d'IFN- γ (Arena *et al.*, 1999) et d'IL2 (Flamand *et al.*, 1995). L'interaction du virus avec le récepteur CD46 inhibe la production de l'IL-12 (Arena *et al.*, 1999) ; cette interleukine joue un rôle-clé dans l'orientation de la réponse immunitaire vers une réponse humorale ou cellulaire.

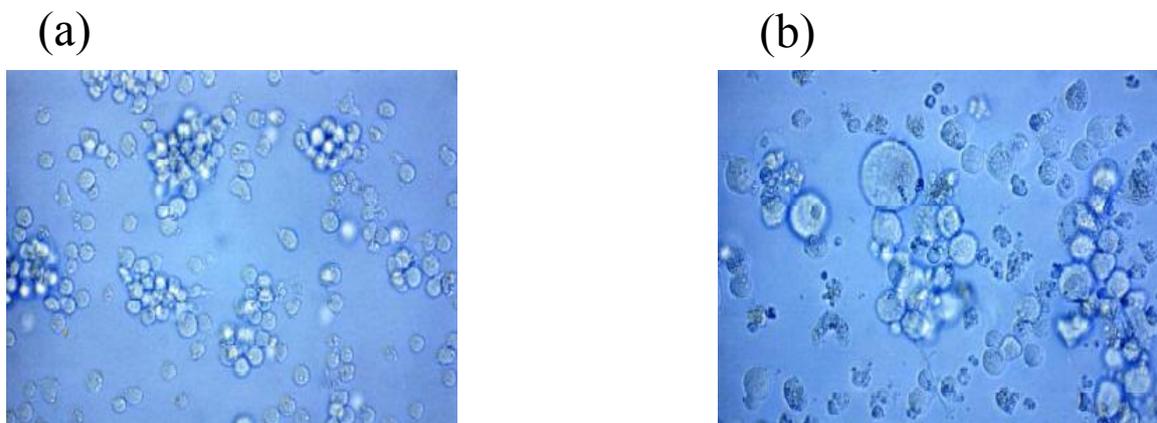


Figure 6 : Effet cytopathogène de l'HHV-6A sur cellules lymphoblastoïdes HSB-2 (grossissement x200).

L'infection par l'HHV-6-A peut affecter l'expression de certains récepteurs cellulaires de surface et d'antigènes. Elle va conduire à l'induction des molécules HLA-I et HLA-II dans les cellules dendritiques immatures, et à l'inhibition du HLA-I dans les cellules dendritiques matures.

L'infection par l'HHV-6 conduit à une diminution du niveau d'expression de CD3 (Lusso *et al.*, 1991b) et à une augmentation de celle de CD4 (Mayne *et al.*, 2001), y compris

sur des cellules ne l'exprimant pas normalement, laissant penser à certains que l'HHV-6 peut augmenter l'infectivité du VIH.

Il a été observé une augmentation de l'expression des TNFR1, récepteurs 1 pour le TNF, à la surface de la lignée lymphocytaire T JHAN CD4+ infectée par les types A ou B de l'HHV-6, ce qui entraîne l'apoptose. Le niveau d'apoptose a été augmenté par le TNF- α et les anticorps anti-Fas. Curieusement, les cellules apoptotiques de ces cultures infectées abritaient peu ou pas de virus, et l'apoptose a pu être induite par des surnageants de culture sans virus, ce qui indique que des mécanismes indirects (*via* la production du TNF- α) peuvent probablement être à la base de l'apoptose observée (Inoue *et al.*, 1997).

L'exposition (sans infection) des cellules *in vitro* à l'HHV-6A (strictement le type A) induit l'apoptose des neurones, des astrocytes et des oligodendrocytes (Gardell *et al.*, 2006).

Ainsi, il a été montré que l'infection par l'HHV-6A induit l'apoptose d'astrocytes humains fœtaux primaires PHFAs (primary human fetal astrocytes) *via* des voies caspases-dépendantes et indépendantes (Gu *et al.*, 2011).

Par contre d'autres études ont montré, sur différentes lignées cellulaires, que l'infection par l'HHV-6A ou B conduit à une protection des cellules contre l'apoptose accompagnée d'une augmentation importante du niveau d'expression de la protéine p53 (Takemoto *et al.*, 2004).

VIII. Epidémiologie, transmission

L'HHV-6 est un virus ubiquitaire. L'infection par l'HHV-6 n'a aucune prédilection sexuelle et peut survenir chez les personnes de toutes les races. En général, la séroprévalence dans le monde est d'environ 100% à quelques exceptions près.

Il n'existe pas un test sérologique discriminatoire entre les deux types de virus, c'est pourquoi il est difficile de confirmer leur distribution mondiale.

La principale voie de transmission virale est la salive où l'HHV-6 est fréquemment détecté (Fox *et al.*, 1990; Collot *et al.*, 2002). Les glandes salivaires correspondent à des sites de persistance pour le virus. L'infection par l'HHV-6 survient le plus souvent après la baisse des anticorps provenant de la mère, ceci se produit généralement entre l'âge de 6 mois et de 3 ans (en moyenne : 9 mois), la phase d'incubation est d'une à 2 semaines. Le virus est excrété et probablement transmis par la salive des enfants séropositifs asymptomatiques. Cette primo-

infection est causée par le type B de l'HHV-6 (Schirmer *et al.*, 1991; Dewhurst *et al.*, 1993). L'âge auquel survient l'infection par le type A de l'HHV-6 est moins bien défini car cette infection est asymptomatique, mais il semble être après l'acquisition du type B.

Une transmission intra-utérine est possible. L'infection congénitale par l'HHV-6 est définie par la présence d'ADN de l'HHV-6 chez un nourrisson à la naissance. Cet ADN pourrait provenir du passage transplacentaire du virus suite à une réactivation d'un HHV-6 latent chez la mère, ou suite à une réinfection maternelle, ou encore par la transmission héréditaire du virus intégré dans le chromosome (CIHHV-6).

De l'ADN de l'HHV-6 a été détecté chez des fœtus suite à des fausses-couches, et dans des échantillons de sang de cordons ombilicaux, et ceci en absence d'immunoglobuline sérique (IgM) (Aubin *et al.*, 1992; Adams *et al.*, 1998). Les auteurs n'avaient pas cherché s'il s'agissait du CIHHV-6. En 2004, Hall et ses collaborateurs ont signalé la présence d'ADN de l'HHV-6 dans le sang de cordon d'environ 1% des enfants à la naissance (Hall *et al.*, 2004). Le mécanisme par lequel ce virus est transmis n'est toujours pas très clair.

La transmission périnatale semble peu probable, bien que des fragments d'ADN de l'HHV-6B soient détectés dans le tractus génital de 20 % des femmes enceintes (Okuno *et al.*, 1995; Maeda *et al.*, 1997).

La transmission fécale-orale est probablement rare, bien que l'HHV-6 soit détecté dans les selles des parents des enfants atteints d'exanthème subit (Suga *et al.*, 1995; Suga *et al.*, 1998).

Deux modes de transmissions du virus ont été associés à la forme intégrée de l'HHV-6 dans le chromosome humain : la première *via* la transplantation, les cellules transplantées portant le virus intégré, la deuxième de façon verticale. Ces deux modes seront détaillés ultérieurement.

IX. Physiopathologie de l'infection et pathologie associée

IX.1. Infection primaire

La primo-infection par l'HHV-6 survient généralement entre l'âge de 6 mois et deux ans (Asano *et al.*, 1994). Elle est souvent asymptomatique. Sinon, elle peut provoquer un « exanthème subit » (érythème roséoliforme), cause fréquente de convulsions du nourrisson dues à l'hyperthermie.

IX.2. Persistence

La persistance correspond à un état d'infection chronique, caractérisé par un bas niveau de réplication virale avec production de virions.

Le principal siège de cette persistance est les cellules épithéliales des glandes salivaires (Krueger *et al.*, 1990). La persistance a été également observée dans des cellules nerveuses, cutanées et pulmonaires (Caserta *et al.*, 1994; Yoshikawa *et al.*, 2002; Csire *et al.*, 2007).

In vitro, une lignée cellulaire de lymphocytes T leucémique (TaY) est considérée comme un modèle de l'infection persistante par l'HHV-6B. Dans ce modèle, les auteurs ont rapporté l'expression des gènes *U16*, *U18*, *U20*, *U27*, *U82*, *U83*, *U85* et *U94* de l'HHV-6B (Ohyashiki *et al.*, 2005).

IX.3. Latence

Comme les autres herpèsvirus humains, après la primo-infection, l'HHV-6 est capable de rester en latence dans l'hôte et de continuer de l'infecter le long de sa vie. On distingue deux formes de latence :

- a. Latence épisodale : le génome viral est présent dans le cytoplasme ou le noyau de la cellule hôte sous forme épisodale non répliquative. Il n'y a pas de production de virions et l'intégrité de la cellule hôte est préservée.

U94 est le transcrit majeur durant cette latence (Rotola *et al.*, 1998; Rapp *et al.*, 2000), alors que d'autres gènes très précoces (*U16/17*, *U39*, *U42*, *U81*, *U89/U90*, *U91*) n'ont pas été détectés (Rotola *et al.*, 1998). Le rôle de ce gène est décrit ultérieurement dans ce manuscrit.

Cette forme de latence est essentiellement observée dans les monocytes et dans les précurseurs des cellules souches (Kondo *et al.*, 1991; Luppi *et al.*, 1999). Elle est également observée dans les oligodendrocytes du système nerveux central (SNC) (Ahlqvist *et al.*, 2005).

- b. Intégration de l'HHV-6 dans un chromosome : certains auteurs parlent de l'intégration du virus au niveau des télomères des chromosomes humains comme étant le dernier stade de latence, par conséquent, il n'y a pas de production de virions. L'ADN viral

intégré est transmis verticalement et de façon « héréditaire ». Cette partie sera détaillée ultérieurement.

IX.4. Réactivation

Durant la latence épisomale, des épisodes de réactivation du virus peuvent survenir ; ils sont généralement dus à des périodes d'affaiblissement du système immunitaire de l'hôte. Chez les immunocompétents, la réactivation est un phénomène fréquent mais asymptomatique, elle est contrôlée par l'immunité de l'hôte. Tandis qu'il peut y avoir des complications graves suite à la réactivation de l'HHV-6 chez les patients immunodéprimés.

X. Pathologies associées à l'infection par HHV-6

X.1. Maladies associées à la primo-infection

- **Exanthème subit (roséole infantile)**

Bien que la primo-infection du nourrisson soit généralement asymptomatique, il se peut qu'elle conduise au développement de l'«exanthème subit» (ES), encore appelé «sixième maladie du nourrisson» ou « roséole infantile ».

Cette maladie est caractérisée par une forte fièvre (>39,5°C), généralement persistante pendant 3-5 jours suivie d'une défervescence rapide. Pendant, ou quelques heures après, la défervescence, il apparaît une éruption cutanée exanthémateuse sur le tronc, les bras, le cou, le visage et plus tard sur les membres inférieurs (Figure 7). Ce rash cutané correspond à des papules roses, d'où le nom de « roséole ». Cette éruption disparaît en 1 à 2 jours

La relation entre la roséole et l'HHV-6 a été documentée pour la première fois en 1988, par Yamanishi et ses collaborateurs, en se basant sur des tests sérologiques et de culture du virus (Yamanishi *et al.*, 1988).

L'HHV-6B est l'agent identifié comme étant responsable de l'exanthème subit (Dewhurst *et al.*, 1993; Hall *et al.*, 1994) alors que l'HHV-6A n'est pas impliqué dans cette pathologie fébrile.

Certaines complications peuvent survenir après la primo-infection, comme des otites ou des symptômes gastro-intestinaux ou respiratoires (Hall *et al.*, 1994). HHV-6 a été associé à des convulsions fébriles chez des enfants âgés de moins de 5 ans, survenant dans environ 10%

des enfants infectés (Hall *et al.*, 1994; Ward et Gray, 1994; Barone *et al.*, 1995). Des complications sévères mais rares touchant le SNC ont été décrites comme des méningo-encéphalites (Kato *et al.*, 2003; Birnbaum *et al.*, 2005). Souvent l'infection par l'HHV-6 est caractérisée par une forte fièvre bénigne qui régresse spontanément. Néanmoins, de graves pathologies peuvent survenir, comme des hépatites fulminantes (Asano *et al.*, 1990; Tajiri *et al.*, 1990; Tajiri *et al.*, 1997; Ishikawa *et al.*, 2002), une thrombocytopénie (Yoshikawa *et al.*, 1993; Hashimoto *et al.*, 2002) ou une lymphohistiocytose hémophagocytaire (Sugita *et al.*, 1995; Portolani *et al.*, 1997).

L'infection primaire par l'HHV-6 chez l'adulte est très rare, cependant les manifestations de la maladie semblent être plus graves que lorsqu'elle survient chez l'enfant. Les quelques cas décrits correspondent à des mononucléoses infectieuses graves (Niederman *et al.*, 1988; Goedhard *et al.*, 1995) ou à des hépatites fulminantes (Sobue *et al.*, 1991) chez des adultes immunocompétents.

Cependant, il n'est pas toujours aisé de faire la distinction entre une primo-infection et une réactivation du virus.



Figure 7 : Exanthème subit chez un nourrisson causé par l'HHV-6B.

(Source : <http://www.dermis.net/dermisroot/en/11930/image.htm>)

X.2. Maladies associées à la latence et/ou à la réactivation de l'HHV-6 :

a. Pathologies survenant chez les patients immunodéprimés

- **Transplantation**

- Greffe de moelle osseuse/cellules souches : la greffe de moelle osseuse (Bone Marrow Transplant, BMT) est généralement suivie d'une réactivation asymptomatique de l'HHV-6 due à une immunosuppression de l'hôte (Cone *et al.*, 1999). Mais dans certains cas, cette réactivation a été associée à différents symptômes chez la personne transplantée, tels qu'un rash cutané, de la fièvre, la suppression de la moelle osseuse, une encéphalite (Drobyski *et al.*, 1994; Tsujimura *et al.*, 1998; De Almeida Rodrigues *et al.*, 1999), une pneumopathie (Cone *et al.*, 1993) ou une maladie du greffon-contre-l'hôte (Graft-Versus-Host Disease, GVHD).

- Transplantation d'organe solide (solid organ transplant, SOT) : après une transplantation d'organe solide (cœur/poumon, cœur, foie, rein), la réactivation de l'HHV-6 est peu fréquente. Les manifestations cliniques sont rares. Il peut y avoir de fièvre, diarrhée, rash cutané (Delbridge *et al.*, 2006) et plus rarement d'encéphalites, hépatites ou une suppression de la moelle osseuse (Kotton et Fishman, 2005).

- **SIDA**

Aujourd'hui, même si tous les auteurs ne sont pas d'accord, il existe l'hypothèse que l'HHV-6 contribuerait à la progression du SIDA.

L'HHV-6 est fréquemment isolé à partir de patients infectés par le VIH (Salahuddin *et al.*, 1986; Agut *et al.*, 1988; Levy *et al.*, 1990). Une réplication de l'HHV-6 est maintenue au niveau des ganglions lymphatiques infectés par le VIH, cette réplication est associée à la charge virale du VIH-1 (Knox et Carrigan, 1996; Emery *et al.*, 1999).

En 1989, Esoli et ses collaborateurs ont montré que l'HHV-6 est un puissant transactivateur du LTR (Long Terminal Repeat) du VIH (Ensoli *et al.*, 1989). La co-infection des lymphocytes T CD4+ par l'HHV-6 et le VIH peut accélérer la mort des cellules infectées (Lusso *et al.*, 1989).

Dans une étude publiée dans « Nature », Lusso et ses collaborateurs ont montré que l'infection par l'HHV-6 induit l'expression de CD4 au niveau des lymphocytes T CD8+ matures, ce qui les rend susceptibles à une infection par l'HIV-1 (Lusso *et al.*, 1991a). Ensuite, plusieurs études ont rapporté que l'HHV-6 peut induire l'expression de CD4 chez des cellules qui sont normalement CD4-, élargissant ainsi les types de cellules cibles sensibles à l'infection par le VIH (Lusso *et al.*, 1993; Furlini *et al.*, 1996). Cette capacité à induire

l'expression du CD4 a été également observée dans les cellules NK (Lusso *et al.*, 1993) et dans la lignée de cellules progénitrices hématopoïétiques, KG-1 (Furlini *et al.*, 1996).

La réactivation de l'HHV-6 chez le sidéen conduit de manière rare à des pneumopathies (Nigro *et al.*, 1995), des rétinites (Qavi *et al.*, 1995) ou des méningoencéphalites sévères (Corti *et al.*, 2011).

b. Cancers et hémopathies

Depuis le premier isolement de l'HHV-6 à partir des patients atteints de désordres lymphoprolifératifs, beaucoup d'études se sont intéressées à découvrir un rôle possible de l'HHV-6 dans différents cancers. Il a été montré qu'une partie du génome de l'HHV-6 possède la capacité de transformer des lignées cellulaires de fibroblastes murins (NIH3T3) et de kératinocytes humains (RHEK-1) (Razzaque, 1990; Razzaque *et al.*, 1993). Ensuite, la capacité de transformation a été attribuée à un seul ORF codant une protéine transactivatrice, il s'agit de l'ORF1 comportant le gène *DR7* (Kashanchi *et al.*, 1997).

L'HHV-6 a été associé au lymphome de Hodgkin (Torelli *et al.*, 1991). Ce lymphome est caractérisé par la propagation ordonnée de la maladie d'un groupe de ganglions lymphatiques vers un autre, par le développement de symptômes systémiques ainsi par la présence de grandes cellules B atypiques et multinucléées appelées cellules de Reed-Sternberg (RS). Le virus a été détecté fréquemment chez les patients atteints de ce lymphome (Sumiyoshi *et al.*, 1993; Valente *et al.*, 1996; Collot *et al.*, 2002), surtout quand la maladie de Hodgkin est scléro-nodulaire (Torelli *et al.*, 1991; Collot *et al.*, 2002; Lacroix *et al.*, 2007). C'est le type B de l'HHV-6 qui est le plus souvent associé au lymphome hodgkinien (Schmidt *et al.*, 2000; Lacroix *et al.*, 2007).

Au sein de notre laboratoire, la protéine DR7 de l'HHV-6B (DR7B) a été détectée dans le cytoplasme des cellules RS chez 73.7% (28/38 patients) patients négatifs pour l'EBV et positifs pour l'HHV-6. Une colocalisation de l'EBV et de l'HHV-6 a été observée dans les cellules de RS chez les patients doublement infectés. Il a été ensuite montré que la protéine DR7 (A et B) se lie à la protéine humaine p53. Une augmentation de l'expression des ARNm de p105-p50/p65 ainsi que l'activation de NF κ B ont été observées dans les cellules Hep-2 lorsque la protéine virale DR7B était exprimée. L'expression de manière stable de la protéine DR7B dans les cellules BJAB a induit une augmentation du niveau d'expression des transcrits/et des protéines « Id2 » (inhibitor of DNA binding 2) (Lacroix *et al.*, 2010), un

inhibiteur du facteur transcriptionnel E2A qui a été rapporté comme étant impliqué dans la reprogrammation du phénotype des cellules B des cellules de RS ainsi que dans la prolifération de ces cellules (Zhao *et al.*, 2008).

L'HHV-6 (types A et B) a été associé à des lymphomes non hodgkiniens, notamment à des lymphomes angioimmunoblastiques (AITL) (Luppi *et al.*, 1993a; Zhou *et al.*, 2007), des lymphomes à cellules T matures survenant chez l'adulte âgé.

D'autres types de cancers ont été associés à l'HHV-6 : leucémie aiguë myéloïde (Salonen *et al.*, 2002), cancers du cerveau (Li *et al.*, 2009) et tumeurs gliales (Crawford *et al.*, 2009; Amirian et Scheurer, 2012; Chi *et al.*, 2012).

c. Les atteintes de système nerveux central

L'infection active par l'HHV-6 peut conduire chez des patients immunodéficients ou parfois chez des sujets immunocompétents à des maladies sévères du SNC caractérisées par une démyélinisation multifocale fulminante.

L'ADN de l'HHV-6 (type A ou B) est fréquemment détecté au niveau des différentes régions du cerveau. Le taux d'incidence des personnes ayant une PCR positive pour l'HHV-6 au niveau du cerveau est de 32 à 85% (Cuomo *et al.*, 2001; Donati *et al.*, 2003). Ceci prouve le critère neuro-invasif de ce virus. Parfois les deux types d'HHV-6 sont détectés mais dans des régions distinctes.

Dans une large étude sur 2716 LCR provenant d'enfants atteints d'ES aigu (Hall *et al.*, 1998), il a été détecté durant la phase active de l'infection soit de l'HHV-6B soit de l'HHV-6A mais pas les deux à la fois. Chez les patients doublement infectés par les deux types du virus, seul l'HHV-6A persiste dans le LCR. Ceci suggère que l'HHV-6A possède probablement un plus grand neurotropisme que l'HHV-6B.

De l'ADN d'HHV-6 a été détecté à 2.3% dans un groupe de patients tunisiens immunocompétents atteints de troubles neuro-méningés (Nahdi *et al.*, 2012).

Des encéphalites et des méningites, ont souvent été associées à la réactivation du virus latent après immunosuppression (Corti *et al.*, 2011; Nishimoto *et al.*, 2012; Bhanushali *et al.*, 2013). Forest et ses collaborateurs, ont rapporté en 2011 le cas d'un homme de 61 ans ayant subi une encéphalite létale associée à l'HHV-6 après une greffe à partir de sang de cordon (Forest *et al.*, 2011).

En 2012, Chi et ses collaborateurs ont suggéré l'implication de l'infection à l'HHV-6 dans la pathogenèse des gliomes. Un fort pourcentage d'ADN et de protéines d'HHV-6 a été détecté dans des tissus provenant de patients atteints de différents types de gliomes (astrocytomes, glioblastomes et oligodendrogliomes) par rapport à du tissu cérébral sain (Chi *et al.*, 2012).

Il a été observé, une surexpression de NF- κ B (un facteur de transcription associé aux facteurs anti-apoptotiques) dans les cellules gliales des patients infectés par l'HHV-6B (Li *et al.*, 2011).

Il a été montré que l'HHV-6 (surtout le type A) pourrait induire l'expression de certains facteurs conduisant à la nécrose des cellules précurseurs d'oligodendrocytes (Kong *et al.*, 2003).

Un rôle de l'HHV-6B dans l'épilepsie mésiale du lobe temporal a été décrit. L'HHV-6B peut provoquer des convulsions en agissant sur la capacité des astrocytes à transporter le glutamate (Fotheringham *et al.*, 2007; Fotheringham *et al.*, 2008).

L'infection primaire par l'HHV-6B qui se produit généralement chez les nourrissons est le plus souvent la cause de crises convulsives induites par la fièvre (Suga *et al.*, 1993; Hall *et al.*, 1994).

Une association de l'HHV-6 à la sclérose en plaques a été suggérée pour la première fois en 1995 par Challoner et ses collaborateurs. Cette maladie auto-immune est caractérisée par la diminution puis la destruction de la myéline autour des axones neuronaux, ce qui entraîne des dommages axonaux et une altération des conceptions de l'influx nerveux. De l'antigène d'HHV-6 a été détecté dans les oligodendrocytes des plaques démyélinisées. Mais rien n'a été trouvé dans les oligodendrocytes des tissus non affectés qu'ils proviennent d'une personne atteinte ou non par la sclérose en plaque (Challoner *et al.*, 1995).

Des transcrits de gènes d'HHV-6 (gène très précoce *U94* et gène tardif *U58*) ont été détectés au niveau des tissus post-mortem des patients atteints de sclérose en plaques avec une substance blanche d'apparence normale (NAWM) ou d'une sclérose en plaques lésionnelle. Ces gènes étaient exprimés avec des taux significativement plus élevés par rapport à des échantillons témoins normaux (Opsahl et Kennedy, 2005).

Il a été proposé que l'HHV-6 joue un rôle de cofacteur dans la leucoencéphalopathie multifocale progressive (LEMP), une maladie démyélinisante du système nerveux central (Mock *et al.*, 1999; Daibata *et al.*, 2001).

d. Syndrome d'hypersensibilité médicamenteuse (DRESS) :

Le DRESS est une pathologie potentiellement mortelle qui apparaît généralement après une exposition prolongée à certains médicaments. Elle est caractérisée par la triade, fièvre, rash cutané et éosinophilie, associée à de possibles atteintes viscérales. La réactivation de plusieurs herpèsvirus, dont principalement l'HHV-6, a été associée au DRESS (Descamps *et al.*, 2001). Cette partie sera détaillée ultérieurement.

XI. Diagnostic

La quasi-totalité de la population générale est infectée par l'HHV-6 pendant la petite enfance. Le virus latent est détecté dans le sang (à de faibles niveaux) chez 30 % des personnes ayant été infectées. Par conséquent, la question pertinente aujourd'hui n'est pas de savoir si la personne possède le virus ou non, mais plutôt de connaître l'état de l'infection (latente ou active), le type d'HHV-6 (A ou B) et sa charge. Depuis des années, plusieurs méthodes ont été utilisées dans le but de répondre à ces questions. Chacune de ces méthodes possède ses propres avantages et inconvénients.

XI.1. Diagnostic direct

a. Isolement du virus par culture

Cette méthode a été décrite en 1988 par Yamanishi et ses collaborateurs (Yamanishi *et al.*, 1988). Elle consiste en la co-culture de lymphocytes infectés par l'HHV-6 avec des lymphocytes issus de sang de cordon. Elle peut aussi être réalisée avec des lymphocytes issus du sang périphérique (et dépourvus d'HHV-6), mais dans ce cas une activation par de la phytohémagglutinine (PHA) ou par l'anticorps anti-CD3 est nécessaire et la culture s'effectue en présence d'interleukine-2. La culture de l'HHV-6 se traduit par un effet cytopathogène. La réplication virale sera visible après 5 à 21 jours suivant la mise en culture, par une ballonnisation des cellules infectées. L'identification et le typage du virus sont réalisables par des techniques complémentaires dont quelques-unes seront citées ci-dessous.

La culture de l'HHV-6 est délicate et longue, elle n'est généralement plus utilisée en routine.

b. Détection d'antigènes viraux :

Cette méthode peut être appliquée sur des cellules en culture ou sur des tissus provenant d'un prélèvement. Les cellules ou la coupe tissulaire sont déposés sur une lame puis fixés et sont ensuite incubés avec un anticorps monoclonal primaire dirigé spécifiquement contre une protéine virale puis, après plusieurs lavages, ils sont incubés avec un anticorps secondaire dirigé contre le fragment Fc de l'anticorps primaire et couplé à une substance permettant de visualiser le marquage (fluorochrome ou enzyme révélée ultérieurement par son substrat) (Figure 8). La détection d'un antigène viral tardif permet de conclure que l'infection virale est active. Cette méthode permet aussi de différencier les deux types A et B de l'HHV-6 en utilisant des anticorps spécifiques de type. Cette technique peut être utilisée de façon semi-quantitative mais est peu sensible.

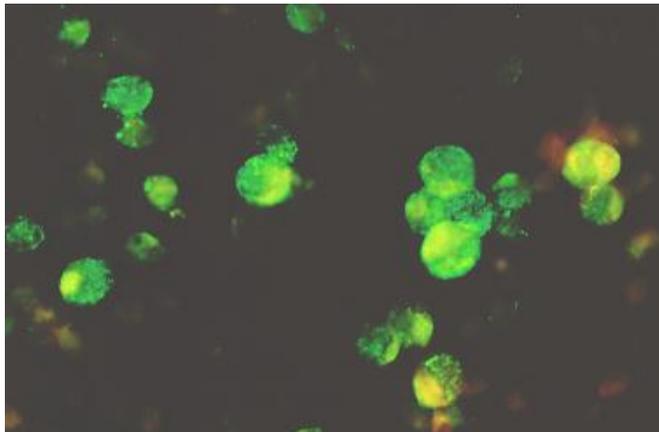


Figure 8 : Détection de l'HHV-6 par immunofluorescence en FITC (vert)

c. Biologie moléculaire (PCR) :

La détection des acides nucléiques viraux (ADN/ARN) par PCR/RT-PCR quantitatives, est la méthode la plus utilisée étant données sa grande sensibilité, sa spécificité et sa reproductibilité.

Lorsqu'elle est appliquée sur des prélèvements non cellulaires (sérum, plasma), cette méthode permet avec plus au moins de précision d'identifier l'état de l'infection.

Concernant la PCR quantitative appliquée sur des extraits cellulaires d'ADN, une forte charge virale quantifiée, montre un état actif de l'infection pouvant être dû à une primo-infection ou à une réactivation virale. Mais cette technique ne permet pas de distinguer entre

une infection active et un HHV-6 intégré dans les chromosomes. Ces deux cas sont associés à une forte charge en ADN viral.

La discrimination entre un état de latence et une réplication virale peut se faire par la détection de transcrits (ARNm) (Pradeau *et al.*, 2006). En particulier, l'expression du gène *U94* (Caselli *et al.*, 2006), en l'absence d'autres transcrits viraux lytiques (ex. *U16/17*, *U39*, *U42*, *U81*, *U89/U90*, *U91*) (Rotola *et al.*, 1998), est considérée comme un marqueur moléculaire de latence virale. Pour décrire un état d'infection actif il existe aussi le protocole décrit par André-Garnier et ses collaborateurs qui consiste à détecter les ARNm *U100* (André-Garnier *et al.*, 2003), et un autre décrit par Pradeau et ses collaborateurs consistant à détecter les ARNm *U79/80* (Pradeau *et al.*, 2006).

XI.2. Diagnostic indirect : Sérologie

Le diagnostic sérologique d'infection est classiquement défini par l'augmentation de 4 fois du titre des immunoglobulines G (IgG) entre deux prélèvements à deux semaines d'intervalle, associé au développement d'IgM anti-HHV-6. Un fort titre d'IgG est trouvé au cours de la primo-infection. Les IgM ne sont pas spécifiques de la primo-infection. La détection des anticorps peut se faire par différentes techniques dont l'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) et l'immunofluorescence indirecte, cette dernière permettant de titrer les anticorps (Krueger *et al.*, 1991). Cependant, il peut y avoir des réactions croisées, tout particulièrement avec les anticorps anti-HHV-7. La recherche des anticorps anti-HHV-6 devrait être précédée d'une étape d'élimination des anticorps anti-HHV-7 par absorption.

Les tests sérologiques actuels ne permettent pas de faire la discrimination entre les deux types A et B de l'HHV-6, parce qu'il existe de nombreuses protéines qui sont hautement conservées entre les deux types.

XII. Traitements

XII.1. Thérapie antivirale

Dans la plupart des cas, l'HHV-6 cause des maladies bénignes (comme la roséole infantile) qui guérissent spontanément, alors aucun traitement n'est indiqué. A l'inverse, la

réactivation du virus, par exemple chez les personnes immunodéprimées ou au cours du DRESS, peut entraîner des complications mortelles et nécessite une intervention médicale.

Actuellement, les médicaments antiviraux prescrits sont ceux utilisés dans la thérapie des infections provoquées par le HCMV. Tous ces médicaments agissent directement ou indirectement sur l'ADN polymérase pour aboutir à l'inhibition de son activité enzymatique.

a. Analogues nucléosidiques

Les analogues des nucléosides acycliques ganciclovir (GCV) et aciclovir (ACV), (Figure 9), ciblent l'ADN polymérase virale. Leurs métabolites triphosphates inhibent sa fonction enzymatique par compétition avec l'un de ses substrats naturels : la désoxyguanosine (dGTP). Après incorporation de ces molécules au niveau de l'ADN, l'ADN polymérase virale ne pourra plus ajouter des nucléotides, ce qui aboutit à l'arrêt de la réplication de l'ADN.

Deux pro-médicaments, le Val-GCV et le Val-ACV, ont été développés pour améliorer la biodisponibilité orale de ces molécules. Ces prodrogues ont une meilleure stabilité chimique ainsi qu'une meilleure solubilité aqueuse. Elles interagissent de la même manière que GCV et ACV après la libération de la molécule valyl-ester.

L'activité de GCV et ACV est dépendante de leur conversion à la forme triphosphorylée *via* des kinases cellulaires et virales. La phosphotransférase (pU69) codée par le gène *U69* de l'HHV-6 est responsable de la première phosphorylation, ce qui conduit à la formation des métabolites monophosphorylés des analogues nucléosidiques (Ansari et Emery, 1999). Les deuxième et troisième phosphorylations sont assurées par deux enzymes cellulaires (Figure 10), la désoxyguanylate kinase (dGMP) et la nucléoside diphosphate kinase (NDP) (Matthews et Boehme, 1988; Gallois-Montbrun *et al.*, 2002).

Le traitement par le GCV a montré une plus grande efficacité que celui par l'ACV (Agut *et al.*, 1991; Yoshida *et al.*, 1998). Toutefois, le GCV est moins efficace contre l'HHV-6B que contre le type A du virus.

Il a été mentionné des effets secondaires du ganciclovir, dépendants de la dose administrée, notamment des leuconéutropénies, des thrombocytopénies et plus rarement des troubles rénaux ou neurologiques (McGavin et Goa, 2001; Gandhi et Khanna, 2004).

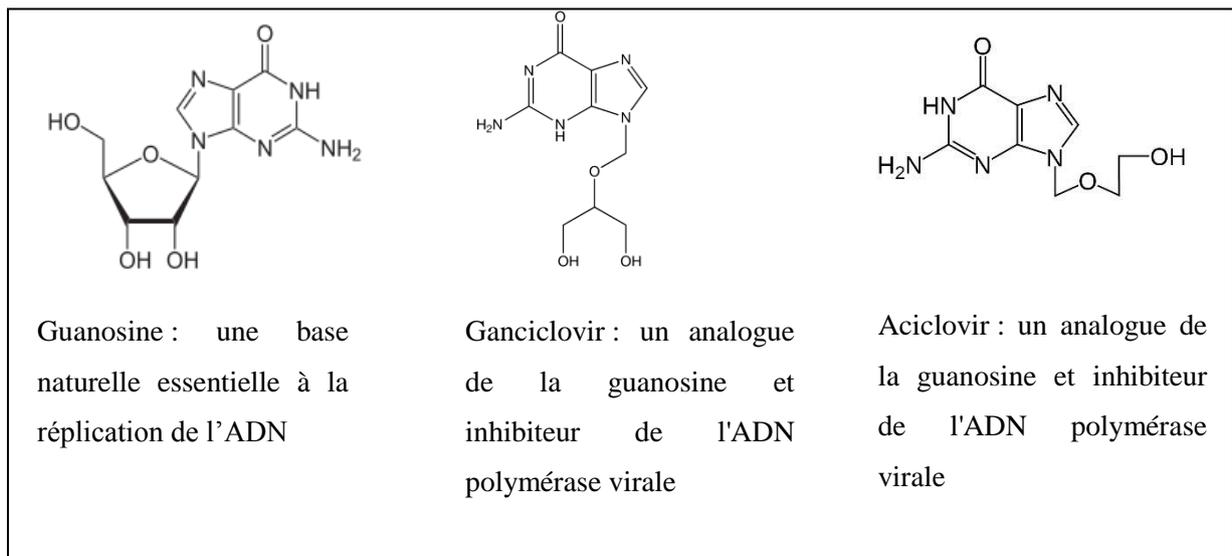


Figure 9 : Guanosine Vs les analogue nucléosidiques, ganciclovir et aciclovir

b. Analogues nucléotidiques :

Le cidofovir (CDV), est un nucléoside acyclique phosphonate analogue de la déoxycytosine monophosphate (dCMP). Contrairement au GCV et à l'ACV, le cidofovir ne nécessite pas de métabolisation par une enzyme virale. En raison de la présence du groupement phosphonate, deux phosphorylations par des enzymes cellulaires (pyrimidine nucléoside monophosphate kinase et pyruvate kinase ou créatine kinase, respectivement) sont suffisantes pour avoir le métabolite actif du cidofovir (Cihlar et Chen, 1996). La forme diphosphorylée du CDV inhibe de manière compétitive l'incorporation de la désoxycytidine triphosphate (dCTP) dans l'ADN viral par l'ADN polymérase virale. L'incorporation de la drogue interrompt le rallongement de la chaîne nucléotidique (Figure 10).

Le CDV a montré une forte activité contre l'HHV-6 *in vitro* (Reymen *et al.*, 1995). Cependant, en raison de l'important risque de développer une néphrotoxicité, le CDV n'est prescrit qu'en seconde ligne de traitement, lorsqu'une souche virale montre une résistance pour le GCV ou le foscarnet (Ljungman *et al.*, 2001).

c. Analogue du pyrophosphate :

Le foscarnet (acide phosphonoformique), est un analogue du pyrophosphate avec un spectre d'activité large qui couvre tous les herpèsvirus ainsi que le VIH. Cette molécule ne nécessite pas d'activation par des enzymes cellulaires ou virales (Figure 10). Par une liaison réversible, le foscarnet se lie directement à l'ADN polymérase, au niveau des sites de liaison

du pyrophosphate en empêchant le clivage des désoxynucléotides triphosphates en désoxyribonucléotides diphosphates et pyrophosphate inorganique (ppi).

Le foscarnet possède une excellente activité contre l'HHV-6 (Reymen *et al.*, 1995; De Clercq *et al.*, 2001), mais aux doses thérapeutiques, une importante néphrotoxicité peut être associée à l'utilisation du foscarnet (Deray *et al.*, 1989). Par conséquent, il est utilisé en deuxième intention après le ganciclovir.

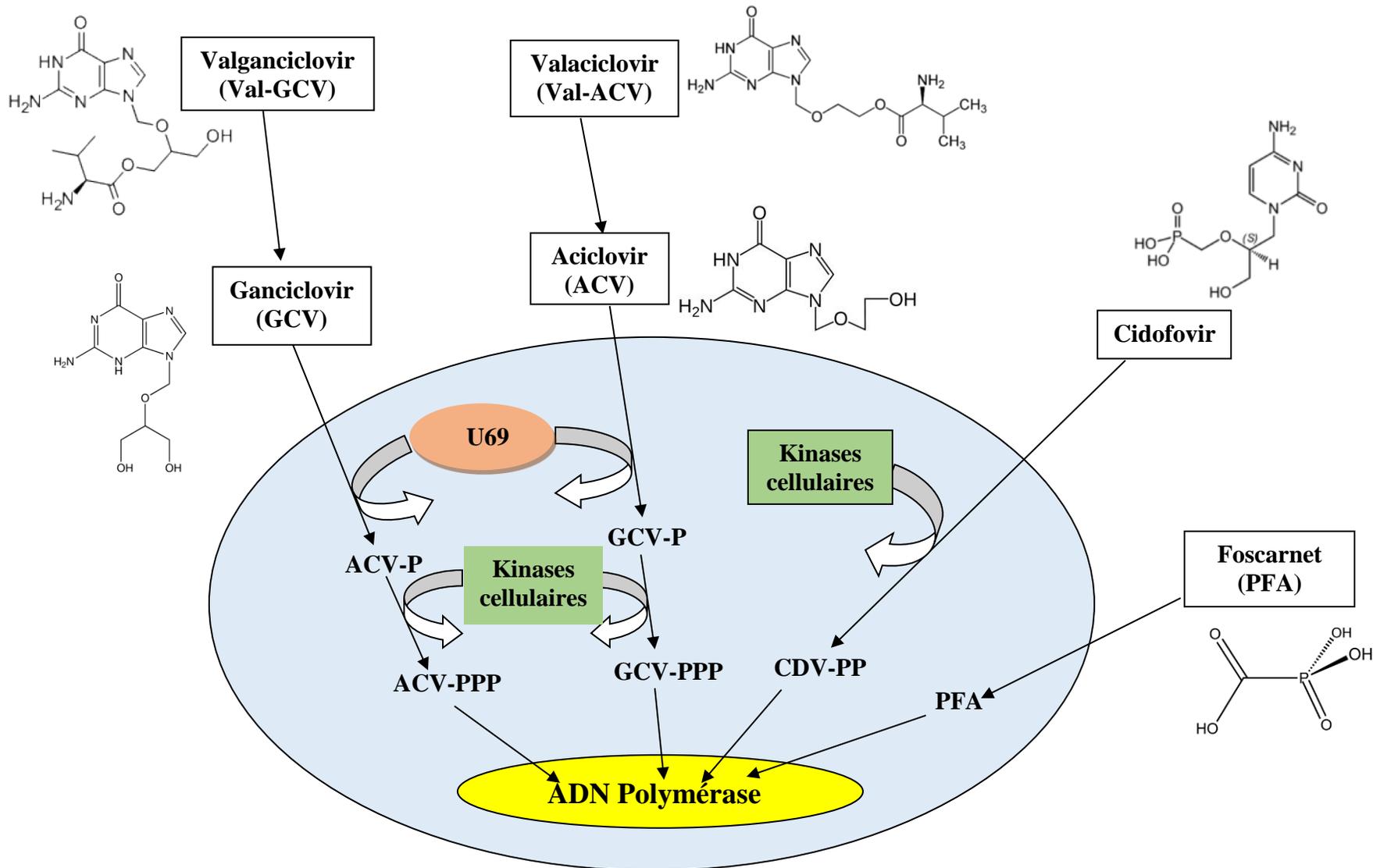


Figure 10 : Mécanisme d'action des 4 principales molécules anti-HHV-6.

(Alain *et al.*, 2009)

XII.2. Efficacité et avenir

De nombreuses études ont été menées *in vitro* dans le but de tester l'efficacité et la sélectivité de l'ACV, du GCV, du CDF et du foscarnet.

Le traitement de cellules mononucléées de sang de cordon (CBMCs) infectées par l'HHV-6A, en présence de ces différents anti-viraux, a montré que le cidofovir est la molécule la plus active et la plus efficace contre l'HHV-6 (De Bolle *et al.*, 2004). Elle est également la plus sélective montrant une plus forte affinité pour l'ADN polymérase virale que pour celle de la cellule.

Plusieurs études ont proposé administrer du ganciclovir ou du foscarnet aux patients immunodéprimés atteints d'hépatite, de suppression de la moelle osseuse, de pneumopathie ou d'encéphalite à HHV-6 (Zerr, 2006; Muta *et al.*, 2009). Ces traitements ne sont pas toujours efficaces (Ljungman *et al.*, 2007; Ogata *et al.*, 2013). Le ganciclovir s'est montré efficace dans la réactivation d'HHV-6 chez des patients ayant subi une transplantation de cellules souches. Suite au traitement, il a été observé une diminution de la charge virale de l'HHV-6 dans la salive (Ljungman *et al.*, 2007).

Le choix de nouvelles molécules thérapeutiques se base souvent sur la supposition qu'un médicament agira de la même manière sur l'HHV-6 que sur l'HCMV. Dans ce contexte, de nouvelles molécules ont été sélectionnées :

- le CMV423 (2-chloro-3-pyridin-3yl-5,6,7,8-tetrahydroindolizine-1-carboxamide) : c'est un inhibiteur de l'activité de la tyrosine kinase. *In vitro*, cette molécule a montré une sélectivité et une efficacité à inhiber la réplication virale de l'HHV-6 dans un stade précoce, supérieure à ce qui est obtenu par l'utilisation de l'ACV, du GCV, du CDF ou du foscarnet. Elle n'est efficace que contre la sous-famille des β -herpèsvirus (De Bolle *et al.*, 2004).

- l'artésunate : c'est un médicament utilisé contre le paludisme. *In vitro*, il a montré une efficacité contre l'HHV-6 (Milbradt *et al.*, 2009). En 2013, un groupe d'enfants atteints de myocardites associées à l'HHV-6B ont été traités par l'artésunate. Cet essai clinique a montré, et pour la première fois, une efficacité de l'artésunate à lutter contre ce genre de maladie sans qu'il y ait d'effets secondaires (Hakacova *et al.*, 2013).

- l'HDP-CDV (HexaDécyloxyPropyl-Cidofovir : c'est un conjugué lipidique du cidofovir, encore appelé CMX001. *In vitro*, l'efficacité de cette molécule a été prouvée contre plusieurs herpèsvirus (Williams-Aziz *et al.*, 2005). Elle a montré une efficacité plus forte

contre l'HHV-6A et B que le CDV lui-même (Bonnafous *et al.*, 2013). Après l'administration orale, elle reste intacte dans le plasma ; le CMX001 n'est pas une prodrogue. L'HDP-CDV ne s'accumule pas dans le rein comme le fait le CDV, il est donc beaucoup moins néphrotoxique que le CDV (Ciesla *et al.*, 2003). Mais contrairement au CDV, le CMX001 est capable de pénétrer en grande quantité dans le cerveau (Quenelle *et al.*, 2010), les poumons, le foie, la rate mais sans toxicité apparente. Le CMX001 a montré une efficacité à réduire la réplication virale de l'HSV, en particulier dans le SNC des souris (Quenelle *et al.*, 2010) .

Partie 2 : Intégration chromosomique de l'HHV-6

I. Introduction générale

Suite à l'infection d'une cellule par un herpesvirus, l'ADN viral linéaire est acheminé vers le noyau où il se circularise formant ainsi l'épisome viral. En fonction de plusieurs facteurs, le cycle viral atteint soit un état actif ou un état de latence. Pendant l'état de latence, l'épisome viral est maintenu sous sa forme extrachromosomique. Toutefois, il a été observé chez certains herpesvirus dont le virus de la maladie de Marek des volailles (MDV) et très rarement l'EBV, une intégration du génome viral dans le chromosome cellulaire. Pour l'EBV, ce phénomène a toujours été considéré comme une exception, plutôt qu'une caractéristique du virus. L'intégration de l'EBV a été observée dans des lignées cellulaires transformées d'un lymphome de Burkitt. L'infection des poules par le MDV conduit fréquemment à des intégrations, sans aucune préférence pour un chromosome. Ensuite, il a été découvert et observé chez environ 1 à 2% de la population générale, l'intégration génomique de l'HHV-6 dans les chromosomes. Cette forme de virus est désignée par l'acronyme CIHHV-6 (chromosomally integrated HHV-6). Depuis, de nombreuses études ont été menées afin de comprendre le mécanisme et l'effet de cette intégration.

D'autres virus, n'étant pas des herpesvirus, sont capables de s'intégrer dans le génome de la cellule hôte, comme les AAV (adeno-associated viruses) (Kotin *et al.*, 1990; Surosky *et al.*, 1997) ou les rétrovirus (Rohdewohld *et al.*, 1987; Carreau *et al.*, 1998). Cette intégration leur est nécessaire pour compléter leur cycle viral.

II. Découverte

Parmi les membres de la famille des *Herpesviridae*, l'HHV-6 est certainement celui dont l'intégration dans le génome de l'hôte est la plus régulièrement observée.

Luppi et ses collaborateurs ont rapporté pour la première fois 3 patients possédant le génome viral d'HHV-6 intégré le génome cellulaire de leurs PBMC. Parmi ces 3 patients, l'un était atteint de sclérose en plaques et les deux autres souffraient de désordres lymphoprolifératifs. Le virus était intégré au niveau des télomères du chromosome 17 (17p13) dans les 3 cas (Luppi *et al.*, 1993b; Luppi *et al.*, 1994; Torelli *et al.*, 1995) (la Figure 11 représente une structure d'un chromosome métaphasique).

Ensuite de nombreux articles ont été publiés décrivant divers cas de CIHHV-6 détecté.

Les deux types d'HHV-6 (A et B) ont la possibilité d'intégrer le génome humain. Le CIHHV-6B est d'environ 2 fois plus fréquent que le CIHHV-6A (Nacheva *et al.*, 2008; Morissette et Flamand, 2010), et il ne semble pas y avoir de chromosome préférentiel, bien que le chromosome 17 soit le plus fréquemment décrit porter l'HHV-6 intégré (>25% des cas) (Morissette et Flamand, 2010). Le tableau II résume les cas d'intégration d'HHV-6 rapportés dans la littérature depuis 1993 (Tableau II).

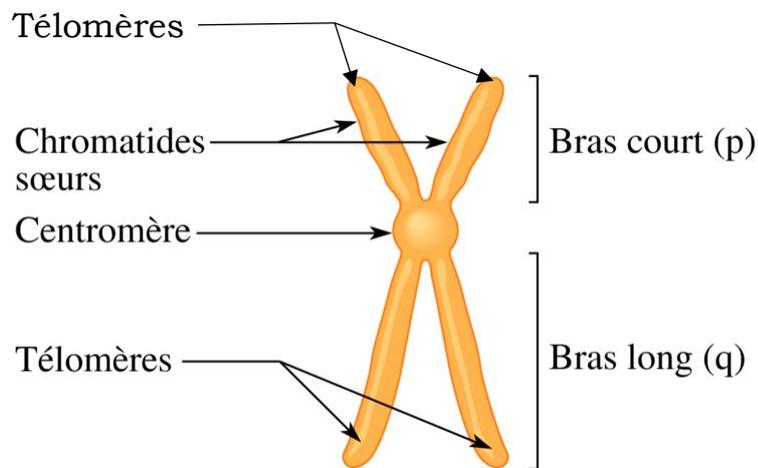


Figure 11 : Schéma d'un chromosome métaphasique.

(http://www.assistancescolaire.com/eleve/TST2S/biologie/reviser-le-cours/chromosomes-et-caryotypes-tst2s_bio09)

III. Prévalence

En moyenne, la fréquence des sujets porteurs de CIHHV-6 est estimée de 1 à 2% de la population mondiale. Les travaux publiés ont observé du CIHHV-6 avec une fréquence de :

- 1,6% des patients ayant des maladies neurologique (suspicion d'encéphalites) en Angleterre (Ward *et al.*, 2007).
- 1,5% des patients atteints de leucémie infantile en République Tchèque (Hubacek *et al.*, 2009a).
- 0,9% de la population italienne transplantée (Potenza *et al.*, 2009).
- 0,8% des anglais donateurs du sang (Leong *et al.*, 2007).
- 0,21 % de la population générale au Japon (Tanaka-Taya *et al.*, 2004).

Site d'intégration	Type d'HHV-6			Total (pourcentage par site)
	A	B	N.D	
1q44	0	1	1	2 (7,41%)
7q22	1	0	0	1 (3,7%)
9q	0	0	1	1 (3,7%)
9q34.13	0	0	1	1 (3,7%)
9q34.3	0	2	0	2 (7,41%)
10q26.3	1	0	0	1 (3,7%)
11p15.5	0	1	0	1 (3,7%)
17p	0	0	1	1 (3,7%)
17p13.3	2	5	0	7 (25,93%)
18p11.3	0	1	0	1 (3,7%)
18q23	2	0	0	2 (7,41%)
19q13.4	0	2	0	2 (7,41%)
22q	0	0	1	1 (3,7%)
22q13	0	3	0	3 (11,11%)
22q1 et 1q44	0	1	0	1 (3,7%)
N.D.	35	54	3	
Total (pourcentage)	41 (34,45%)	70 (58,83%)	8 (6,72%)	

Tableau II : Récapitulatif des cas de CIHHV-6 rapportés dans la littérature.

IV. Diagnostic

Aujourd'hui, un diagnostic correct est essentiel pour distinguer entre un CIHHV-6 et une infection virale active. En effet, dans les deux cas, le biologiste trouvera une charge virale élevée voire très élevée. Mais, bien évidemment, la forte charge en ADN viral chez des patients portant du CIHHV-6, n'est pas affectée par les traitements antiviraux (Hubacek *et al.*, 2007; Caserta *et al.*, 2010). La confusion entre un cas de virus intégré et une infection active peut faire exposer inutilement le patient à des traitements antiviraux toxiques. Plusieurs techniques de biologie moléculaire ou d'hybridation *in situ*, permettent de faire le diagnostic de CIHHV-6.

IV.1. Biologie moléculaire

Généralement, l'ADN de l'HHV-6 n'est pas présent, ou à de très faibles taux (quelques copies/mL) dans le sérum et/ou dans le plasma des personnes saines et n'ayant pas de CIHHV-6 (Secchiero *et al.*, 1995).

A l'inverse, l'ADN de l'HHV-6 est détectable par des techniques de PCR quantitative dans le plasma ou le sérum lors d'une infection virale active. Mais chez les individus portant du CIHHV-6, il existe au moins une copie par cellule. De ce fait, les charges en ADN d'HHV-6 sont beaucoup plus élevées. On estime qu'en présence de CIHHV-6, on obtient les résultats suivants par qPCR (Hubacek *et al.*, 2007; Leong *et al.*, 2007; Ward *et al.*, 2007; Clark et Ward, 2008; Caserta *et al.*, 2010; Hall *et al.*, 2010):

- > 500 000 copies/mL sur le sang total,
- > 3 000 copies/mL dans le sérum,
- > 1 000 copies/mL dans le plasma.

Les patients transplantés atteints d'une encéphalite, ceux présentant la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) et les patients souffrant du syndrome d'hypersensibilité médicamenteuse (DRESS), ont été rapportés d'avoir des charges d'ADN comparables à celles observées chez les personnes ayant du CIHHV-6, soit plus de 500 000 copies/mL de sang total (Leong *et al.*, 2007). En partant du principe que le CIHHV-6 est présent dans toutes les cellules nucléées, et pour effectuer un diagnostic différentiel avec une infection active, une qPCR peut être réalisée sur des follicules pileux du patient. En cas de CIHHV-6, elle doit être positive pour l'HHV-6 (≥ 1 copie/follicule pileux) (Ward *et al.*, 2006).

En avril 2013, Ruth Hall Sedlak a présenté lors du 29^{ème} congrès de « Clinical Virology Symposium » en Floride, le développement d'un nouveau test de détection du CIHHV-6, rapide et précis, en utilisant la troisième génération de PCR : la ddPCR (droplet digital PCR). Cette technique permet une quantification absolue de l'ADN d'intérêt, elle est 10 fois plus précise et 100 fois plus sensible que la qPCR (Hindson *et al.*, 2011). Cette PCR a été réalisée à l'aide du « QX 100 droplet digital PCR system » (Bio-Rad, Hercules, CA) pour l'HHV-6 et pour un gène de référence codant pour une ribonucléase (RPP30). Chez les patients avec le HHV-6 intégré dans leur génome, le ratio attendu du nombre de copies d'HHV-6 par cellule est ≥ 1 . Mais, il n'est pas encore démontré une supériorité de la ddPCR

sur la qPCR conventionnelle pour le diagnostic du CIHHV-6, notamment lorsque le virus se trouve en plusieurs copies dans la cellule sous une forme concatémérique.

IV.2. Hybridation *in situ*

La technique FISH peut être aussi utilisée pour confirmer l'intégration du virus dans le génome. Elle consiste à mettre en contact une sonde fluorescente spécifique de l'ADN viral avec des étalements chromosomiques des cellules en métaphase (Figure 12). Cette technique n'est pas utilisée en routine, elle est longue, laborieuse et coûteuse. Cette technique permet en outre de visualiser quel chromosome porte le virus intégré.

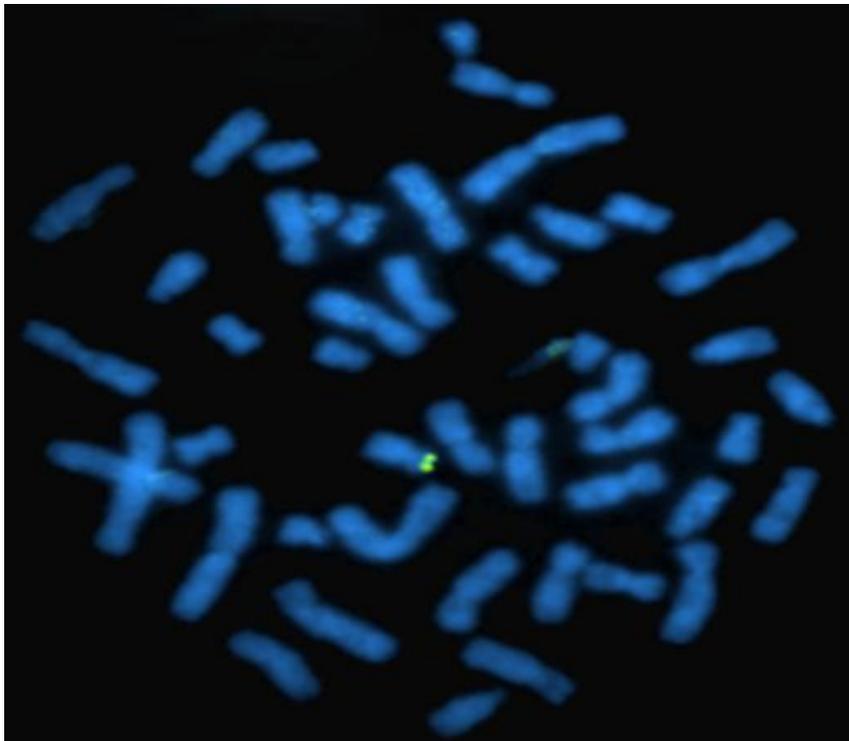


Figure 12 : Marquage (en vert) du CIHHV-6 par FISH
(grossissement x100).

n du CIHHV-6

V.1. Hérité

Il est important de distinguer une intégration chromosomique héritée d'une intégration sporadique, après une infection par l'HHV-6. D'après la littérature, il est clair que le CIHHV-

V. Acquisitio

6 peut être transmis entre générations. Certains auteurs ont décrit le CIHHV-6 intégré sur les mêmes sites chromosomiques chez la descendance que chez les parents (Mori *et al.*, 2009; Arbuckle *et al.*, 2010). Cette transmission par les cellules germinales, peut provenir d'un des deux parents selon les lois de Mendel avec 50% de chance d'être transmis à un enfant (Daibata *et al.*, 1998). Ainsi, en 1998, Daibata et ses collaborateurs, ont été les premiers à suggérer cette hypothèse de transmission héréditaire du virus intégré : ils ont rapporté la présence du CIHHV-6 aux mêmes sites chromosomiques, chez 3 membres d'une même famille. Cependant, d'autres auteurs ont expliqué ce phénomène par une tendance possible de l'HHV-6 à intégrer le même locus chromosomique (Luppi *et al.*, 1998).

En 1999, Daibata et ses collaborateurs, ont rapporté le cas d'une fille ayant le CIHHV-6 dans deux de ses chromosomes, l'un était le 22q13 et sa mère portait le CIHHV-6 en 22q13, l'autre était le 1q44 et son père portait le CIHHV-6 en 1q44 (Daibata *et al.*, 1999). Hermont et Minvielle ont critiqué ces observations en disant que les travaux expérimentaux n'étaient réalisés que sur des cellules du sang périphérique (Hermouet et Minvielle, 2000). Ces cellules pourraient être infectées et/ou intégrées pendant l'embryogénèse ou durant la vie de l'individu. Par ailleurs, notons que le CIHHV-6 est détecté chez quelques individus à moins d'une copie par cellule, ce qui va à l'encontre de l'hypothèse de la transmission héréditaire (Luppi *et al.*, 1998; Luppi *et al.*, 2006).

Toutefois, après certaines observations, comme la révélation par FISH du CIHHV-6 dans des fibroblastes, la détection de l'ADN d'HHV-6 dans les follicules pileux, les charges élevées d'ADN viral trouvées au niveau des différents tissus d'une personne ayant le CIHHV-6, peu de doutes persistent aujourd'hui sur la transmission héréditaire du CIHHV-6. Un enfant provenant d'un gamète CIHHV-6 positif, présente au moins une copie d'ADN d'HHV-6 dans toutes les cellules nucléées de son corps. A ce jour, il est confirmé que cette transmission de CIHHV-6 se déroule au moins sur 3 générations (Daibata *et al.*, 1998).

Le fait que le CIHHV-6 puisse être transmis d'un parent à son enfant, suggère qu'à un moment donné, l'HHV-6, au cours d'une réplication importante, s'intègre dans les cellules germinales, ou bien directement dans l'embryon une fois l'embryogénèse commencée. Plusieurs études sont encore nécessaires afin de mieux comprendre ce phénomène.

En supposant qu'une infection des cellules somatiques par l'HHV-6 puisse conduire à une intégration chromosomique du virus, dans ce cas, le nombre de cellules CIHHV-6 positives sera faible et indétectable. L'intégration de l'HHV-6 après une infection des

cellules J JHan et HEK-293 a été montrée *in-vitro* par Arbuckle et ses collaborateurs, avec une absence de forme épisomale de l'ADN viral. (Arbuckle *et al.*, 2010).

V.2. Transplantation

Plusieurs cas ont été rapportés, montrant la possibilité de transmission du CIHHV-6 lors des greffes de cellules hématopoïétiques ou de cordon ombilical d'un donneur sain ayant le virus intégré vers la personne transplantée (Clark *et al.*, 2006; Kamble *et al.*, 2007; Jeulin *et al.*, 2009; de Pagter *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012). Les conséquences de cette acquisition de CIHHV-6 sont encore inconnues. Une augmentation de la charge d'ADN viral est observée chez le transplanté. Il est possible de faire la confusion entre une réactivation du HHV-6 engendrée par l'immunosuppression, et la présence du CIHHV-6.

Dans le sens inverse, le transfert des cellules hématopoïétiques d'un donneur sain à un receveur possédant le CIHHV-6 peut conduire à une élimination complète de l'ADN d'HHV-6 des leucocytes (Hubacek *et al.*, 2009b).

Aujourd'hui, les banques de transplantation ne recherchent pas l'éventuelle présence de CIHHV-6 chez les donneurs. Cette intégration ne sera pas considérée comme une menace tant qu'elle n'est pas prouvée être associée à des pathologies ou à des anomalies génétiques.

VI. Réactivation du CIHHV-6

Par définition, la latence est un stade du cycle viral qui peut survenir après une infection ; l'ADN viral persiste dans la cellule hôte sans qu'il y ait formation de nouvelles particules virales. Toutefois, dans ces cellules le virus peut réactiver et former de nouveaux virions infectant d'autres cellules, sans qu'il y ait besoin d'une nouvelle infection.

La question peut être posée de savoir si le CIHHV-6 peut réactiver et infecter secondairement d'autres cellules. Pour répondre de manière concrète à cette question, il est important de vérifier préalablement :

- l'absence d'ADN viral épisomal. Ceci est possible par une analyse sur gel de Gardella. Cette méthode utilise un gel d'agarose vertical capable de distinguer l'ADN génomique cellulaire de l'ADN viral linéaire en répllication et de l'ADN circulaire fermé de façon covalente (épisomes) (Gardella *et al.*, 1984).

- la capacité des cellules ayant le CIHHV-6 à infecter des cellules ne portant pas d'HHV-6, puis vérifier que le virus infectant correspond à celui qui était intégré.

VI.1. Réactivation de CIHHV-6 *in vitro*

Les travaux d'Arbuckle *et al.*, publiés dans PNAS en 2010, ont montré qu'une réactivation du CIHHV-6 peut se produire dans des lymphocytes T d'un individu porteur du CIHHV-6A, lymphocytes traités *in vitro* par de la trichostatine (TSA, histone deacetylase inhibitor trichostatin A). Il a été observé un nombre de copies d'HHV-6A de 1,5 à 2 fois supérieur à ce qui était observé sans traitement. Ils ont aussi montré que l'HHV-6 produit dans les cellules T CIHHV-6+ activées peut infecter des cellules Molt3 (Arbuckle *et al.*, 2010).

Cet article a été critiqué, notamment par Morissette et Flamand (Morissette et Flamand, 2010), pour les raisons suivantes :

- Le séquençage du gène *U94* a été effectué pour vérifier que le virus infectant les Molt3 est le même que celui intégré dans les lymphocytes T. Arbuckle *et al.* ont conclu que le virus est identique. Mais leurs résultats ont montré la présence de plusieurs mutations de polymorphisme entre les deux séquences. Ceci a poussé Morissette et Flamand à dire qu'il est difficile d'en tirer une conclusion définitive sur le fait que le virus réactivé soit le CIHHV-6.
- Le virus intégré est l'HHV-6 de type A. Mais il est connu que l'HHV-6A est incapable d'infecter des cellules Molt3. Pour cela, il est possible que le virus réactivé soit de l'HHV-6B non intégré et non l'HHV-6A du CIHHV-6. Pour cela le choix du gène *U94* pour comparer les souches n'a pas été judicieux, car ce gène possède >94 % d'homologie entre les deux types d'HHV-6. Il aurait été préférable de choisir un gène discriminatoire comme les gènes *gH* ou *gB* pour confirmer la source de l'HHV-6 réactivé.

VI.2. Réactivation de CIHHV-6 *in vivo*

En 2008, Hall et ses collaborateurs ont étudié le cas de 85 patients dont 43 avaient eu une infection congénitale par l'HHV-6 et 42 avaient été infectés après leur naissance (Hall *et al.*, 2008). Ils ont montré que le principal mode de transmission congénitale de l'HHV-6 (pour 86% des patients) était une transmission de CIHHV-6 par la lignée germinale. Dans les 14%

restants, l'infection par l'HHV-6 avait été transplacentaire (83% des cas étaient de l'HHV-6B). Un examen plus approfondi des parents et des enfants, a indiqué que l'infection transplacentaire pourrait provenir de la réactivation et de la transmission du CIHHV-6 de la mère. Toutes les mères portaient le CIHHV-6, mais ce n'était pas le cas pour les pères, ni pour les enfants (résultat négatif de PCR sur follicules pileux). Mais, il n'a pas été déterminé si l'acquisition de l'HHV-6 par cette voie transplacentaire était due à la réactivation du virus non intégré (épisomale) et non pas de celui intégré dans les chromosomes (Hall *et al.*, 2008).

En septembre 2013, Gravel et ses collaborateurs, ont étudié le cas de deux mères ayant le CIHHV-6 (CIHHV-6A pour l'une et CIHHV-6B pour l'autre) (Gravel *et al.*, 2013). Chacune des deux mères avait un enfant positif pour l'HHV-6 et l'acquisition de virus était transplacentaire. Ils ont amplifié et séquencé une partie du gène *gB*, chez les deux enfants ainsi que chez leurs mères. De l'ADN d'HHV-6 avait été détecté dans le sang de cordon chez les enfants, mais avec une charge plus faible que celle vue pour les cas de CIHHV-6. En plus, il n'avait pas été détecté d'ADN d'HHV-6 au niveau de leurs follicules pileux : les enfants ne portaient pas le CIHHV-6. A l'issue du séquençage, des alignements de séquences du gène *gB* ont été réalisés. Les séquences *gB* qui ont été détectées chez la mère et son enfant ayant tous les deux de l'HHV-6A, semblaient être identiques entre elles et différentes des 9 séquences connues pour le type A du virus. De même, pour l'autre couple mère/enfant ayant l'HHV-6B, les séquences de *gB* étaient identiques entre elles mais différentes de 32 (89%) isolats connus d'HHV-6B. Par conséquent, les auteurs ont conclu que les HHV-6 détectés chez les enfants provenaient probablement de la réactivation du CIHHV-6 de leur mère pendant la grossesse. Mais sans exclure la possibilité qu'il y ait un microchimérisme maternel dans lequel les cellules d'origine maternelle peuvent traverser la barrière placentaire et atteindre la circulation sanguine du bébé. Ou encore, avec une probabilité plus faible, un microchimérisme fœtal où des cellules du fœtus atteignent la circulation maternelle.

VII. Mécanisme de l'intégration

Bien que l'intégration des herpès soit un phénomène bien connu, les principes mécanistiques de ce processus restent à élucider.

Le génome de l'HHV-6 est constitué d'un élément unique flanqué de répétitions directes (DR) dans le même sens qui sont à leur tour encadrées par des séquences Pac1 et Pac2 impliquées dans le clivage et l'encapsidation du génome d'HHV-6. Il existe des séquences terminales répétées (TRS) parfaites (TAACC)_n adjacentes à Pac2 ; ce motif est identique à la séquence terminale répétée du chromosome humain. Alors que les séquences adjacentes à Pac1 sont des motifs de répétitions hétérodimériques imparfaites het(TAACCC)_n (Figure 13).

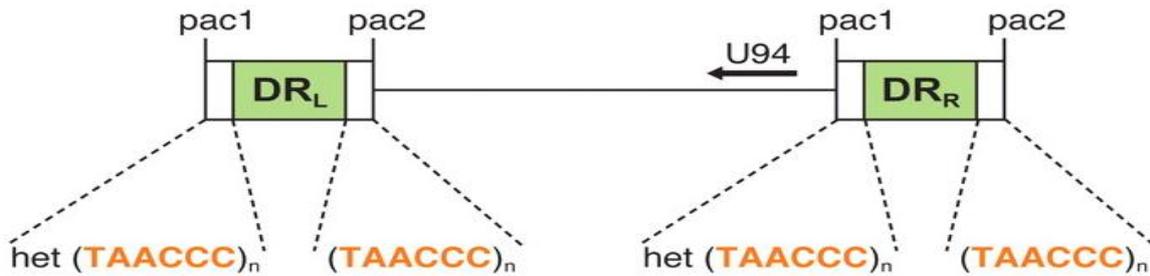


Figure 13 : séquences terminales répétées de l'HHV-6.

Aujourd'hui, il est prouvé que l'intégration de l'ADN de l'HHV-6 dans le génome humain se passe *via* une recombinaison homologe entre les TRS présentes dans le génome du virus et dans les télomères. Arbuckle et Medveczky ont émis l'hypothèse que les deux facteurs protéiques TRF1 (TTAGGG Repeat Factor 1) et TRF2 (TTAGGG Repeat Factor 2) se lient aux séquences répétées des DR de l'HHV-6, permettant ainsi l'intégration, en définissant l'orientation du génome viral par rapport aux télomères du chromosome concerné (Arbuckle et Medveczky, 2011) (Figure 14).

L'HHV-7 est le virus le plus proche de l'HHV-6 ; ils appartiennent tous les deux au genre roséolovirus. Le génome de l'HHV-7 possède les séquences TRS, mais ce virus n'a jamais été détecté intégré dans le génome humain (cependant, il faut noter que cet aspect d'HHV-7 n'est pas très étudié) (Hall *et al.*, 2004). Par conséquent, le seul fait d'avoir ces séquences terminales, ne semble pas suffisant pour permettre au génome d'HHV-6 de s'intégrer.

L'HHV-6 est le seul parmi les herpèsvirus qui possède dans son génome l'ORF U94, codant une protéine homologue à la REP68/78 de l'AAV-2 (Adeno-associated virus), avec une homologie protéique de 24 % (Thomson *et al.*, 1991).

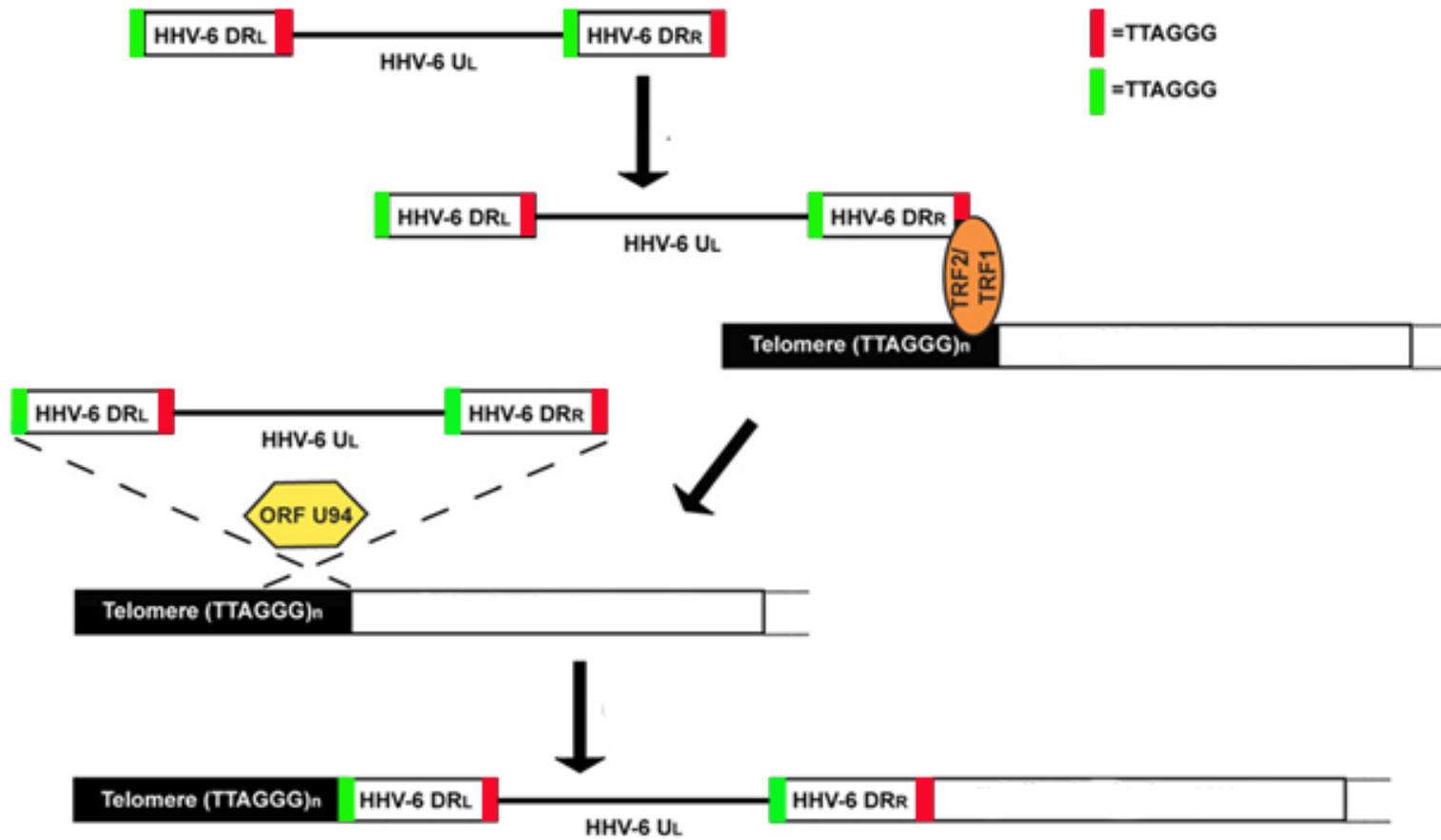


Figure 14 : mécanisme de l'intégration du génome de l'HHV-6 au niveau des télomères chromosomiques.

D'après (Arbuckle et Medveczky, 2011).

VIII. U94Rep et Rep68/78

VIII.1. Rep 68/78 de l'AAV-2

L'AAV-2 est un parvovirus à ADN simple brin, non pathogène nécessitant la présence d'un adénovirus ou un herpèsvirus pour pouvoir se répliquer dans la cellule. L'AAV-2 possède un génome linéaire d'ADN simple brin de taille 4,7 kb, contenant deux ORF majeurs, Rep et Cap, qui sont flanqués par deux répétitions terminales inversées (ITR) de 145 pb chacun (Figure 15).

L'AAV-2 est capable de s'intégrer dans un site spécifique transcriptionnellement silencieux du génome humain situé sur 19q13.42 appelé « AAVS1 ». Cette caractéristique requiert les propriétés fonctionnelles des polypeptides Rep68/78.

L'ORF Cap code des protéines de structure alors que Rep code 4 isoformes polypeptidiques, Rep78, Rep68, Rep52 et Rep40. L'AAV possède dans son génome 3 promoteurs nommés p5, p19 et p40. Les polypeptides Rep78 et Rep68 sont synthétisés à partir d'épissages alternatifs initiés par le promoteur p5 viral (Berns et Giraud, 1996). Il a été montré que les protéines Rep sont indispensables pour la répllication de l'ADN d'AAV et le contrôle transcriptionnel des promoteurs viraux (Hermonat *et al.*, 1984; Labow *et al.*, 1986; Tratschin *et al.*, 1986). À l'exception de leurs extrémités C-terminales, les séquences d'acides aminés des deux protéines sont identiques (Srivastava *et al.*, 1983). Les protéines Rep68 et Rep78 présentent également les mêmes activités biochimiques (Tableau III). Elles possèdent une activité de liaison spécifique à l'ADN (simple brin) au niveau des sites RBE (Rep Binding Element), séquences répétées en tandem composées d'un tétramère de motif « GAGC » et localisé au niveau des ITR de l'AAV-2 et au niveau du site AAVS1 du chromosome 19.

Ces protéines possèdent aussi une activité endonucléase spécifique d'un site appelé trs (Terminal Resolution Site). Rep coupent l'ADN simple brin entre les nucléotides 124 et 125 de l'AAV-2. La liaison de Rep à l'ADN semble être indépendante de l'ATP, alors que l'activité endonucléase est ATP-dépendante. Wonderling et ses collaborateurs ont montré que la Rep68 possède une activité ATPase capable d'hydrolyser l'ATP en AMP. Les protéines Rep possèdent aussi une activité hélicase dépendante de l'ATP, assurant le mouvement de la protéine tout au long de l'ADN (Im et Muzyczka, 1990).

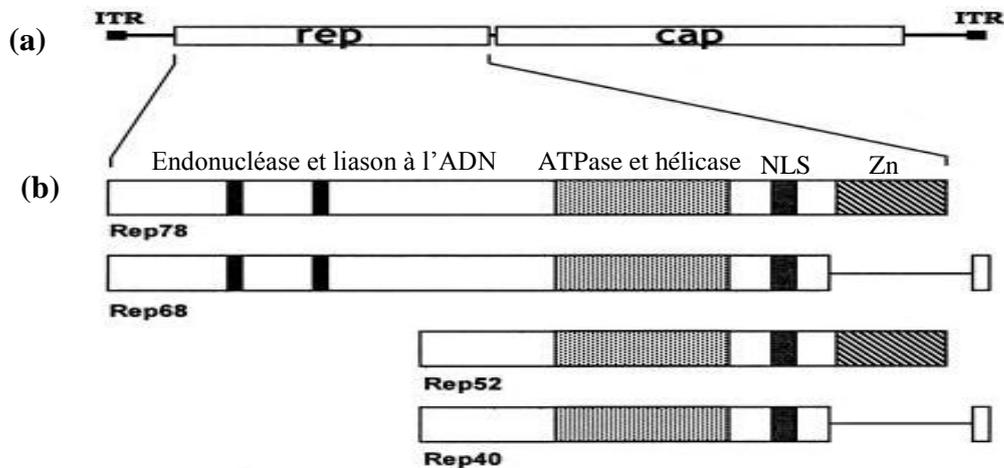


Figure 15 : (a) Représentation schématique du génome d'AAV-2.

ITR, répétitions terminales inversées ; rep, ORF codant les protéines Rep ; cap, ORF codant les protéines structurales. (b) Représentation schématique des produits du gène rep : Rep78 et Rep 68 partagent les mêmes motifs assurant les activités de liaison à l'ADN, endonucléase, ATPase et hélicase. NLS, séquence de localisation nucléaire ; Zn, domaine composé de doigts de zinc, absent chez Rep68 et Rep40. D'après (Smith et Kotin, 2000).

Lors de la réplication virale, la protéine Rep 68 (ou Rep78) se lie au RBE, ce qui provoque un réarrangement spatial du génome et aboutira à la libération du site trs qui correspond au substrat de l'activité endonucléase de Rep. Suite au clivage, la réplication se déroulera par la machinerie cellulaire à partir de l'extrémité 3' libérée.

De ce fait, comprendre les activités fonctionnelles des Rep 68/78 est à la base de la compréhension du mécanisme d'intégration de l'AAV-2 au niveau d'AAVS1 du chromosome 19. Il a été montré que 33 pb situées au niveau d'AAVS1 et comprenant la séquence RBE et le site trs, sont essentielles et suffisantes pour permettre cette intégration Rep-dépendante spécifique du site (Linden *et al.*, 1996).

VIII.2. U94 de l'HHV-6

L'HHV-6 est le seul parmi les herpèsvirus qui possède le gène *U94*. Il est composé de 1473 pb situées vers l'extrémité droite du virus (entre R3 et DRR). Un transcrit majeur de 2,7 kb a été détecté par Northern-Blot ; il comporte 3 exons. Les exons 1 et 2 ne codent aucune protéine alors que l'exon 3 code la protéine U94 faisant une taille de 490aa (Mori *et al.*, 2000).

Bien que *U94* soit décrit comme un gène très précoce par la majorité des travaux (Mirandola *et al.*, 1998; Oster et Hollsberg, 2002), il est parfois défini comme un gène précoce (Tsao *et al.*, 2009).

La séquence nucléotidique et celle des acides aminés diffèrent d'environ 3,5% et 2,5% respectivement entre l'HHV-6A et l'HHV-6B (Rapp *et al.*, 2000). La divergence de la séquence nucléotidique et de celle des acides aminés entre les différents isolats d'HHV-6B (observé entre 17 isolats) est inférieure de 0.6% et 0.2%, respectivement (Rapp *et al.*, 2000).

La séquence en acides aminés de la protéine U94 de HHV-6 partage 24% avec celle des protéines Rep68/78 de l'AAV-2. Aujourd'hui la protéine U94 de l'HHV-6 n'est que partiellement caractérisée. Il a été montré qu'elle a une activité de liaison à l'ADN, mais les activités endonucléase et ATPase-hélicase ne sont pas identifiées expérimentalement (Mori *et al.*, 2000; Dhepakson *et al.*, 2002). Toutefois, U94 est supposée posséder ces activités. L'analyse des acides aminés-clés pour ces deux fonctions chez Rep68/78 montre qu'elles sont conservées chez U94 (Walker *et al.*, 1997a, b) (Tableau III). De plus, Thomson et ses collaborateurs ont montré *in vitro* que l'apport de Rep d'HHV-6 a permis la réplication d'un génome de l'AAV-2 déficient en REP68/78 (Thomson *et al.*, 1994).

Toutes ces observations laissent penser que le gène *U94* joue un rôle dans l'intégration virale.

Rep 68	Rep 78	U94
<ul style="list-style-type: none"> • 536 aa (68 Kda) • Activité : - ATPase et hélicase - Endonucléase - Liaison à l'ADN - Régulation de l'expression des gènes viraux 	<ul style="list-style-type: none"> - 623 aa (78 Kda) - Activité : - ATPase et hélicase - Endonucléase - Liaison à l'ADN - Régulation de l'expression des gènes viraux 	<ul style="list-style-type: none"> - 490aa (<60KDa) - Activité : - ATPase et hélicase - Endonucléase - Liaison à l'ADN - Rôle dans la latence - HHV-A/HHV-6B ~98% d'homologie

Tableau III : Caractéristiques de la protéine U94 de l'HHV'6 et des protéines Rep68 et Rep68/78 de l'AAV-2.

IX. Structure du virus intégré

L'ADN viral peut être présent dans la cellule hôte sous 3 formes : linéaire, épisomale ou concatémérique. A ce jour, il n'est pas bien clair si ces trois différentes formes sont capables de s'intégrer et si oui, la structure du génome intégré ainsi que le sort du provirus intégré ne sont pas expérimentalement élucidés.

Théoriquement, lorsqu'un génome viral est intégré sous sa forme linéaire ou épisomale, une seule copie d'HHV-6/cellule devrait être quantifiée. Mais lorsque le virus s'est intégré sous la forme concatémérique, il devrait être possible de détecter plus d'une copie d'HHV-6/cellule. Tel était peut-être le cas, lorsque Leong et ses collaborateurs (Leong *et al.*, 2007) ont rapporté avoir quantifié 2 à 5 copies dans une cellule ayant l'HHV-6 intégré provenant d'une population de donneurs de sang aux UK. Il est important de noter que seulement de l'HHV-6B a été détecté. La quantification de l'ADN d'HHV-6 dans une cellule est effectuée après comparaison du résultat de charge en ADN viral avec le résultat d'une qRT-PCR de la bêta-globuline. Flamand et ses collaborateurs ont supposé que dans le cas d'un CIHHV-6 sous une forme concatémérique, un génome viral entier pourrait s'exciser, et ceci serait probablement l'étape qui précède une éventuelle réplication virale (Flamand *et al.*, 2010). Alors, En tenant compte du nombre de copies d'ADN viral/cellule, il est possible de prédire si un individu est susceptible de produire des virions infectieux.

X. Pathologies associées

A ce jour, il n'existe pas de pathologie associée au CIHHV-6. Parmi les cas rapportés dans la littérature, il est à noter que certaines pathologies reviennent de manière récurrente parmi les patients présentant l'HHV-6 intégré dans leur génome. C'est le cas de certaines néoplasies hématologiques mais aucun lien direct n'a été démontré.

Plusieurs auteurs pensent que l'intégration de 170 kb d'ADN viral dans le télomère d'un chromosome ne devrait pas être sans conséquences, surtout que les régions télomériques possèdent plusieurs activités, dont la contribution à l'intégrité chromosomique et à l'homéostasie cellulaire. Ainsi les télomères codent des transcrits non codants appelés TERRA, comportant un motif UUAGGG qui n'a été trouvé qu'au niveau du noyau ; ces ARN proviennent d'un promoteur localisé en région subtélomérique (Azzalin *et al.*, 2007). Le rôle biologique de TERRA n'est pas encore bien élucidé. Certaines études ont révélé une

corrélation entre le taux de TERRA et le raccourcissement des télomères. Un niveau bas d'expression de TERRA est détecté au niveau des échantillons de cancer humain (où les télomères sont longs) alors il a été proposé pour TERRA un rôle dans la limitation télomérase-dépendante de l'élongation des télomères (Azzalin *et al.*, 2007; Schoeftner et Blasco, 2008).

Curieusement, les régions où l'HHV-6 s'intègre le plus souvent, sont associées à certains syndromes rares. Par exemple, des syndromes caractérisés par des malformations congénitales :

- le syndrome de Miller-Dieker. Il est associé à une microdélétion et /ou une altération du gène LIS-1 situé au niveau de 17p13.3.
- Le syndrome de 18q, il est associé à une délétion au niveau de 18q23.
 - Le syndrome de délétion subtélomérique du chromosome 9q.

Le CIHHV-6 n'est probablement pas le responsable de ces maladies, mais il sera intéressant de chercher si des altérations similaires pourraient survenir en conséquence de l'intégration du HHV-6 au niveau de ces régions.

Le schéma ci-dessous (Figure 16) propose plusieurs hypothèses des conséquences de l'intégration de l'HHV-6 dans le génome de la cellule hôte (Morissette et Flamand, 2010) :

- Il est supposé qu'une intégration d'un ADN de 170 kb dans la région télomérique, pourrait altérer l'intégrité du chromosome et conduire probablement à une sénescence prématurée du chromosome,
- CIHHV-6 pourrait provoquer des mécanismes de troncation au niveau des télomères
- L'ADN viral intégré pourrait avoir un effet sur l'expression des gènes cellulaires (proto-oncogènes ou autres),
- Concernant le CIHHV-6 transmis de la mère à l'enfant, pourrait-il y avoir une tolérance immunitaire pour des antigènes d'HHV-6, au cas où des protéines d'HHV-6 sont exprimées lors de l'embryogénèse ?
- Si certains gènes de CIHHV-6 sont exprimés et que leurs produits soient exposés, comme des protéines cellulaires, à la membrane, est-ce qu'il est possible d'avoir des réactions d'auto-immunité suite à une primo-infection ?

Mais pour l'instant, il ne s'agit que d'hypothèses et il est difficile de prévoir les conséquences cliniques de ces diverses situations.

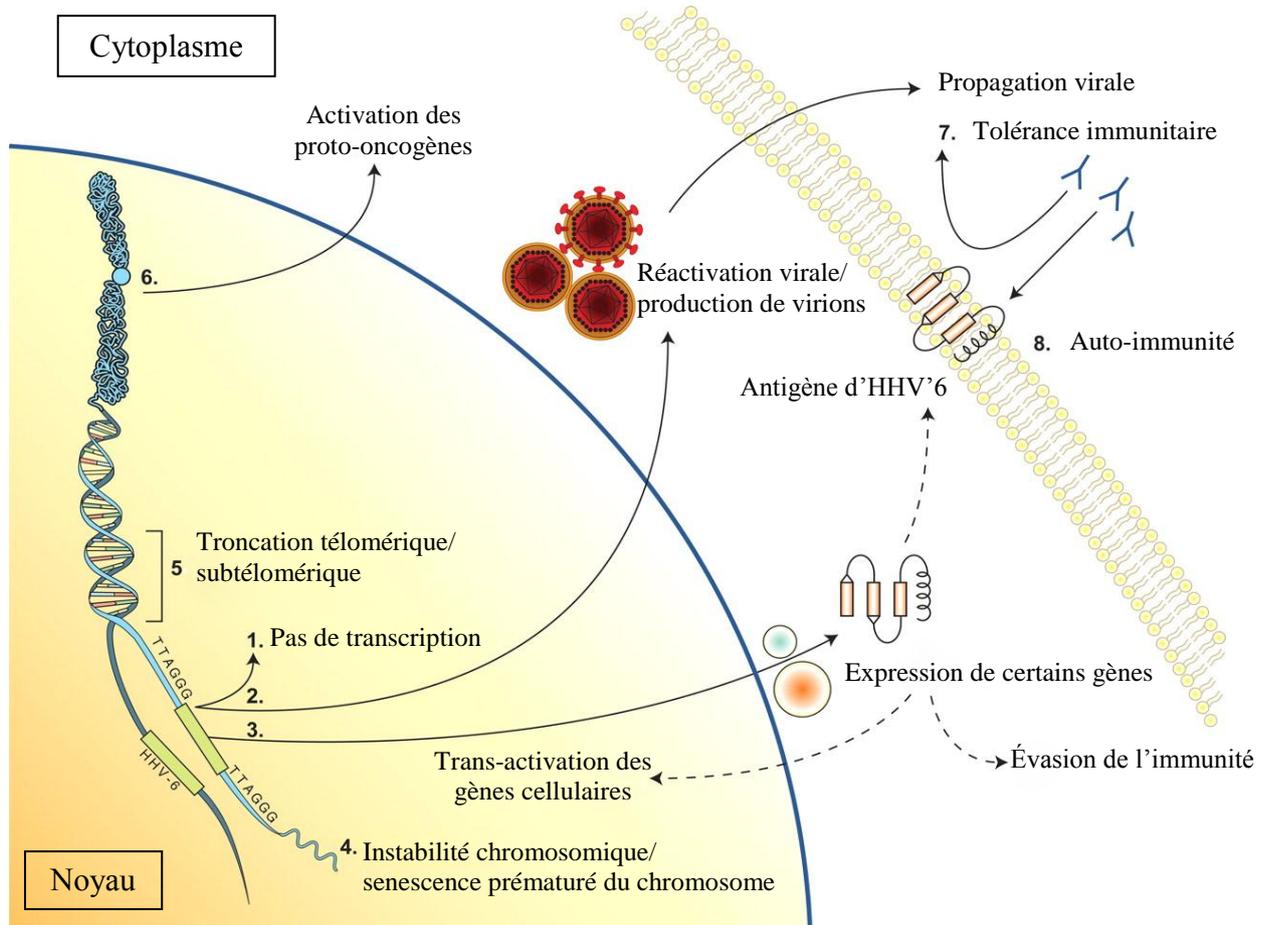


Figure 16 : Les différentes hypothèses des conséquences d'HHV-6 sur la cellule hôte.

(1) Pas de transcription des gènes viraux ; (2) expression du gène viral, réplication et production de virions ; (3) expression d'un ensemble de gènes de l'HHV-6 ; (4 et 5) impact de l'intégration de l'HHV-6 sur la fonction des télomères, l'intégrité, et la stabilité des chromosomes ; (6) activation trans et/ou cis de l'expression du gène cellulaire suite à l'intégration ; (7) tolérance immunitaire due à l'expression des gènes de l'HHV-6 au cours de l'embryogenèse ; (8) destruction de tissus ou de cellules exprimant des antigènes d'HHV-6 suite à un mécanisme de défense immunitaire développé en réponse à une infection naturelle par l'HHV-6. (Morissette et Flamand, 2010)

XI. Le télomère

Tous les chromosomes linéaires des cellules eucaryotes se terminent par une structure spéciale appelée « télomère ».

Les recherches sur les télomères ont commencé à partir des années 1929 lorsque deux généticiens indépendants, Barbara Mc Clintock et Herman J. Müller travaillant sur le maïs et sur la drosophile *melanogaster* respectivement (McClintock, 1929; Müller, 1938; McClintock, 1941), ont suggéré que les extrémités des chromosomes présentent des caractéristiques spéciales qui les protègent et assurent leur stabilité. Müller a signalé que les extrémités des chromosomes ont été scellées par un «gène terminal » qu'il a baptisé « telomeros » (dérivé du grec telos=fin et meros=partie). Mc Clintock a observé que les extrémités cassées des chromosomes sont souvent réparées par des fusions entre elles, même pour générer un réarrangement chromosomique. Il conclut que les télomères jouent un rôle fondamental dans l'intégrité des chromosomes.

XI.1. Problème de la réplication des extrémités d'ADN

Les extrémités des chromosomes raccourcissent à chaque réplication (Olovnikov, 1971; Watson, 1972), ceci a été appelé, par Watson, « the end replication problem » ou « problème de la réplication des extrémités ». James Watson a proposé que les chromosomes perdent de l'ADN au niveau de leurs extrémités à cause de l'ADN polymérase qui n'arrive pas à synthétiser complètement l'extrémité de l'ADN linéaire (Watson, 1972). Alors, plus la cellule se divise, plus les extrémités d'ADN raccourcissent (Figure 17).

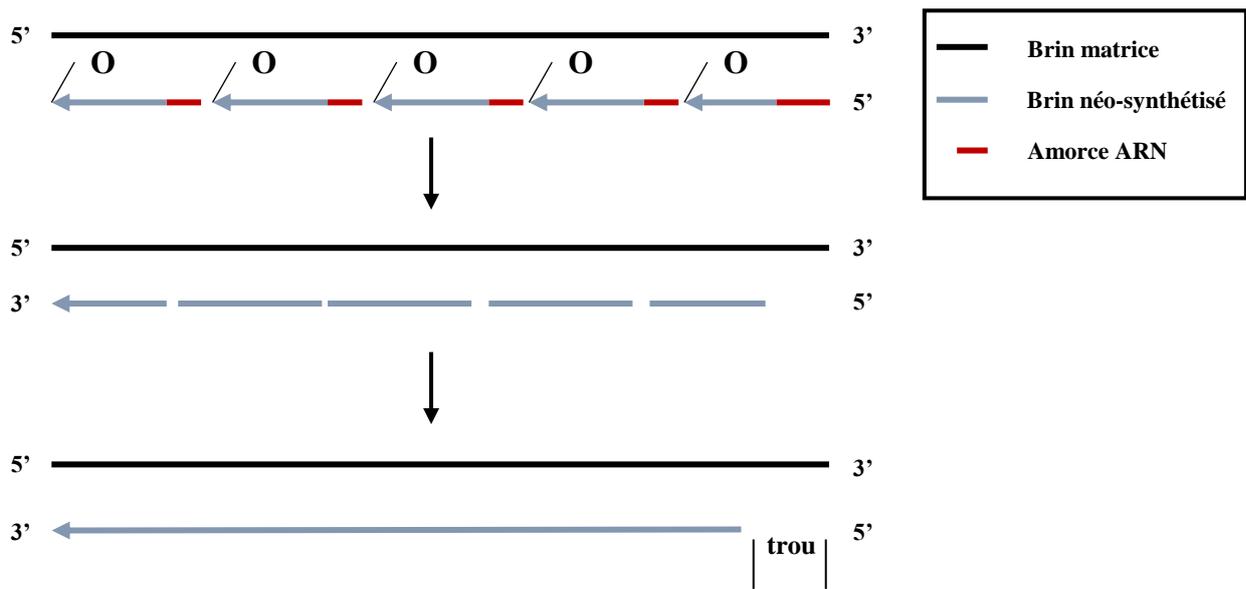


Figure 17 : Représentation schématique du problème de la réplication des extrémités d'ADN.

Un seul brin est représenté pour des raisons de simplicités. L'ADN polymérase nécessite une amorce ARN (générée par l'ARN primase) pour initier la synthèse dans la direction 5'-3'. Les nouveaux brins synthétisés sont appelés « brins d'Okazaki » (dont chaque fragment est composé d'une amorce ARN et d'un fragment d'ADN nouvellement synthétisé). Ensuite l'ADN polymérase supprime les amorces ARN précédées par un 3'OH en les remplaçant par de l'ADN. Puis les fragments d'ADN sont reliés sous l'action de l'ADN ligase. Enfin, à l'extrémité 5' de chaque brin d'ADN néo-synthétisé il y aura un trou (manque d'ADN).

XI.2. La télomérase

En 1978, Elizabeth Blackburn a déterminé la séquence des télomères en examinant les extrémités des gènes d'ADN ribosomiques extra-chromosomiques chez *Tetrahymena thermophila* (un protozoaire) et a constaté que les télomères consistaient en environ 50 répétitions en tandem de CCCCAA/GGGGTT (Blackburn et Gall, 1978). C'est en 1988 que la séquence répétée des télomères humains a été identifiée (TTAGGG)_n (Moyzis *et al.*, 1988).

En 1985, l'activité enzymatique synthétisant de nouvelles répétitions télomériques a été découverte (Greider et Blackburn, 1985) chez *Tetrahymena*, puis chez la levure et chez l'homme (Counter *et al.*, 1997; Nakamura *et al.*, 1997). Cette enzyme a été nommée « transférase terminale » ou « télomérase » (Figure 18). La télomérase est composée de protéines et d'un fragment d'ARN qui contient la séquence CAACCCCAA dont une partie (AACCCC) est complémentaire à la répétition TTGGGG du télomère (protozoaire). Chez l'homme, la séquence d'ARN matrice contient 450 nucléotides 5'-CAAUCCCAAUC... dont

une partie est complémentaire à la répétition TTAGGG. Cette enzyme utilise donc une matrice ARN pour synthétiser de nouvelles répétitions télomériques et compenser la perte d'ADN (Greider et Blackburn, 1989; Yu *et al.*, 1990) (Figure 19). La sous-unité catalytique de la télomérase est la hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase). Avec la hTERC (human Telomerase RNA Component), elles constituent les deux sous-unités majeures de l'enzyme. La télomérase est aussi composée par des facteurs annexes comme par exemple la dyskérine (DKC1) (Weinrich *et al.*, 1997; Kirkpatrick et Mokbel, 2001) (Figure 18). Bodnar et ses collaborateurs ont montré une relation entre la courte taille des télomères et l'entrée des cellules en sénescence (Bodnar *et al.*, 1998).

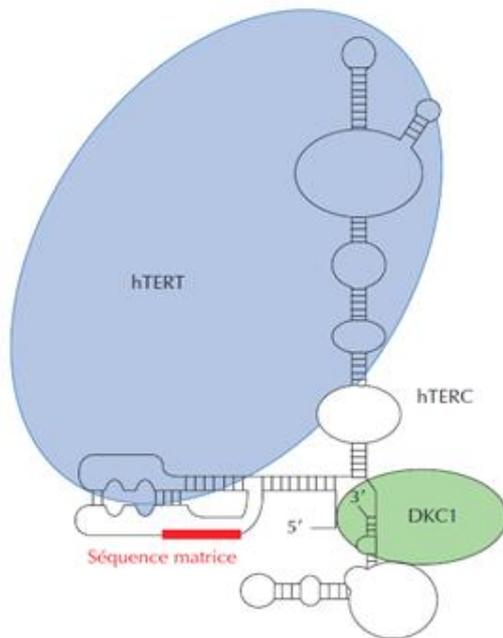
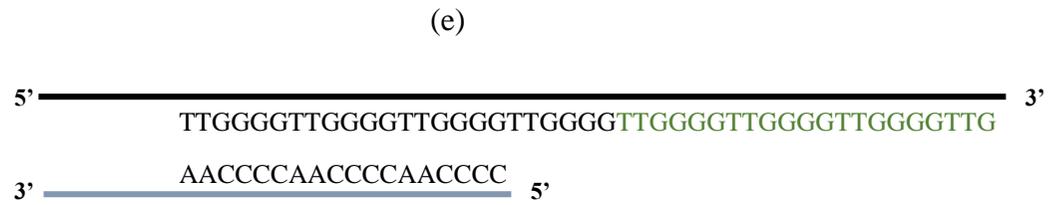
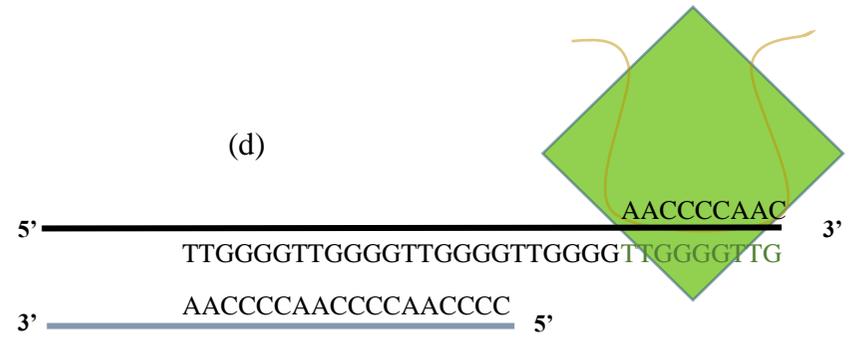
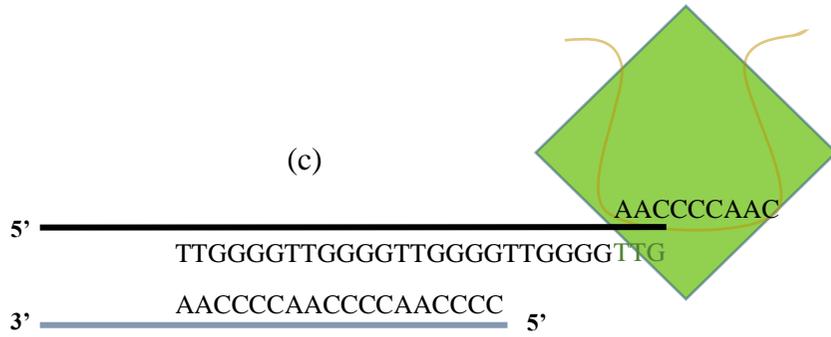
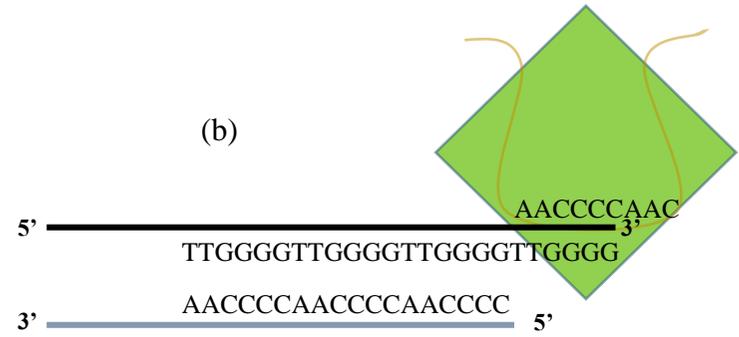
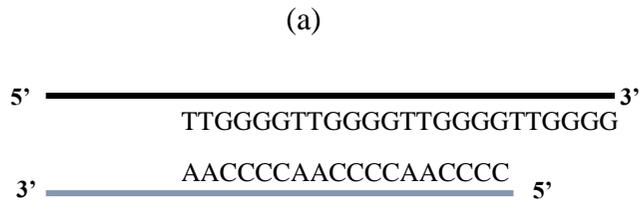


Figure 18 : La télomérase.

Elle est composée de deux sous-unités majeures HTERT et HTERC, d'autres facteurs annexes comme la dyskérine (DKC1) et d'une séquence matrice d'ARN (Rajpar *et al.*, 2011).



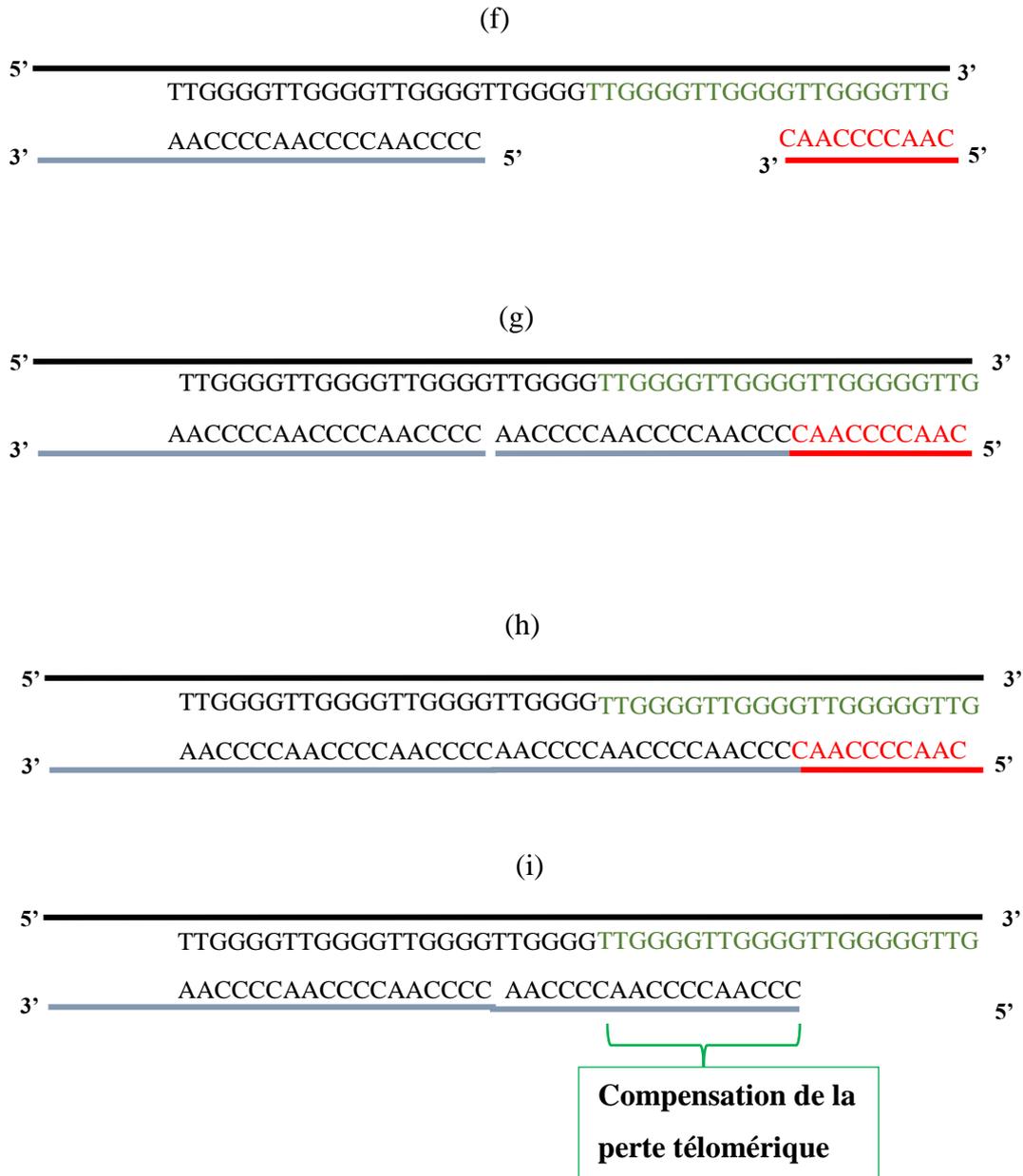


Figure 19 : Mécanisme de l'intervention de la télomérase dans la réparation des extrémités télomériques (protozoaire).

(a) En noir brin matrice, en bleu brin complémentaire : suite à la réplication qui a eu lieu, il existe un manque d'ADN à son extrémité 5'. (b) Fixation de la télomérase sur l'extrémité 5' du brin matrice. (c) (d) En utilisant sa matrice d'ARN, la télomérase ajoute un TTG ensuite GGGTTG. (e) (f) (g) le brin matrice est maintenant plus long, des amorces ARN (en rouge) sont utilisées pour construire le brin complémentaire par l'ADN polymérase. (h) ligation des fragments (sous l'action de la ligase) (i) suppression de l'ARN, la perte en ADN est compensée et le nouveau trou a eu lieu dans de l'ADN « extra » ou néosynthétisé.

XI.3. Complexe de Shelterin

Chez la plupart des eucaryotes, les chromosomes se replient pour former une boucle à leur extrémité. En 1999, Griffith et ses collaborateurs ont montré pour la première fois et par microscopie électronique, l'existence de ces boucles au niveau des télomères humains, ils les ont nommé « *T-loop* » (boucle T pour télomérique) (Griffith *et al.*, 1999). La formation de *T-loop* nécessite la présence des répétitions télomériques et la queue d'ADN simple brin riche en G. Ces séquences d'ADN recrutent une matrice de protéines de liaison spécifiques à l'ADN des télomères, qui catalysent la formation de *T-loop*. L'extrémité 3' de l'ADN simple brin riche en G se lie à l'ADN double brin du télomère (à la séquence riche en C) formant ainsi une deuxième boucle appelée boucle de déplacement ou « *D-loop* » (Figure 20).

La télomérase n'est pas la seule protéine/enzyme pouvant interagir avec les télomères. Il existe un complexe télomérique appelé « Shelterin » ou « télosome » formé de 6 protéines coiffant le télomère : TRF1, TRF2, POT1 (protection of telomeres), TIN2 (TRF1-interacting nuclear protein 2), TPP1 (TIN2-interacting protein 1) et RAP1 (Repressor/Activator Protein 1) (Figure 20).

Ce complexe est impliqué dans la régulation de l'activité de la télomérase, régulation de l'accessibilité au télomère et il sert également pour empêcher que les extrémités des chromosomes ne soient reconnues comme un dommage à l'ADN (de Lange, 2005; Palm et de Lange, 2008). Les interactions dynamiques du complexe shelterin avec les télomères, ainsi que les interactions dynamiques entre les sous-unités du complexe shelterin, sont au centre de la structure et de la fonction des télomères. Cependant, les détails moléculaires de ces interactions sont encore inconnus.

Au niveau de la boucle D, le brin déplacé est lié à une protéine de liaison à l'ADN simple brin, POT1 qui signifie « protection des télomères ». TPP1 est le partenaire hétérodimérique de POT1 (Wang *et al.*, 2007). Le complexe POT1-TPP1 est associé à des protéines de liaisons à l'ADN double brin, TRF1 et TRF2, par un pont formé par TIN2 (Kim *et al.*, 1999; Takai *et al.*, 2010).

L'inhibition de Pot1 entraîne une augmentation de la longueur du télomère, ceci a été expliqué par le fait qu'en absence de POT1 l'extension 3'simple brin devient accessible à la télomérase (Loayza et De Lange, 2003). Au contraire, en 2007, une étude a suggéré un rôle pour le complexe POT1-TPP1 à la fois dans l'activation et la progression de la télomérase (Wang *et al.*, 2007).

TRF1 et TRF2 sont les deux protéines majeures de liaison au télomère. TRF1 est une protéine homodimérique jouant un rôle dans le repliement de l'ADN au niveau du télomère, ce qui aide à la formation de boucles et à la stabilisation. Des études expérimentales ont montré que la quantité de la TRF1 dans une cellule a un effet sur la longueur des télomères. La surexpression de la TRF1, type sauvage, va diminuer la longueur télomérique alors que la surexpression d'un mutant de délétion de la TRF1 mènera à une élongation des télomères par activation de la télomérase. TRF1 est donc un régulateur négatif de la longueur des télomères (Shay, 1999; Blasco, 2003).

Il est supposé que PINX1 (PIN2/TRF1-interacting télomérase inhibitor 1), un inhibiteur de la télomérase, soit recruté vers les télomères *via* l'interaction avec TRF1 (Zhou et Lu, 2001).

La protéine TRF2 joue un rôle important dans la stabilisation des chromosomes. Des études ont montré que la surexpression d'un mutant de délétion de la TRF2 conduit à la perte de la liaison de cette protéine au télomère, la perte de l'extension 3' simple brin, l'induction des voies dommages p53 dépendantes, la fusion des extrémités et un arrêt de la réplication (van Steensel *et al.*, 1998). Le mode d'action de TRF2 semble indépendant de la télomérase. La localisation de TRF2 au niveau de la jonction entre les deux boucles T et D suppose que cette protéine joue un rôle dans la stabilisation de la structure de la boucle T en facilitant l'invasion de l'extrémité 3' simple brin (après repliement du télomère sur lui-même) au niveau de l'ADN télomérique double brin (Figure 20) (Fouche *et al.*, 2006; Nora *et al.*, 2010). Ceci empêche une séquence simple brin d'être reconnue comme une cassure de l'ADN ce qui pourrait avoir comme conséquence l'activation de la réponse aux dommages de l'ADN.

TRF2 peut interagir avec la protéine RAP1 pour jouer un rôle dans la régulation de la longueur télomérique. La surexpression de la RAP1 peut provoquer un allongement des télomères (O'Connor *et al.*, 2004; Arat et Griffith, 2012).

TIN2 a été identifiée comme une protéine qui interagit avec la TRF1. L'expression d'un mutant de délétion de la TIN2 conduit à une élongation des télomères d'une manière dépendante de la télomérase (Kim *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2003). Ceci suggère que la fonction de la TRF1 peut être médiée par TIN2 et que cette dernière régule négativement la longueur des télomères.

En 2004, Kim et ses collaborateurs ont montré *in vitro* que TIN2 interagit aussi avec TRF2. Un mutant de délétion de la TIN2 ne pouvant se lier ni à TRF1 ni à TRF2, induit une

réponse de dommage à l'ADN et déstabilise TRF1 et TRF2 (probablement en les déplaçant) au niveau des télomères (Kim *et al.*, 2004). Les auteurs ont suggéré que les fonctions de TRF1 et TRF2 sont liées à TIN2.

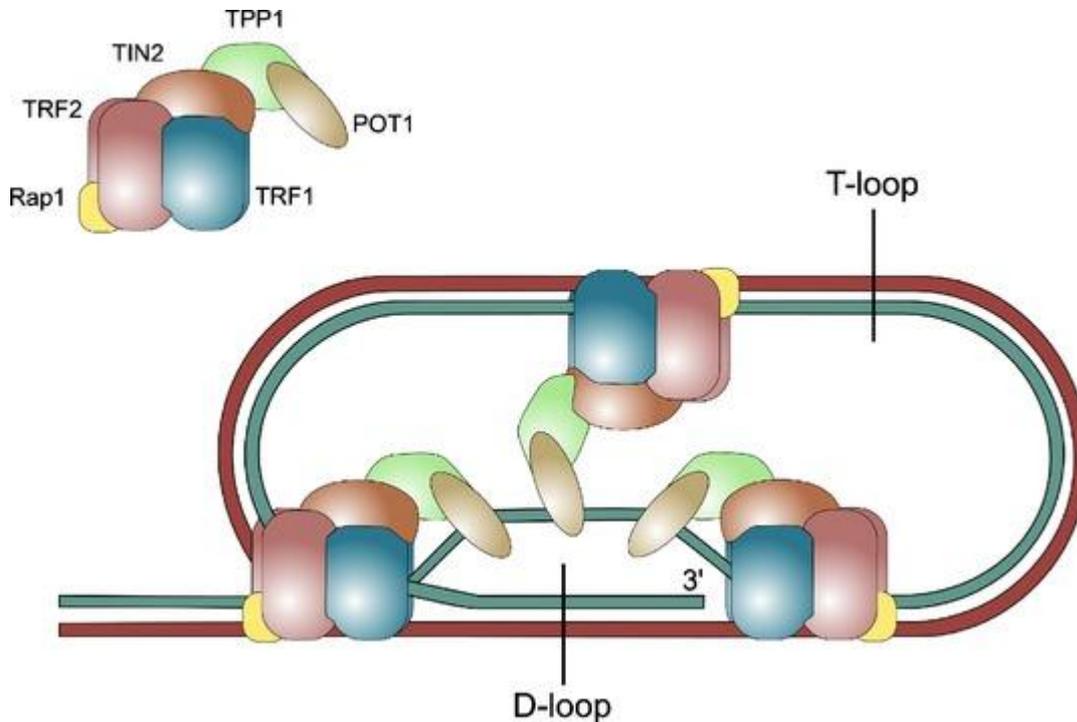


Figure 20 : Représentation schématique de la structure moléculaire du télomère.
(Oeseburg *et al.*, 2010)

XI.4. ALT

Dans les cellules cancéreuses ainsi que lors d'une infection par des virus immortalisants, le contrôle du cycle cellulaire et la réplication de l'ADN sont affectés, y compris l'activation de la télomérase et le rallongement des télomères. La plupart des mécanismes viraux connus pour l'activation de la télomérase impliquent l'activation transcriptionnelle de la reverse transcriptase télomérase humaine (hTERT). Cependant, 10 à 15 % des cellules cancéreuses par exemple utilisent la voie de réparation « ALT » (Alternative Lengthening of Telomeres, allongement alternatif des télomères). C'est un mécanisme alternatif de rallongement des télomères et indépendant de la télomérase. Il est restreint aux cellules cancéreuses et aux lignées cellulaires immortalisées. Ces cellules sont capables de survivre après avoir été traitées par des inhibiteurs de la télomérase.

Alors que la télomérase synthétise les répétitions télomériques en utilisant une matrice d'ARN, l'ALT s'appuie sur deux modèles possibles :

a. L'échange inégal de télomères entre des chromatides sœurs (Unequal T-SCE)

(Figure 22a)

Dans ce modèle, les chromatides sœurs se recombinaison par recombinaison homologue, échangeant leurs positions sur le chromosome. Une très petite partie de l'un des télomères est échangé vers un autre télomère plus grand. Les échanges T-SCE donnent lieu à une cellule fille avec un télomère rallongé et donc une capacité de prolifération prolongée, et une autre cellule fille avec un télomère raccourci et une diminution de la capacité de prolifération.

b. La recombinaison homologue dépendante de la réplication d'ADN (RH) (Figure

22b)

Dans ce modèle, une seule extrémité simple brin d'un télomère envahit la séquence double brin d'un autre télomère d'un chromosome adjacent. Ce brin sert de matrice pour permettre l'allongement des télomères.

Ce modèle est privilégié par rapport au modèle de T-SCE (Cesare et Reddel, 2010). Dans le modèle T-SCE les télomères sont juste échangés, leur nombre n'augmente pas, alors que le modèle RH explique comment le nombre des télomères peut augmenter.

Les cellules qui réalisent un mécanisme ALT sont caractérisées par une association des corps PML (promyelocytic leukemia) à l'ADN télomérique pour former le « APB » (ALT-associated PML bodies, corps PML associés à ALT) (Figure 21).

Les corps PML sont des structures nucléaires dynamiques impliquées dans de nombreux processus cellulaires. Ils facilitent la modification post-traductionnelle et peuvent localiser les protéines à leurs sites d'action. De nombreuses composantes des corps PML sont dites « sumoylates ». En phase G2 du cycle cellulaire, le complexe Smc5/6 et des protéines de la recombinaison homologue s'associent aux corps PML. Nse2 (non-Smc element-2) également connu sous le nom Mms21 (non-structural maintenance of chromosomes element 2 homolog), est une sous-unité du complexe Smc5/6 qui possède une activité SUMO-ligase (small ubiquitin-related modifier ligase). Généralement ce genre de modification joue un rôle dans la régulation des propriétés biochimiques des protéines cibles (l'interaction protéines/protéines, ADN/protéines...). Cette activité n'est pas nécessaire pour l'association du SMC5/6 avec

PML. Cependant, la sumoylation des composantes du complexe shelterin par Nse2 est indispensable pour la formation de « APB » et pour la maintenance des télomères au niveau de ces APB. Ceux-ci favorisent la recombinaison homologue au niveau des télomères.

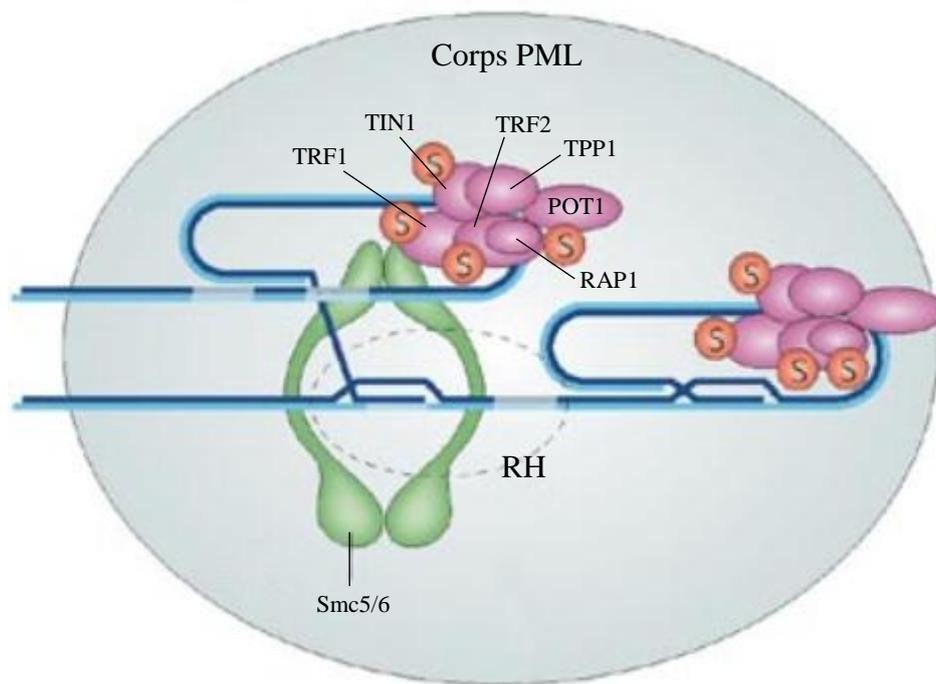


Figure 21 : Complexe moléculaire présent lors du rallongement des télomères par la voie ALT.

RH, recombinaison homologue ; S, sumoylation.

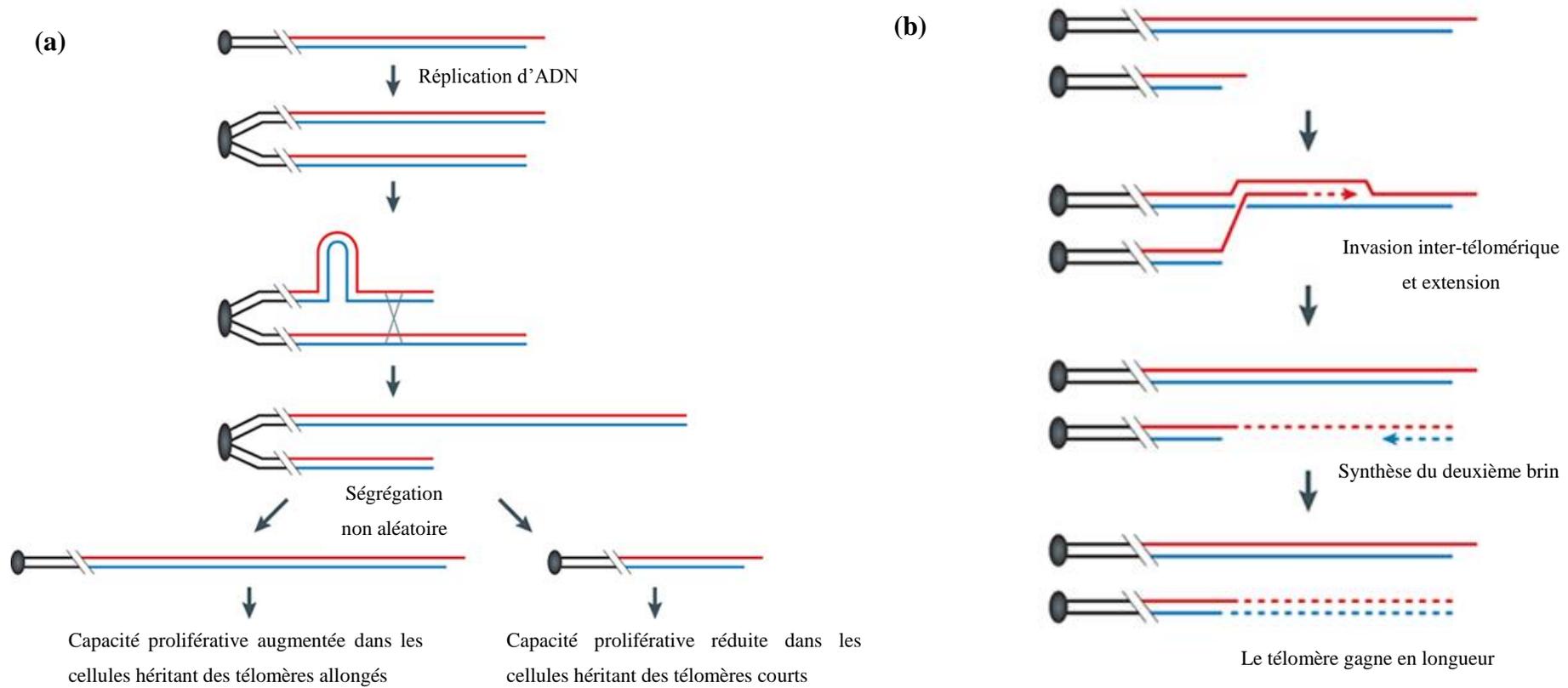


Figure 22 : Mécanisme alternatif de rallongement des télomères indépendant de la télomérase. (a) Unequal T-SCE; (b) recombinaison homologue dépendante de la réplication d'ADN.

D'après (Cesare et Reddel, 2010).

XII. Virus et télomères

L'infection virale peut avoir des effets graves sur la fonction des télomères et la maintenance du génome de la cellule hôte. Elle peut induire la prolifération, l'immortalisation cellulaire et l'augmentation de l'activité de la télomérase

c. EBV

La protéine membranaire de latence LMP1 codée par l'EBV, favorise directement l'activation de la télomérase en agissant sur le niveau de transcription du promoteur de hTERT. Ces effets sont médiés par l'engagement des voies NF-kB, MAPK (kinases activées par les mitogènes) et ERK1/2 (Protéine kinase régulatrice extracellulaire1/2) (Terrin *et al.*, 2008).

Les virus peuvent également provoquer un dysfonctionnement des télomères indépendamment de l'activation de la télomérase. Le dysfonctionnement des télomères est causé par la déficience des mécanismes de contrôle qui maintiennent leur intégrité, ce qui conduit à des ruptures des télomères et à l'activation des réponses spécifiques de dommage de l'ADN télomérique. La réparation imprécise résulte de la formation de répétitions extrachromosomiques d'ADN télomérique (Cesare et Reddel, 2008). L'EBNA1, un antigène nucléaire de l'EBV, est impliqué dans le dysfonctionnement télomérique *via* l'induction d'un stress oxydatif (Gruhne *et al.*, 2009; Kamranvar et Masucci, 2011). Les cellules des tumeurs associées à l'EBV, y compris les cellules de Reed-Sternberg EBV+ du lymphome de Hodgkin, peuvent ainsi avoir une morphologie et une organisation télomérique altérées (Knecht *et al.*, 2010).

d. HHV-8

L'ORF 73 de l'herpèsvirus HHV-8 code un antigène nucléaire associé à la latence (LANA) qui active hTERT *via* SP1 (Verma *et al.*, 2004).

SP1 est un facteur de transcription à doigts de zinc, qui se lie aux séquences d'ADN riches en GC (Berg, 1992). La séquence de hTERT contient 5 blocs riches en GC et qui sont capables de lier SP1 pour réguler positivement l'expression de hTERT. LANA peut se lier à SP1. Cette liaison active d'une manière synergique les transcriptions médiées par SP1. Il est proposé que la capacité oncogénique de LANA soit due en partie à sa capacité à augmenter la

transactivation du promoteur de hTERT, en ciblant le facteur de transcription Sp1, contribuant ainsi à l'immortalisation des cellules (Verma *et al.*, 2004).

La protéine LANA de l'HHV-8 a été montrée interagir à la fois avec TRF1 et TRF2, et provoquer le raccourcissement des télomères (Shamay *et al.*, 2012).

e. CMVH

Les virus non immortalisants peuvent également affecter l'activité de la télomérase dans la cellule infectée. Il a été rapporté que l'infection par le cytomégalovirus humain (CMVH) augmente l'activité de la télomérase par induction de la transcription de hTERT dans des fibroblastes diploïdes humains, HDF (human diploid fibroblasts), probablement *via* SP1. La transactivation de hTERT a été accompagnée par une augmentation des liaisons de SP1 au promoteur hTERT. Cela a été proposé comme étant un mécanisme potentiel d'un effet carcinogène du CMVH (Straat *et al.*, 2009).

f. HHV-6 et MDV

L'HHV6 et le MDV s'intègrent de manière efficace dans l'ADN télomérique hôte par recombinaison homologue avec des séquences répétées télomériques (TR) présentes à l'extrémité du génome viral. A ce jour, il n'est pas décrit un dysfonctionnement des télomères associé à l'intégration d'HHV-6. Mais, Huang et ses collaborateurs ont rapporté que la taille du télomère porteur du virus a été plus courte (dans 45% des cas de CIHHV-6 étudiés) que celle du chromosome non porteur (Huang *et al.*, 2013).

Concernant le MDV, les TR aux extrémités de son ADN facilitent son intégration dans le génome de la cellule hôte (chez les poules). Cette intégration est importante pour l'établissement d'un état de latence et la formation des lymphomes (Kaufer *et al.*, 2011). Pendant l'état latent de l'infection MDV, peu de transcrits et de protéines sont produits, ils assurent la mise en place et le maintien de l'état de latence de l'infection. La protéine Meq semble être la protéine la plus importante produite pendant la latence et dans les tumeurs associées à MDV. Elle sert de répresseur de l'expression des gènes viraux lytiques, elle est également un puissant activateur de la transcription lorsqu'elle est dans un complexe hétérodimérique avec la proto-oncoprotéine c-jun. La protéine Meq peut interagir avec P53 et RB améliorant ainsi la transformation et la prolifération des cellules T (Liu et Kung, 2000; Lupiani *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2006; Osterrieder *et al.*, 2006).

Un autre facteur semble être important dans la tumorigenèse induite par le MDV : c'est l'ARN de la télomérase virale (vTR), un homologue de l'ARN de la télomérase cellulaire. Etant une partie du complexe de la télomérase, vTR assure une activité accrue de la télomérase aux stades précoces de la lymphomagenèse mais vTR peut également favoriser la formation de tumeurs indépendamment de sa présence dans le complexe de la télomérase (Kaufer *et al.*, 2010).

g. HPV

La protéine E6 des papillomavirus humains (HPV) oncogènes, active la transcription de hTERT par une voie cMyc-dépendante. E6 active hTERT et la télomérase à travers la protéine ubiquitine ligase « E6AP » en interagissant avec MYC et en modulant l'activité des répresseurs USF1 et USF2 (facteurs de stimulation amont 1/2, Upstream Stimulating Factors 1/2), de certains facteurs de transcription nucléaires NFX1-91 (nuclear factor X box-binding protéin 1-91) et des activateurs MYC-MAX (facteur X associé à MYC), SP1 et histone acétyltransférases qui se lient au promoteur de hTERT (Howie *et al.*, 2009).

E6 peut se lier directement à NFX123 pour augmenter le niveau d'expression de TERT par des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels (Katzenellenbogen *et al.*, 2007).

Il a été montré que la protéine E7 des mêmes virus permet la maintenance du télomère en l'absence d'E6 et malgré une faible activité télomérase détectée. Alors il est suggéré qu'E7 utilise la voie ALT (Alternative Lengthening Telomeres) pour favoriser l'allongement des télomères (Moody et Laimins, 2010).

Les protéines virales peuvent également se lier à des facteurs télomériques et modifier leur capacité à maintenir la structure des télomères. Il a été montré que la protéine E6 d'HPV peut interagir directement avec le complexe télomérase/ADN télomérique, ce qui contribue à la transformation des kératinocytes par HPV (Liu *et al.*, 2009).

h. HBV

Le micronoyau, est un indicateur de dommages chromosomiques. Il survient en anaphase ou télophase du cycle cellulaire (Figure 23), lorsqu'un chromosome ou un fragment chromosomique n'est pas incorporé dans l'un des noyaux fils. Ceci se manifeste dans l'interphase par un petit noyau dans le cytoplasme de la cellule. Il a été signalé une instabilité

chromosomique (présence de micronoyaux) et un raccourcissement des télomères dans les cellules infectées d'une manière chronique par le virus de l'hépatite B (HBV) ainsi qu'au niveau des carcinomes hépatocellulaires associés à l'HBV (Lee *et al.*, 2009). Cela a été accompagné d'une augmentation d'expression des transcrits de TRF1, TRF2 et TIN2 et de la protéine TRF1 (Oh *et al.*, 2005). Les auteurs ont conclu que TRF1, TRF2, et TIN2 pourraient être impliqués dans l'hépatocarcinogénèse en jouant un rôle important dans le raccourcissement des télomères.

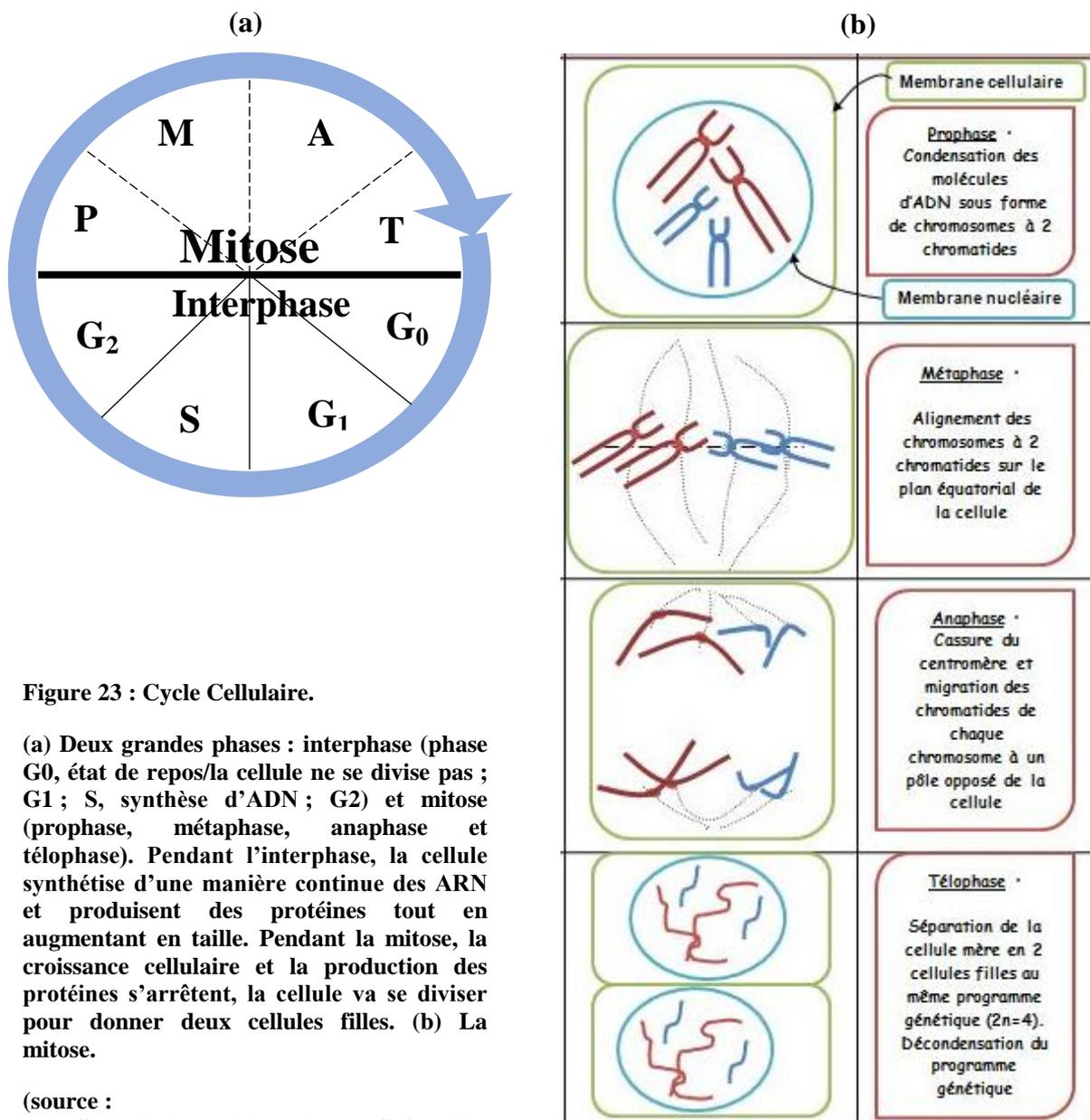


Figure 23 : Cycle Cellulaire.

(a) Deux grandes phases : interphase (phase G₀, état de repos/la cellule ne se divise pas ; G₁ ; S, synthèse d'ADN ; G₂) et mitose (prophase, métaphase, anaphase et télophase). Pendant l'interphase, la cellule synthétise d'une manière continue des ARN et produisent des protéines tout en augmentant en taille. Pendant la mitose, la croissance cellulaire et la production des protéines s'arrêtent, la cellule va se diviser pour donner deux cellules filles. (b) La mitose.

(source : <http://lamalledesvt.chispasdesal.es/fr/svt-bio-geo/3eme-3o-e-s-o/genetique/>).

Partie 3 : Syndrome d'hypersensibilité médicamenteuse

I. Historique : définition et nomenclature

Les réactions aux médicaments sont bien répertoriées depuis 1950, lorsque Chaiken et ses collaborateurs ont décrit le premier cas (Chaiken *et al.*, 1950). Il s'agissait d'un patient atteint d'hépatite avec jaunisse et qui a développé un rash cutané (suivi de fièvre) associé à des lymphadénopathies et une atteinte multiviscérale, ceci 1 à 8 semaines après avoir démarré un traitement par la phénytoïne, anticonvulsivant aromatique.

De même, en 1979, une réaction à la phénytoïne a été rapportée par Haruda. Elle s'est caractérisée par des éruptions cutanées, de la fièvre, une angine, une éosinophilie, une lymphadénopathie et une hépatite (Haruda, 1979).

D'autres études ont rapporté une symptomatologie similaire peu de temps après une prise de phénobarbital (McGeachy et Bloomer, 1953) ou de carbamazépine (Pellock, 1987; Shear et Spielberg, 1988), qui correspondent également à des médicaments anticonvulsivants.

En 1988, Shear et Spielberg ont baptisé cette pathologie « AHS », pour Anticonvulsant Hypersensitivity Syndrome (Shear et Spielberg, 1988).

En 1996, il a été détecté, la présence des lymphocytes atypiques dans le sang d'un enfant de 7 ans, après qu'il ait eu un traitement à base de carbamazépine et phénytoïne afin de traiter ses convulsions (Gorlin et Ferry, 1996).

Saltzstein et Ackerman, ont décrit cette réaction médicamenteuse cutanée induite par des médicaments anticonvulsivants, comme étant un pseudolymphome, en raison de certaines similarités cliniques et histologiques avec un lymphome malin (Saltzstein et Ackerman, 1959).

Cependant, en 1996, une étude de Callot et ses collaborateurs, a fait la distinction entre le syndrome d'hypersensibilité et le pseudolymphome induit par une drogue. Ils ont considéré deux entités distinctes avec des caractéristiques cliniques et biologiques différentes. Le pseudolymphome cutané n'entraîne pas de symptômes systémiques ou d'atteinte viscérale contrairement au syndrome d'hypersensibilité caractérisé le plus souvent par de la fièvre, une lymphocytose, une éosinophilie ou la présence de lymphocytes atypiques (Callot *et al.*, 1996).

Afin d'éviter toute ambiguïté, le syndrome d'hypersensibilité a été renommé « DRESS », pour Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms (Bocquet *et al.*,

1996). Le terme « DIHS », pour Drug-Induced Hypersensitivity Syndrom est également utilisé dans la littérature pour désigner cette pathologie (Shiohara et Kano, 2007).

Il a été montré par la suite qu'il n'y a pas que les anticonvulsivants qui soient impliqués, d'autres molécules sont incriminées dans cette pathologie comme l'allopurinol, les sulfamides, la minocycline et bien d'autres... (Tableau IV). Le terme « AHS » n'est donc plus très utilisé.

Classe	Molécules
Anticonvulsivants	Carbamazépine, phénytoïne, valproate de sodium, phénobarbital, lamotrigine, hydantoïne
Antibiotiques	Minocycline, amoxicilline, dapsone, métronidazole, cotrimaxazole, spiramycine, vancomycine
Anti-inflammatoires non-stéroïdiens	Sulfasalazine, naproxène, phénylbutazone, piroxicam, diclofénac, fenbufène, nalfon, ibuprophène
Antidépresseurs	Desipramine, fluoxétine
Antithyroïdiens de synthèse	Benzylthio-uracile
Inhibiteurs de l'enzyme de conversion	Captopril, enalapril
Autres	Allopurinol, sels d'or, azathioprine, abacavir, ranélate de strontium, télaprévir, bocéprévir, névirapine, éfavirenz, mexilétine, diaphénylsulphone, olanzapine, hydroxychloroquine

Tableau IV : Médicaments susceptibles de déclencher un syndrome de DRESS (liste non exhaustive)

II. Epidémiologie

L'incidence du DRESS est n'est pas encore bien définie. La fréquence de survenue d'un DRESS varie selon le type de médicaments et l'état immunitaire du patient. Elle varie de 1 à 5/10 000 patients exposés à des anticonvulsivants (la carbamazépine ou la phénytoïne) et semble être plus élevée chez les patients prenant de la lamotrigine avec 1/300 adultes et 1/100 enfants exposés (Tennis et Stern, 1997; Guberman *et al.*, 1999; Knowles *et al.*, 2012). Les personnes immunodéficientes semblent être plus susceptibles de développer cette maladie.

Une étude prospective, de sept ans, faite sur la population générale à l'Est de l'Inde, a estimé l'incidence annuelle à 0.9/100 000 (carbamazépine, allopurinol et minocycline représentaient 2/3 des cas) (Muller *et al.*, 2003). Le DRESS peut survenir chez les enfants, mais la plupart des cas surviennent chez les adultes, sans prédilection de sexe (Cacoub *et al.*, 2011).

Les atteintes systémiques graves sont responsables d'une mortalité de 10 à 20%, dont la plupart sont le résultat d'une insuffisance hépatique.

III. Symptômes et progression clinique

Chez la majorité des patients qui développent un DRESS, les symptômes apparaissent 2 à 6 semaines après la prise du médicament (Roujeau et Stern, 1994; Bocquet *et al.*, 1996). Ce temps entre l'exposition au médicament et l'apparition des symptômes est beaucoup plus long que pour la plupart des autres éruptions dues aux médicaments. Par exemple, l'apparition des éruptions morbilliformes (la manifestation dermatologique la plus rencontrée dans le DRESS) survient 5 à 10 jours après la prise médicamenteuse et l'apparition d'un syndrome de Stevens-Johnson (TEN/toxic epidermal necrolysis) entre 4 et 28 jours (Mockenhaupt, 2012).

Les premiers symptômes les plus courants sont une fièvre à 38°C-40°C, un malaise, une lymphadénopathie, et une éruption cutanée. Ces symptômes ne sont pas toujours tous présents (Kardaun *et al.*, 2007).

L'éruption apparaît initialement au niveau du visage et de la partie supérieure du tronc et des extrémités (Vittorio et Muglia, 1995). Elle débute sous forme d'une éruption morbilliforme qui progresse, plus ou moins rapidement, vers un érythème diffus avec accentuation folliculaire. L'étendue de la surface atteinte est un marqueur important de la gravité de la maladie. Dans la moitié des cas, un œdème facial associé à l'érythème peut apparaître.

Une lymphadénopathie diffuse, a été rapportée chez 30 à 60% des patients atteints de DRESS (Cacoub *et al.*, 2011). Elle est similaire à une lymphadénopathie d'origine virale ou à une hyperplasie lymphoïde bénigne.

Une défaillance multi-viscérale peut survenir. La sévérité de la maladie est associée à l'atteinte viscérale. Ces atteintes sont essentiellement hépatiques, rénales ou pulmonaires. Cependant d'autres organes peuvent également être atteints dont le cerveau, le pancréas, la

thyroïde, les yeux, les muscles et les nerfs périphériques (Knowles *et al.*, 1999; Sekine *et al.*, 2001; Knowles *et al.*, 2012).

Les anomalies hématologiques détectées chez les patients atteints de DRESS comprennent une éosinophilie (dans 50 à 90% des cas) et une lymphocytose atypique avec de grands lymphocytes activés, des lymphoblastes, des cellules ressemblant à celles trouvées dans la mononucléose infectieuse (dans 30 à 70% des cas).

Généralement, le rash cutané et l'atteinte viscérale guérissent progressivement après le retrait du médicament. Le délai moyen de guérison est de six à neuf semaines. Dans près de 20% des cas, la maladie peut persister pendant plusieurs mois avec des pics successifs de rémission et de rechute. Les rechutes ont été associées le plus souvent à la réactivation de l'HHV-6 (Tohyama *et al.*, 2007). Dans la très grande majorité des cas cités en littérature sur le DRESS, la réactivation de l'HHV-6 a été mentionnée (Shiohara *et al.*, 2007; Cacoub *et al.*, 2011). Dans d'autres cas, il a été observé la réactivation d'autres virus comme par exemple l'EBV, le CMV (Hashizume et Takigawa, 2005) et le paramyxovirus (Naniwa *et al.*, 2007).

Au début de l'apparition des symptômes, il est observé une très forte baisse du taux des anticorps IgG, IgM et IgA dans le sérum. Les taux d'anticorps atteignent leur plus bas niveau une semaine après le retrait du médicament en cause, avant qu'ils subissent progressivement un recouvrement complet (figure 24).

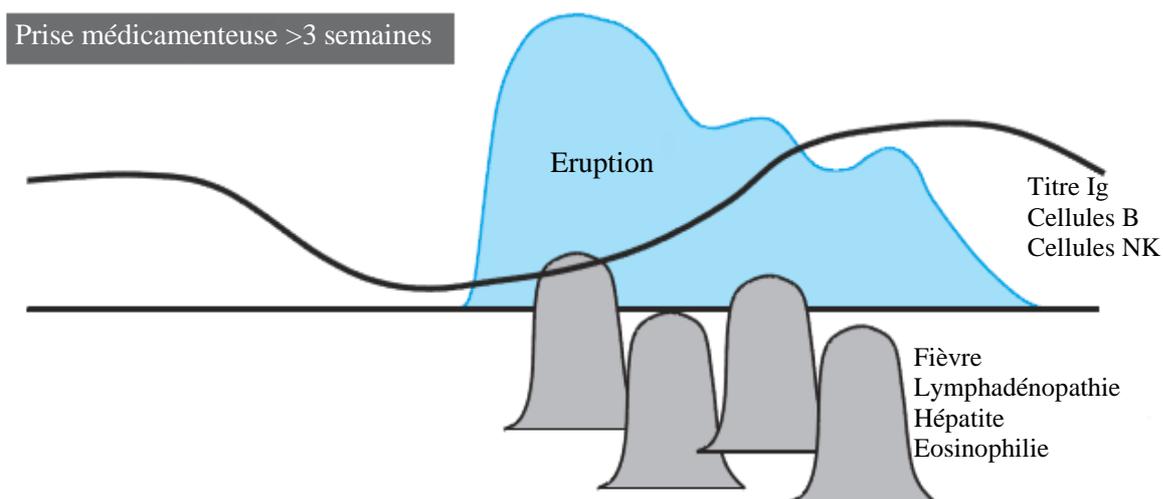


Figure 24 : Progression clinique et biologique d'un DRESS.

Ce syndrome débute habituellement 3 semaines après la prise médicamenteuse par une fièvre suivie d'une éruption maculo-papuleuse. Des symptômes qui apparaissent, peuvent persister et empirer même après l'arrêt de la prise médicamenteuse.

D'après (Shiohara *et al.*, 2006).

IV. Diagnostic

Il n'existe pas de norme fiable pour le diagnostic de DRESS. La difficulté réside dans le fait que les cliniciens doivent exclure certaines pathologies, y compris les infections, les processus néoplasiques, les troubles auto-immuns et les maladies du tissu conjonctif. Aujourd'hui les critères de diagnostic proposés, sont fondés sur l'analyse des résultats cliniques et de laboratoire.

Bocquet et ses collaborateurs ont défini pour la première fois les critères de ce syndrome (Bocquet *et al.*, 1996). Depuis, deux autres listes de critères ont été développées, l'une par le « RegiSCAR » (European Registry of Severe Cutaneous Adverse Reaction) (Kardaun *et al.*, 2007) et l'autre par le j-SCAR (Japanese Research Committee on Severe Cutaneous Adverse Reaction) (Tableau V), celle-ci étant la plus utilisée aujourd'hui (Shiohara et Kano, 2007).

Bocquet <i>et al.</i>	RegiSCAR	J-SCAR
Éruption cutanée médicamenteuse	Éruption cutanée aiguë	Éruption maculo-papuleuse développement >3 semaines après l'administration du médicament incriminé
Anomalies hématologiques	Réaction suspectée être liée au médicament	Prolongation des symptômes cliniques après l'arrêt du médicament en cause
Néphrite interstitielle	Hospitalisation Fièvre $\geq 38^{\circ}\text{C}$	Fièvre $\geq 38^{\circ}\text{C}$ Cytolyse hépatique (ALT ≥ 100 U/L) ou autres atteintes viscérales
Pneumopathie interstitielle	Nombre de lymphocytes inférieur ou supérieur à la limite normale	Anomalies leucocytaires (≥ 1)
Atteinte systémique	Atteinte de ≥ 1 organe interne	Leucocytose ($> 11000 \times 10^6/\text{L}$)
Hépatite : transaminases hépatiques ≥ 2 fois la normale Éosinophiles $\geq 1,5 \times 10^9/\text{L}$ Présence de lymphocytes atypiques	Anomalie de la numération sanguine Éosinophiles $>$ à la limite normale	Lymphocytes atypiques $> 5\%$ Éosinophiles $\geq 1,5 \times 10^9/\text{L}$
Adénopathies : diamètre des ganglions lymphatiques ≥ 2 cm	Augmentation du nombre de ganglions lymphatiques impliqués ≥ 2 sites	Lymphadénopathie
Cardite	Plaquettes $<$ limite normale	Réactivation de l'HHV-6

Tableau V : Les critères de diagnostic du DRESS selon diverses classifications.

V. Pathogenèse et implication virale

Il existe une similarité entre les symptomatologies du DRESS et de la mononucléose infectieuse, ce qui laisse penser qu'un virus pourrait être impliqué dans le DRESS. Le DRESS a comme caractéristiques le délai observé entre l'administration du médicament incriminé et l'observation clinique des symptômes, ainsi que les pics symptomatologiques qui peuvent survenir malgré l'arrêt de la prise médicamenteuse. Ces caractéristiques ne permettent pas de conclure à une étiologie liée directement au médicament (Shiohara et Kano, 2007).

Il existe deux facteurs clés dans la pathogenèse du DRESS : la réponse immunitaire spécifique à la drogue et la réactivation d'un herpèsvirus.

La réponse immunitaire spécifique a été montrée dans de nombreuses études par des «patch tests» positifs, tests permettant de déterminer si une molécule spécifique est capable de provoquer une réaction inflammatoire) chez un individu. Elle a aussi été montrée *in vitro* par des tests de prolifération lymphocytaire (Elzagallaai *et al.*, 2009; Santiago *et al.*, 2010).

En 1997, le DRESS a été associé pour la première fois à une infection par l'HHV-6 (Descamps *et al.*, 1997). Une femme épileptique de 25 ans, traitée par du phénobarbital, avait déclenché une éruption cutanée morbilliforme, de la fièvre (40°C), une éosinophilie, une lymphadénopathie, avec une présence de lymphocytes atypiques et une atteinte hépatique. Ces symptômes étaient associés à une infection active par l'HHV-6. La recherche d'autres virus (VIH-1 et 2, EBV, HTLV-1, parvovirus B19, HCV, HBV et picornavirus) s'était montrée négative.

Cette association a été confirmée par plusieurs auteurs (Suzuki *et al.*, 1998; Tohyama *et al.*, 1998). La réactivation de l'HHV-6 semble survenir uniquement dans le DRESS et pas dans les autres hypersensibilités médicamenteuses. Pour cela la réactivation de l'HHV-6 est devenue aujourd'hui l'un des critères du diagnostic du DRESS.

La réactivation séquentielle des autres herpèsvirus a été montrée lors du DRESS dont l'HHV-7, l'EBV, le HCMV et le HSV (Aihara *et al.*, 2001; Descamps *et al.*, 2003). Seishima et ses collaborateurs ont décrit chez leurs patients une cascade de réactivations virales sériques commençant par celle de l'HHV-6 et/ou l'HHV-7 puis celle du HCMV et/ou de l'EBV (Seishima *et al.*, 2006).

Ceci ne semble pas être un ordre immuable. En effet, Kano et ses collaborateurs ont étudié par des PCR quantitatives des échantillons séquentiels de sang provenant de 4 patients atteints de DRESS. Ils ont observé les cascades de réactivation suivantes :

- patient 1 : HHV-6, puis EBV, puis HHV-7 et finalement HCMV,
- patient 2 : EBV, puis HHV-6
- patient 3 : HHV-6, puis EBV et enfin HCMV,
- patient 4 : HHV-6 puis HCMV.

Les auteurs ont suggéré que l'ordre de la cascade peut être déterminé par le virus qui réactive en premier et que ces virus sont liés « fonctionnellement » *in vivo*, la réactivation de l'un conduisant à la réactivation de l'autre (Kano *et al.*, 2006).

Une étude effectuée sur 40 patients atteints du DRESS, en réponse à la carbamazépine, l'allopurinol ou à la sulfaméthoxazole, a montré une réactivation de l'EBV, de l'HHV-6 ou de l'HHV-7 chez 76% des patients. Les lymphocytes T CD8+ ont été activés chez tous les patients et une forte sécrétion d'INF γ et de TNF α a été détectée (Picard *et al.*, 2010).

VI. Rôle de l'HHV-6 dans le DRESS

La réactivation des herpèsvirus est susceptible de jouer un rôle dans le DRESS, surtout la réactivation de l'HHV-6 qui semble survenir systématiquement lors de cette maladie.

A ce jour, deux grandes hypothèses s'opposent (Figure 25) (Descamps, *et al.*, 2008) :

1^{ère} hypothèse : la symptomatologie du DRESS et la réactivation de l'HHV-6 sont les conséquences d'une réaction immunitaire initiale dirigée contre la drogue incriminée (Shiohara *et al.*, 2006) (Figure 25a).

Des études réalisées à partir de cellules mononuclées sanguines de patients atteints de DRESS ont montré que les lymphocytes T peuvent être stimulés *in vitro* en présence de la drogue incriminée dans la maladie (Hashizume *et al.*, 2002; Cordel *et al.*, 2004). D'autres ont montré par immunohistochimie effectuée sur des patients sensibles aux anticonvulsivants (notamment le phénobarbital), que les cellules T CD4+ et les cellules T CD8+ s'infiltrèrent dans la peau au niveau lésionnel. Ces études permettent de définir le DRESS comme une maladie médiée par l'immunité.

Une diminution du nombre de lymphocytes B (Kano *et al.*, 2004) et de cellules NK a été associée au DRESS (Inaoka, 2005; Yazicioglu *et al.*, 2012). Il est possible qu'une réactivation du virus latent survienne en conséquence de cette immunodéficience.

2^{ème} hypothèse : La réactivation de l'HHV-6 est la cause des manifestations cliniques du DRESS (Figure 25b).

Dans une étude effectuée sur 100 patients atteints de DRESS (Tohyama *et al.*, 2007), il a été détecté 2 à 4 semaines après l'apparition des symptômes, une augmentation du titre d'anticorps contre l'HHV-6 dans environ 60 % des cas. Parmi les patients présentant une augmentation de leur titre d'anticorps, 30% avaient une quantité importante d'ADN d'HHV-6 dans leur sérum, ce qui indique une réplication virale active chez ces patients. Les poussées évolutives étaient liées à la détection de l'ADN d'HHV-6 dans le sang périphérique, suggérant que la réactivation virale contribuait à la sévérité du DRESS (Tohyama *et al.*, 2007).

La similitude des manifestations cliniques entre une infection primaire par l'HHV-6 et le DRESS, y compris les manifestations cutanées et viscérales comme l'hépatite, et des modifications biologiques comme la lymphopénie, suggère que le virus peut être lui-même responsable des manifestations du DRESS.

De plus, la détection d'ADN et d'ARNm de l'HHV-6, par PCR quantitative et par hybridation *in situ*, au niveau des lésions de la peau d'un patient atteint de DRESS, soutient cette hypothèse (Chiou *et al.*, 2008; Teraki *et al.*, 2008).

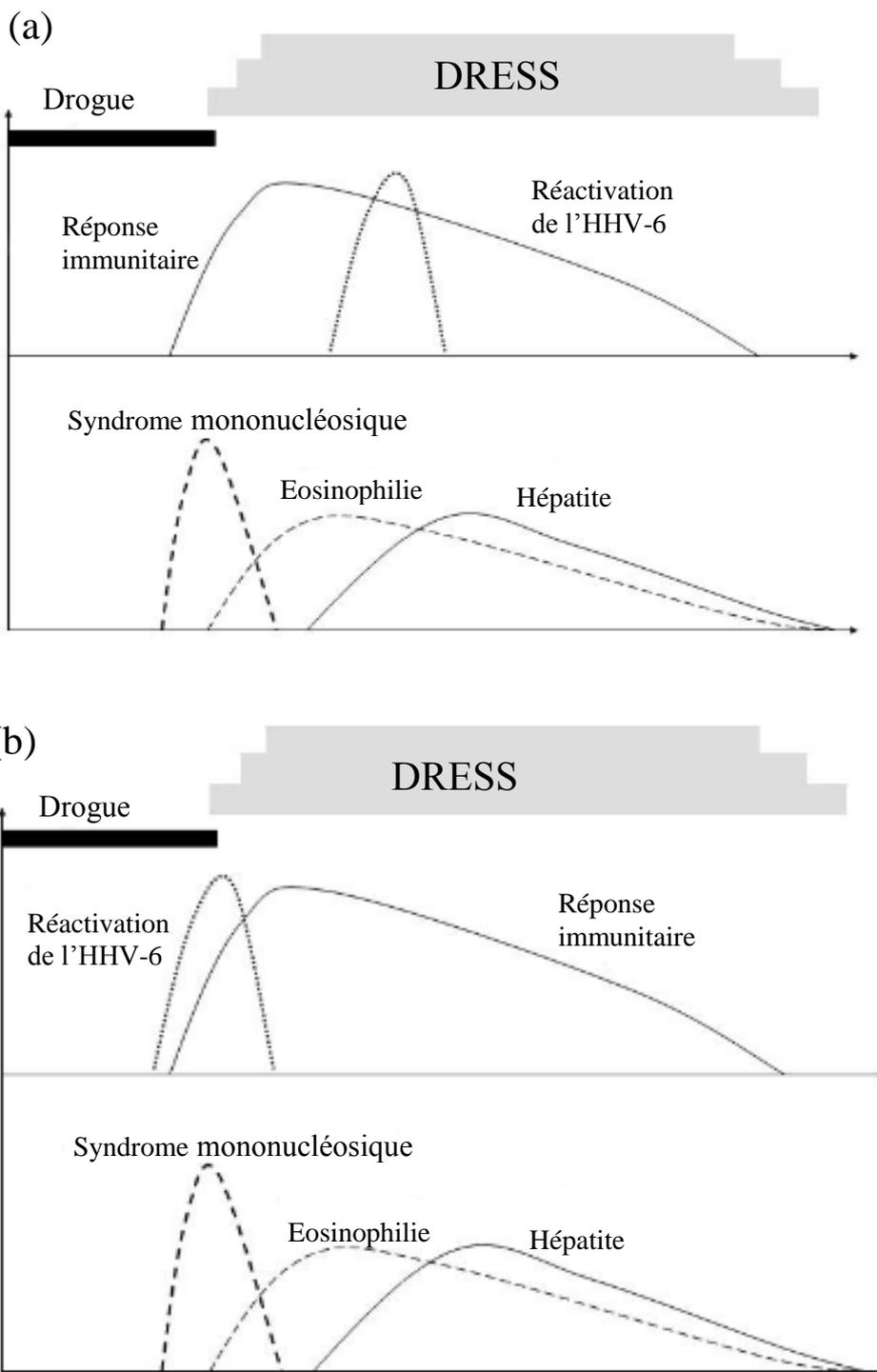


Figure 25 : Les deux hypothèses possibles lors du DRESS
 (a), soit la réactivation d'HHV-6 est la conséquence de la réaction immunitaire, (b) soit La réactivation de l'HHV-6 est la cause des manifestations cliniques du DRESS. D'après (Descamps *et al.*, 2008)

VII. Prévention et traitement

La reconnaissance précoce des effets indésirables du médicament et le retrait du médicament en cause sont les deux étapes essentielles du traitement.

Le DRESS est traité par des corticostéroïdes par voie orale pendant une semaine. Une amélioration de l'état clinique du patient est observée en général quelques jours après le début du traitement (Bocquet *et al.*, 1996; Shiohara *et al.*, 2006; Gentile *et al.*, 2010). Dans le cas où les symptômes persistent après le traitement par corticostéroïdes oraux, l'une des options suivantes, ou leur combinaison, peuvent être appliquées (Shiohara *et al.*, 2006; Kito *et al.*, 2012) :

- méthylprednisolone, un glucocorticoïde (30 mg/kg/jour par voie intraveineuse pendant 3 jours),
- plasmaphérèse,
- administration d'immunoglobulines par voie intraveineuse.

Le traitement empirique par des antibiotiques ou des anti-inflammatoires ne doit pas être réalisé au cours de la phase aiguë de la maladie, car il peut aggraver l'état clinique des patients en raison d'une réactivité croisée inexplicite entre les médicaments.

Etant donné que la prédisposition génétique au DRESS est possible (Pirmohamed, 2006), il est recommandé de ne pas prescrire le même médicament à un autre membre de la famille.

Objectifs

Les travaux de cette thèse sont divisés en deux parties :

1- HHV-6 et DRESS

Cette première partie comporte à son tour deux parties qui ont en commun la notion de la « réactivation de l'HHV-6 » :

- a- Etude de la validation d'une technique de qPCR a été effectuée sur la salive dans la détection et le suivi d'une réactivation des herpèsvirus (HHV-6, EBV, CMV, HHV-7) chez des patients atteints de DRESS. La qPCR effectuée sur la salive pourrait-elle remplacer celle réalisée sur le sang ? (article I, publié).
- b- Déterminer si quatre molécules connues pour être incriminées dans le DRESS (acide valproïque, sulfazalazine, phénytoïne et amoxicilline) pourraient entraîner la réactivation de l'HHV-6 sous sa forme intégrée. Ceci a été étudié par la recherche de l'expression de deux transcrits viraux, U86 (très précoce) et U22 (précoce), ainsi que la protéine virale précoce p41 (article II, soumis à Journal of Clinical Virology).

2- Détection du CIHHV-6 et étude des éventuelles conséquences de l'intégration d'HHV-6 sur le génome de patients portant un CIHHV-6. Plusieurs aspects ont été étudiés :

- a- Est-ce que le CIHHV-6 pourrait engendrer un dysfonctionnement des télomères et des aberrations au niveau du chromosome entier ?
Des éventuelles instabilités télomériques (doublet, délétion ou perte ou de télomères, étude de la région subtélomérique) et chromosomique (délétion, dicentrique...) ont été recherchées.
- b- Télomérase Vs ALT :
Etude des mécanismes de maintenance des télomères dans des lignées cellulaires établies à partir des patients porteurs du CIHHV-6. Etude de la radiosensibilité dans deux de ces lignées (la détection des transcrits de protéines impliquées dans la réparation de l'ADN).

Travail expérimental

Introduction aux articles I et II

Le syndrome de DRESS est une réaction d'hypersensibilité aux médicaments. Un des principaux critères du diagnostic du DRESS, est son évolution prolongée de plus de 2 semaines après l'arrêt du médicament. C'est parce les manifestations viscérales sont liées à une réponse immunitaire systémique contre la réactivation séquentielle de certains herpèsvirus (HHV-6, HHV-7, EBV et CMV) induites par le médicament en cause.

Il a été le plus souvent rapporté une association entre l'infection active d'HHV-6 (primo-infection ou réactivation) et le syndrome du DRESS. Cette association semble plus spécifique du DRESS qu'elle ne l'est pour d'autres syndromes d'hypersensibilité médicamenteuse. La détection de l'infection active d'HHV-6 a été considérée par un groupe japonais (Shiohara *et al.*, 2007) comme un critère essentiel du diagnostic du DRESS (Tableau VI).

J-SCAR
Éruption maculo-papuleuse développement >3 semaines après l'incrimination de médicament
Symptômes cliniques prolongés après l'arrêt du médicament en cause
Fièvre $\geq 38^{\circ}\text{C}$ Anomalie hépatique (ALT ≥ 100 U/L) ou autres atteintes viscérales
Anomalies leucocytaires (≥ 1)
Leucocytose ($> 11000 \times 10^6/\text{L}$)
Lymphocytes atypiques $> 5\%$
Éosinophiles $\geq 1,5 \times 10^9/\text{L}$
Lymphadénopathie
Réactivation de l'HHV-6

Tableau VI : Critères du diagnostic d'un DRESS.

(Shiohara *et al.*, 2007).

Aujourd'hui, la mise en évidence de la réactivation des HHV se fait par la détection de copies d'ADN viral dans le sang total par des techniques de PCR quantitatives.

La réactivation des HHV peut survenir au niveau de différents organes humains. Il est connu que ces HHV persistent lors de l'infection latente au niveau de l'oropharynx (Kidd *et al.*, 1996; Yoshikawa *et al.*, 2005). Les premières manifestations du DRESS, comme la pharyngite, la lymphadénopathie cervicale et l'œdème facial peuvent probablement montrer que l'oropharynx serait le premier site de réactivation des HHV lors du DRESS. D'où l'intérêt de regarder si des HHV sont excrétés dans la salive. Le suivi de la réactivation virale dans la salive sera plus facile, rapide et moins drastique qu'un suivi dans le sang, il y aura pas besoin de prélever les patients surtout dans les cas où ils ne présentent pas des fortes signes pathologiques.

Réactivation virale et molécules incriminées dans le DRESS

Au sein de notre laboratoire, il a été montré que le traitement de la culture HST/MT4 avec des molécules incriminées dans le DRESS, l'acide valproïque, la carbamazépine (Mardivirin *et al.*, 2009) et l'amoxicilline (Mardivirin *et al.*, 2010), conduit à une augmentation significative de la réplication virale. Alors que le traitement de la culture HST/MT4 avec de la sulfasalazine ou de la phénytoïne n'a pas eu d'effet notable sur la réplication de l'HHV-6.

En 2006, Oskay et ses collaborateurs (Oskay *et al.*, 2006) ont décrit des réactivations de l'HHV-6 et de l'HHV-7 mais pas des autres herpèsvirus humains, ceci chez des patients traités par des anticonvulsivants : carbamazépine (12 patients), phénytoïne (6 patients), phénobarbital (4 patients) et gabapentine (1).

D'autres molécules sont capables de faire réactiver des herpèsvirus, le 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA) et le butyrate de sodium (un inhibiteur des histone déacétylases) (Luka *et al.*, 1979).

Il est suggéré que l'HHV-6 puisse infecter d'une manière latente les monocytes aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Kondo *et al.*, 1991). Le traitement de ces monocytes *in vitro* avec du TPA peut conduire à la réactivation de l'HHV-6 (Kondo *et al.*, 1991).

En 2001, Gao et ses collaborateurs ont montré que le TPA induit la réactivation de l'EBV dans les cellules de la lignée épithéliale gastrique « GT38 » *via* NF- κ B et le facteur de transcription AP-1 (Gao *et al.*, 2001).

L'HHV-6 peut se trouver intégré dans les chromosomes humains (CIHHV-6) au niveau des télomères. Ce stade a toujours été considéré comme une dernière étape de latence où la production de virions infectieux est absente.

A ce jour, il n'est pas clair si le CIHHV-6 réactive *in vivo* ou non. Lors du 8ème congrès des HHV-6 & 7 qui a eu lieu en 2013 à Paris, Endo Akifuni, dans sa présentation orale (Chromosomally integrated human herpesvirus-6 was activated in a patient with X-linked severe combined immunodeficiency) a rapporté un cas où il a conclu à une réactivation *in vivo* d'HHV-6 intégré dans une condition d'immunodéficience (transplantation). Les séquençages des ADNc d'HHV-6 provenant des cellules du patient, de son père (ayant le CIHHV-6) et des cellules de cordon qui ont été co-cultivées avec les cellules de sang périphérique du patient, montrent que le HHV-6 est identique et que c'est du HHV-6A.

En 2010, Arbuckle et ses collaborateurs (Arbuckle *et al.*, 2010) ont réussi à montrer *in vitro* une réactivation de CHHHV-6A après avoir traité des lignées HEK-293 portant le virus intégré et 3 cultures de cellules T provenant des patients ayant le CIHHV-6, avec la TSA (histone deacetylase inhibitor trichostatin A) ou le TPA.

Par ailleurs, il a été montré plusieurs fois que des patients ayant le CIHHV-6 peuvent avoir aussi une persistance d'une infection avec un HHV-6 exogène. Pantry et ses collaborateurs (Pantry *et al.*, 2013) ont publié le cas de 4 patients présentant des symptômes neurologiques (maux de tête, vision floue, troubles de mémoire ...) et ayant un CIHHV-6. Par des RT-PCR suivies de séquençage réalisé sur l'ADNc du gène *U100* (codant pour une glycoprotéine tardive) les auteurs ont conclu à la présence d'un HHV-6 répliatif et que la séquence de U100 ne provenait pas du CIHHV-6 mais d'un HHV-6 exogène. Ainsi les symptômes neurologiques ont été corrélés avec la baisse du taux de transcrits d'*U100* après une longue période de traitement de l'infection à HHV-6 par des antiviraux valganciclovir ou foscarnet.

Dans notre deuxième article, nous avons posé la question suivante : l'HHV-6 sous sa forme intégrée est-il capable de se réactiver après le traitement avec des molécules incriminées dans le DRESS ?

Pour cela, nous avons réalisé une lignée lymphocytaire B à partir des cellules d'un patient ayant le CIHHV-6. Cette lignée que nous avons nommée GAN a été traitée par des molécules incriminées dans le DRESS, la sulfasalazine, la phénytoïne, l'acide valproïque ou

l'amoxicilline. Deux autres molécules, le TPA et le butyrate de sodium, ont servi de témoins, parce qu'elles sont connues pour leur capacité à induire la réactivation des herpèsvirus latents. La détection d'une réactivation virale a été effectuée par une technique de reverse transcription des transcrit U22 (précoces) et U86 (très précoces) suivie d'une PCR quantitative en temps réel TaqMan.

La patiente GAN était atteinte d'un lymphome à grandes cellules B associé à l'EBV. Il a été traité par de l'acide valproïque dans le but de faire réactiver l'EBV puis avec un anti-viral, le valganciclovir.

Article I : Saliva polymerase chain reaction assay for detection and follow-up of herpesvirus reactivation in patients with drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS).

Descamps V, Avenel-Audran M, Valeyrie-Allanore L, Bensaid B, Barbaud A, Al Jawhari M, Ranger-Rogez S; French Study Group of Cutaneous Drug Adverse Reactions.

JAMA Dermatol. 2013 May;149(5):565-9. doi: 10.1001/jamadermatol.2013.2018.

Article II: Lack of significant reactivation of chromosomally integrated HHV-6B in B lymphoblastoid cell line in presence of four drugs responsible for DRESS

Mustafa Al Jawhari^a, Vincent Descamps^b, Hazar Al Mouhammad^a, Arnaud Jaccard^c, Jeanne Cook-Moreau^a, Sylvie Ranger-Rogez^{a,d}

Article soumis dans "Journal of Clinical Virology"

Discussion des articles I et II

Article I

Notre étude est la première qui propose la recherche du virus réactivé et excrété dans la salive pour un suivi de DRESS. Nous supposons que la réactivation virale débute dans l'oropharynx et que le virus est excrété dans la salive.

Les résultats obtenus pour la charge virale de l'HHV-6 ont été très proches entre les prélèvements salivaires et sanguins.

La limite majeure de cette méthode a été le suivi de l'excrétion de l'EBV et de l'HHV-7. La charge virale de l'HHV-7 dans la salive a toujours été élevée dans le groupe contrôle qui était composé de 10 personnes immunocompétentes et 5 immunodéprimées. De la même manière, la charge virale de l'EBV a été toujours élevée chez les immunodéprimés.

L'interprétation de la qPCR sur la salive est alors dépendante du type d'HHV analysé. Il semble finalement que ce soit un bon outil pour la recherche des éventuelles réactivations virales chez les patients atteints du DRESS. Ainsi que pour avoir plus facilement l'accès aux HHV excrété dans la salive pour étudier le virus en lui-même (son type, comportement, son rythme de réactivation, sensibilité aux traitements...).

Pour confirmer que ce teste peut remplacer définitivement celui fait sur le sang, il faut avoir un plus grand nombre des échantillons salivaire et les comparer aux résultats obtenues sur le sang.

Article II

Les ARN messagers sont en général vite dégradés après qu'ils sont transcrits. Pour cela nous avons choisi deux transcrits avec deux stades d'expressions différentes, l'un est très précoce (U22), l'autre est précoce (U86).

Une détection aléatoire de transcrits dans les différentes cultures de GAN a été observé ; cela semble d'être indépendante du traitement. En effet, en absence de tout traitement, des transcrits viraux ont été détectés. A noté que dans certains cas, seulement un des deux transcrits recherché a été détecté, ceci est toujours en absence de l'expression de la protéine précoce p41.

Il se peut que les valeurs de réactivation que nous avons obtenues correspondent à une réactivation de l'HHV-6 sur le niveau transcriptionnel sans production de virions. C'est ce

qu'ont rapporté Yoshikawa et ses collaborateurs (Yoshikawa *et al.*, 2002) après avoir traité avec du TPA une lignée cellulaire neuronale U251 infectée par de l'HHV-6 latent. Ils ont détecté par RT-PCR, des transcrits des gènes tardifs *U31* et *U39* mais ils ont rapporté l'absence de la production de virus infectieux par des co-cultures, ainsi que l'absence d'antigènes viraux (protéines très précoces, IEA/ex3 et protéines tardives OHV-3). Les auteurs ont conclu qu'une réactivation au niveau transcriptionnel est induite par le traitement de la lignée U251 avec du TPA sans formation de particules virales infectieuses. En même temps, une augmentation de la production de deux cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL1 β) a été observée lors de l'induction des transcrits viraux (Yoshikawa *et al.*, 2002).

Lors du DRESS, la période entre la prise médicamenteuse et l'apparition des manifestations cliniques est longue. Il est probable que les 3 jours de traitement n'ont pas été suffisants pour que le CIHHV-6 puisse se réactiver.

Arbuckle et ses collaborateurs sont les seuls qui ont réussi à faire réactiver *in vitro* du CIHHV-6A (Arbuckle *et al.*, 2010) et CIHHV-6B (Arbuckle *et al.*, 2013). Dans leurs études, les auteurs ont montré par séquençage que le virus réactivé était le même que celui qui était intégré.

A ce jour, la réactivation du CIHHV-6 *in vivo* n'est pas claire. Troy et ses collaborateurs (Troy *et al.*, 2008) ont rapporté le cas d'un patient immunocompétents ayant le CIHHV-6 et qui a été atteint des encéphalites sévère. L'HHV-6 qui a été détecté dans son LCR a diminué après un traitement avec le foscarnet et le ganciclovir corrélé à une amélioration nette des signes cliniques. Les auteurs suggèrent une possible réactivation de CIHHV-6. Mais ils n'ont pas vérifié si l'HHV-6 qui est en cause de la maladie est originaire du CIHHV-6 qui a réactivé ou bien d'une infection par un autre HHV-6 exogène.

Kobayashi et ses collaborateurs ont étudié le cas d'un patient diagnostiqué pour avoir de CIHHV-6 avant qu'il subisse une transplantation de sang de cordon (Kobayashi *et al.*, 2011). Ils ont suivi, par des PCR quantitatives, la charge virale d'HHV-6 pour plusieurs mois avant et après la transplantation. Ils remarquent une baisse d'HHV-6 après la transplantation surement dû au remplacement des cellules du patients par des autres de donneurs (chimérisme 100%, confirmé par FISH). Mais la charge en HHV-6 à monter de nouveau. Alors ils suggèrent qu'il a probablement eu une réactivation de CIHHV-6 présent dans des cellules somatiques.

Les mécanismes exactes de l'intégration d'HHV-6 au niveau des télomères ne sont pas encore connues. Selon les modèles proposés par Morissette et ses collaborateurs (Morissette et Flamand, 2010), il se peut que l'intégration de l'HHV-6 ait provoqué plus ou moins des dommages aux extrémités du génome viral, ce qui rend la réactivation impossible. Cela peut être dépendant de la forme du génome viral sous laquelle il est intégré (linéaire, épisomal ou concatémérique). Il est possible que ces dommages ne soient pas majeurs, ce qui permet la transcription de certains gènes viraux mais non pas la formation d'un virion.

La patiente GAN a été mis sous traitement avec de l'acide valproïque dans le but de faire réactiver son EBV et le valganciclovir. Nous avons travaillé sur 3 prélèvements, un avant le traitement et 2 après. Il est possible que le valganciclovir a réussi de stopper la multiplication d'HHV-6 pourtant ça n'a pas été le cas pour l'EBV.

Travaux d'Article III

I. Introduction

L'intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte est une étape essentielle à la réplication de certains virus, dont les rétrovirus ainsi que l'AAV-2. En revanche, les herpesvirus maintiennent leur génome sous forme extrachromosomique dans les noyaux des cellules infectées et ils peuvent se répliquer sans avoir besoin d'intégrer le génome de l'hôte. Cependant, plusieurs cas ont été rapportés d'herpesvirus intégrés, comme par exemple le cas du MDV, de l'HHV-6 et exceptionnellement de l'EBV.

La prévalence du CIHHV-6 (chromosomally integrated HHV-6) est estimée dans le monde à environ 1 à 2%. Les deux types d'HHV-6 (A et B) sont capables de s'intégrer dans le génome de la cellule hôte au niveau des télomères. Aucune pathologie n'a été encore associée à cette forme de virus intégré. En septembre 2013 Huang et ses collaborateurs ont rapporté que le télomère portant le CIHHV-6 est sujet à des troncutures qui résultent en la formation d'un court-télomère.

Les télomères sont les structures terminales des chromosomes. Ils se différencient du reste de la chromatine par leur séquence nucléotidique, TTAGGG, et les protéines qui y sont associées. Ces séquences sont hautement répétées, non codantes et très conservées. Il a été prouvé que la taille des télomères diminue au fur et à mesure des divisions cellulaires (Bodnar *et al.*, 1998). En effet, à chaque division cellulaire, l'ADN polymérase ne parvient pas à reproduire complètement les séquences télomériques, ce qui entraîne l'érosion cumulée des télomères (Chan et Blackburn, 2004). Les répétitions télomériques raccourcissent de 30-200 pb après chaque cycle de division mitotique. Cette particularité leur donne le rôle d'horloge biologique et permet de donner un « âge » à la cellule par une quantification de leur taille (Hande *et al.*, 1999). Cet âge ne se mesure pas en unité chronologique mais en nombre de divisions effectuées par la cellule (Harley, 1997). De plus, cette diminution est impliquée dans le processus de sénescence cellulaire (Lansdorp, 1995). Lorsque la taille des télomères atteint

un seuil critique, la stabilité du génome est menacée. Il existe plusieurs moyens d'inverser la perte télomérique. Le plus connu est l'activation de la télomérase, une enzyme de type transcriptase inverse permettant de rallonger les télomères (Greider et Blackburn, 1985).

Les télomères ont un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité structurale des chromosomes en empêchant la fusion des extrémités chromosomiques, la fusion bout-à-bout des chromosomes et les recombinaisons atypiques (Lundblad et Szostak, 1989). Le télomère se replie à son extrémité (au bout du chromosome) pour former une grande boucle appelée « boucle T » et une autre petite à l'intérieur de la boucle T appelée « boucle D ».

L'instabilité génomique due à un raccourcissement des télomères a été liée à des maladies associées au vieillissement, en particulier le cancer (Wu *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2009; Hurwitz *et al.*, 2013; Walcott *et al.*, 2013).

Les télomères courts déclenchent la mort cellulaire pouvant contribuer à la réduction de la progression tumorale (Greenberg *et al.*, 1999). Cependant les télomères courts conduisent également à une augmentation de la formation de tumeurs. Cette augmentation est susceptible d'être le résultat d'une instabilité génomique initiée par de courts télomères dysfonctionnels (Chin *et al.*, 1999; Hackett *et al.*, 2001; O'Hagan *et al.*, 2002; Boardman *et al.*, 2013).

La télomérase, utilise une molécule d'ARN intrinsèque (hTR) contenant la région complémentaire AACCCAAC et la composante de la transcriptase inverse (hTERT), pour synthétiser le nouvel ADN télomérique aux extrémités des chromosomes (Feng *et al.*, 1995; Lingner *et al.*, 1997). Par conséquent, la télomérase compense l'érosion des télomères au cours de la prolifération cellulaire et conserve l'identité des séquences télomériques. Il existe également d'autres protéines pouvant interagir avec les télomères comme par exemple le complexe de Shelterin. Il est composé de 6 protéines coiffant le télomère : TRF1, TRF2, POT1, TIN2, TPP1 (TIN2-interacting protein 1) et RAP1 (Repressor/Activator Protein 1) qui recouvrent le télomère et contribuent au maintien de la structure et des fonctions des télomères.

La télomérase est activée dans la grande majorité des tumeurs (environ 85%), mais dans une plus faible proportion de tumeurs, le raccourcissement des télomères est empêché selon un autre mode d'allongement alternatif des télomères (ALT) (Bryan *et al.*, 1997), qui s'accompagne d'une extension du télomère *via* des recombinaisons homologues entre les ADN télomériques (Dunham *et al.*, 2000). Les cellules utilisant le mode ALT sont caractérisées par une association des corps PML (promyelocytic leukemia) au niveau de la séquence d'ADN télomérique pour former l'«APB» (ALT-associated PML bodies, corps PML associés à ALT).

Le rôle exact de ces corps n'est pas encore bien élucidé, mais ils semblent être importants pour le recrutement des protéines de modification transcriptionnelle comme par exemple la Nse2 (non-Smc element-2), une sous-unité du complexe Smc5/6 responsable de la sumoylation des composantes du complexe de Shelterin, ce qui est indispensable pour le maintien de l'APB et favorise le déroulement des recombinaisons homologues.

Le dysfonctionnement des télomères résultant d'un raccourcissement progressif dû à la tumeur ou à l'absence de la télomérase, peut déclencher une réponse aux dommages de l'ADN au niveau de ces télomères.

Les molécules d'ADN peuvent être endommagées de différentes manières : dommages spontanés dus à des erreurs de réplication, la désamination, la dépurination ou suite à des expositions à des facteurs génotoxiques, tels que les rayonnements ionisants et les produits chimiques. Dans notre environnement, il existe diverses sources d'irradiation (radiation cosmique, imagerie médicale, radiation tellurique...). Les radiations ionisantes ont la particularité de produire des ionisations de la matière qu'elles traversent. Ces ionisations peuvent provoquer une désorganisation des macromolécules telles que l'ADN. Elles ont pour conséquences des altérations des bases et des cassures simple-brin (CSB) ou double-brin (CDB) par des ruptures des liaisons phosphodiester. Les effets de ces lésions peuvent aller de l'arrêt du cycle cellulaire pendant lequel la cellule tente de réparer les dommages, à la mort cellulaire lorsque les lésions sont trop importantes. Les effets à long terme résultent en des mutations non réparées provoquant la survenue de tumeurs.

Les dommages les plus sévères de l'ADN sont les cassures double-brin (CDB). Elles ont des conséquences dramatiques pour la cellule en menaçant la stabilité génomique car elles induisent la perte de régions chromosomiques entières. Ces atteintes d'ADN sont les plus difficiles à réparer de façon fidèle puisque les deux brins sont touchés. Une réparation fautive d'une CDB donne lieu à la formation d'un remaniement appelé aberration chromosomique. Ces aberrations sont classées en différentes catégories : les aberrations de nombre (où un chromosome entier est manquant) et les aberrations de structure. Pour les aberrations chromosomiques de structure, nous distinguons les aberrations instables (environ 50% se perdent à chaque cycle) et les aberrations stables. Cette distinction se fait en fonction de la capacité des chromosomes à perdurer au cours des divisions cellulaires. En effet, seuls ceux ayant une structure conforme peuvent ségréger correctement lors de la mitose. De ce fait, les aberrations instables sont :

- Les dicentriques : ce sont des chromosomes possédant deux centromères. C'est une configuration chromosomique très rare dans la population générale (Lloyd *et al.*, 1980). En général, les dicentriques sont des marqueurs d'irradiation. Le dénombrement des dicentriques est la technique de référence pour la dosimétrie biologique cytogénétique (Agence internationale de l'énergie atomique, AIEA rapport annuel de 2011) après une exposition accidentelle aux rayonnements ionisants.
- Les anneaux : il s'agit d'une délétion aux deux extrémités (délétion terminale au niveau du brin p et q) du chromosome et fusion de ces deux extrémités, ce qui aboutit à une structure annulaire.
- Les acentriques : il s'agit d'une cassure du chromosome à l'extrémité du brin p ou q, ou au milieu du chromosome. Ils ne possèdent donc pas de centromère et pas forcément de télomères. Nous distinguons trois types des acentriques : les acentriques avec 2 télomères dits acentriques terminaux, les acentriques avec 4 télomères issus d'une fusion de deux acentriques terminaux et les acentriques interstitiels n'ayant aucun marquage telomérique.

Les aberrations stables comportent :

- Les translocations réciproques : des fragments de deux chromosomes différents sont échangés.
- Les translocations robertsoniennes : un chromosome entier est attaché à un centromère d'un autre chromosome. Chez l'homme, ces translocations ne se produisent qu'entre les chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22.
- Les inversions : une partie du chromosome est détachée, tournée et remise en place, donc le matériel génétique est inversé.
- Les insertions : une partie d'un chromosome est supprimée de sa place normale et insérée dans un autre chromosome.
- Les délétions : une partie du chromosome est manquante. Il y a des maladies connues chez l'homme dues à ce type d'aberrations. Par exemple, le syndrome de Wolf-Hirschhorn, est causé par la délétion d'une partie du bras court du

chromosome 4. Le syndrome de Jacobsen est également appelé maladie de la délétion 11q terminale.

- Les duplications : une partie du chromosome est dupliquée, résultant en un matériel génétique supplémentaire. Par exemple, la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 1A peut être causée par la duplication du gène codant la protéine de la myéline périphérique 22 (PMP22) sur le chromosome 17.

Lorsqu'une CDB est survenue, une signalisation à ce dommage sera déclenchée (Figure 26) : des protéines senseurs (γ H2AX, MRE11, Rad50, Nbs1) sensibles à ce signal vont activer d'autres protéines transductrices (ATM, ATR, DNA-PKcs) qui à leur tour activent par phosphorylation des protéines effectrices (P53, RAD50...), ce qui déclenche des cascades de phosphorylation des protéines contribuant à la réparation, à l'arrêt du cycle cellulaire ou bien à la mort cellulaire programmée (apoptose).

H2AX est une protéine de signalisation efficace des CDB. C'est une variante de l'histone H2A présente à 10% dans l'ADN. Une cassure au niveau de la chromatine induit rapidement une phosphorylation de la sérine 139 de l'histone H2AX pour générer le gamma-H2AX (γ -H2AX), ce qui signale les cassures double-brin de l'ADN et permet d'entamer le processus de réparation (Kinner *et al.*, 2008)). Dans la majorité des cas où le γ -H2AX intervient, c'est au niveau des télomères. Cette phosphorylation est réalisée par les kinases appartenant à la famille des PIKK (phosphatidylinositol-3-OH-kinase-like) : ATR, DNA-PKc et surtout ATM. Cette phosphorylation qui se passe d'une manière amplifiée conduit à la formation de ce qu'on appelle un foyer de γ -H2AX. Les CDB sont quantifiables par la détection de ces foyers *via* des techniques de marquage d'immunofluorescence

Au niveau des CDB, il a été également observé une accumulation d'une protéine suppresseur de tumeur, la 53BP1. Elle est recrutée en quelques secondes après la cassure (Celeste *et al.*, 2003). La phosphorylation de l'histone H2AX est nécessaire pour la phosphorylation de 53BP1 par ATM. A son tour, la phosphorylation de 53BP1 est importante pour l'activité d'ATM sur plusieurs de ses cibles en aval, y compris p53 (Anderson *et al.*, 2001; Panier et Boulton, 2013).

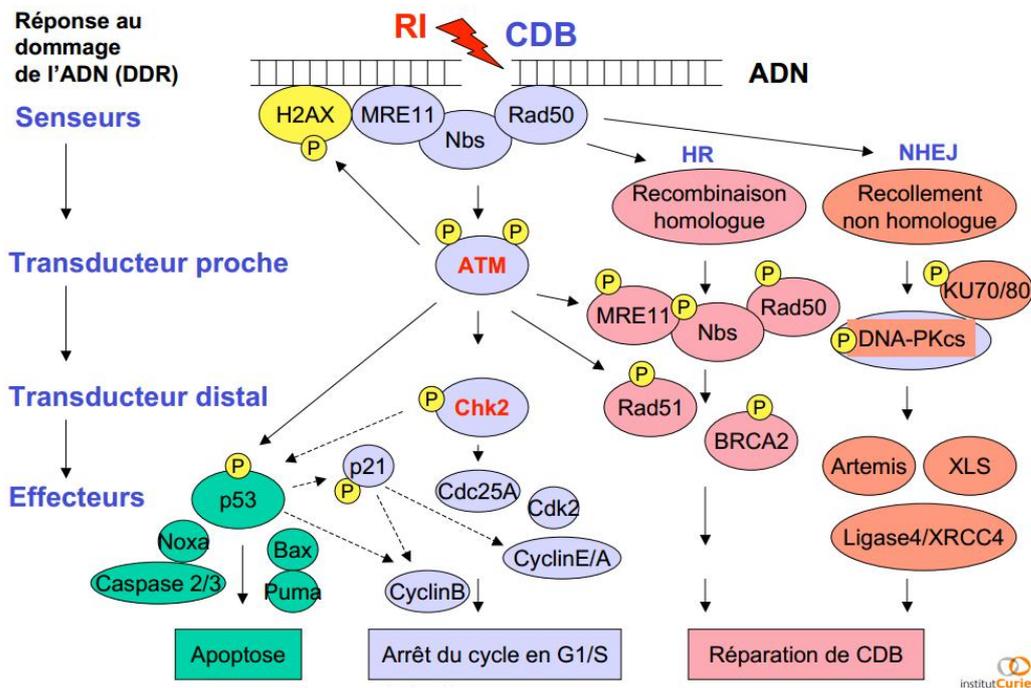


Figure 26 : Schéma représentatif d'une réponse aux dommages de l'ADN.

Suite à une cassure double brin de l'ADN, causée par une source irradiante par exemple, des protéines senseurs sont recrutées au site du dommage pour induire l'ATM qui à son tour phosphoryle une large gamme de protéines qui aident à la signalisation aux dommages de l'ADN (comme la γ H2AX) ainsi que d'autres protéines jouant un rôle dans la réparation des cassures double brin ou bien l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose. Source du schéma : cours de Dietrich AVERBECK, 2013, d'après (Raleigh et Haas-Kogan, 2013)

La p53, est définie comme étant suppresseur de tumeur ; elle joue un rôle-clé dans la cellule, notamment dans l'arrêt du cycle cellulaire et dans l'apoptose.

Lorsque la p53 est activée, elle peut à son tour conduire à l'activation de plusieurs protéines (cycline G1, cycline B, p21, sestrin1, ZMAT3, PUMA, etc...) ayant chacune différentes fonctions dans la cellule, comme par exemple dans la réparation de l'ADN ou dans la prévention de dommages, l'arrêt du cycle, l'apoptose, la sénescence et dans l'inhibition des métastases...

Il a été montré que la surexpression de la cycline G1 cause un arrêt de la croissance cellulaire en phase G1. Cette activité d'arrêt du cycle cellulaire est dépendante des voies des protéines suppresseurs de tumeurs, ARF-P53 et pRB (Zhao *et al.*, 2003).

Une inhibition de l'expression de la protéine PUMA diminue l'apoptose. PUMA est susceptible de jouer un rôle dans la médiation de la mort cellulaire induite par p53 *via* une voie dépendant du cytochrome c/Apaf-1 (Nakano et Vousden, 2001).

La protéine sestrin1 est induite par la p53. Elle joue un rôle dans la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN. Cette protéine va conduire à l'inhibition de la croissance cellulaire par l'activation de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK), ce qui conduit à l'inhibition de la mTOR (mammalian target of rapamycin ou cible de la rapamycine chez les mammifères) et à l'arrêt du cycle cellulaire (Budanov et Karin, 2008).

Le gène ZMAT3 (zinc finger, matrin-type 3) code une protéine contenant trois domaines à doigt de zinc et un signal de localisation nucléaire. L'ARNm et la protéine de ce gène sont régulés à la hausse par p53. La surexpression de ZMAT3 inhibe la croissance des cellules tumorales, ce qui suggère que ce gène puisse avoir un rôle dans la voie de régulation et de la croissance dépendante de p53 (Mendez Vidal *et al.*, 2006; Vilborg *et al.*, 2012).

Il a été observé une double fonction de p21 ; elle dépend probablement de l'étendue des dommages. Dans le cas des lésions de l'ADN de bas niveau, l'expression de p21 est augmentée, ce qui induit un arrêt du cycle cellulaire, et protège de l'apoptose. Cependant, après des dommages intenses à l'ADN, l'expression de p21 est diminuée et la cellule meurt par apoptose (Cmielova et Rezacova, 2011).

Dans cette partie nous allons étudier d'éventuelles conséquences de l'intégration de l'HHV-6 sur l'instabilité télomérique et chromosomiques dans les lymphocytes circulants des patients ayant l'HHV-6 intégré dans leur génome. Nous avons aussi étudié la radiosensibilité des lignées lymphoblastiques établies à partir des lymphocytes circulants de ces patients ainsi que l'expression des protéines impliquées dans la réparation des CDB.

II. Matériels

Nous avons initialement travaillé sur 249 échantillons de sang total appartenant à 249 patients provenant du département d'hématologie du centre hospitalier et universitaire (CHU) de Limoges. Ces patients présentaient différentes pathologies comme il est montré dans le tableau (Tableau VII) 1. Leur médiane d'âge était de 60 ans (3-89 ans ; 16 patients < 16 ans), le sexe *ratio* était de 1,24.

Nous avons aussi travaillé sur 165 échantillons de sang total appartenant à des patients provenant du département de néphrologie du CHU de Limoges : leur médiane d'âge était égale à 58 ans (20-83 ans), le sexe *ratio* était de 1,21. Ces patients étaient transplantés ou en attente de transplantation rénale.

Pathologies		Nombre des patients
Néoplasmes myéloïdes		56
Néoplasmes lymphoïdes (159)	Néoplasmes de cellules B	115
	Néoplasmes de cellules T et NK	40
	Lymphoïdes associés à l'immunodéficience	4
Anémies		6
Autres		28
Total		249

Tableau VII : Répartition des 249 patients d'hématologie en fonction de leurs pathologies.

III. Méthodes

III.1. PCR quantitative

L'extraction des ADN sanguins des patients a été réalisée à l'aide de l'automate EasyMag (BioMérieux, Lyon, France) en suivant les recommandations du fabricant.

La PCR quantitative a été réalisée en utilisant le kit «Light Cycler Fast Start DNA Master hybprobe» (Roche, Meylan, France). L'amplification a été réalisée sur le gène *U22* spécifique d'HHV-6, à l'aide de l'amorce sens 397F (5'-TCGAAATAAGCATTAAATAGGCACACT-3'), de l'amorce anti-sens 493R (5'-CGGAGTTAAGGCATTGGTTGA-3') et de la sonde TaqMan 435T (5'-FAM-CCAAGCAGTTCGGTTTCTCTGAGCCA-TAMRA-3'). Le mix de la réaction était composé de MgCl₂ 4 mM, de 0,4 μM de chaque amorce, de 0,2 μM de sonde, de 2 μL de mix Fast Start et 5 μL d'ADN extrait du sang total de chaque patient ou de 5 μL (100 ng) de chaque point de gamme (10¹ à 10⁶) dans un volume final de 20μL. Le thermocycleur qui a été utilisé pour l'amplification est le «Rotor-Gene 6000 » (Corbett Life Science, Mortlake, Australie). Le programme était le suivant : dénaturation initiale de 10 min à 95°C suivie de 50 cycles de 10s de dénaturation à 95°C, 60s à 60°C pour l'hybridation des amorces et de la sonde, avec une acquisition de la fluorescence dans le vert.

III.2. Typage du virus HHV-6

Le typage du virus a été réalisé par une technique de « nested PCR » sur le gène *U31*. Le fragment amplifié contient un site de restriction HindIII présent chez l'HHV-6B mais absent chez le type A.

Une première PCR « externe » a été réalisée en utilisant les amorces H6/594 (5'-TTAACGGTCGCGTTCTAACC-3') et H6/1809 (5'-ACGCCTCGTTGAATACTTCG-3'). Le mix réactionnel contenait, 0,5mM de MgCl₂, 0,4 μM de chaque amorce, 1X de tampon d'enzyme (Qiagen, Courtaboeuf, France), 200 μM de chaque dNTP, 1U de Taq polymérase (Qiagen) et 500 ng d'ADN. Le programme de thermocycleur (Applied Biosystems, 2720 Thermal Cycler, Saint Aubin, France) était le suivant : dénaturation initiale à 94°C pendant 6 min puis 40 cycles comprenant 30s de dénaturation à 94°C, 30s d'hybridation des amorces à 53°C, 45s d'élongation à 72° C, et 10 min d'élongation finale à 72°C.

Une deuxième PCR « interne » a été réalisée sur 1µL du produit de la première amplification en utilisant les amorces H6/772 (5'-AAGAAGGCTATCACTTAGACACGG-3') et H6/1263 (5'-TTAGGATAAGAAGCTCGGCG-3'). Les conditions réactionnelles et le profil d'amplification étaient les mêmes que ceux de la PCR externe.

Un volume de 10µl du produit de la PCR interne a été mis en présence de 20 unités de l'enzyme de restriction, HindIII (New England Biolabs, Evry, France), pendant 1 heure à 37°C en présence du 1X NEBuffer 2.1 (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 µg/ml BSA, pH 7.9) puis l'ensemble a été soumis à une migration électrophorétique en gel d'agarose. Le profil de migration attendu est de deux bandes pour l'HHV-6B (370 et 122 pb respectivement), alors que le type A du virus ne présente qu'une seule bande de 492pb, due à l'absence de site de restriction pour HindIII.

III.3. Obtention des lignées cellulaires

Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) de 4 patients ayant de l'HHV-6 intégré dans leur génome et ayant donné leur consentement, ont été séparées du sang par centrifugation 40 min. à 1200 tours/min. à 20°C sur Ficoll (Eurobio, Courtaboeuf, France). Elles ont ensuite été mises en culture avec 2-3 mL de surnageant d'une culture de cellules B95.8 (EBV-producing marmoset B-cell line) filtré sur un filtre de 0,22µm en RPMI 1640 – glutamax, contenant 25 mM d'HEPES, 10% de sérum de veau fœtal (Gibco, Paisley, Royaume-Uni). La lignée lymphoblastoïde B a été obtenue après 3-5 semaines de culture sous 5% de CO₂.

III.4. Obtention de métaphases

Les métaphases ont été obtenues pour certains patients à partir de la lignée B établie à partir de lymphocytes sanguins, pour d'autres à partir de cellules mononucléées sanguines (PBMC), ou à partir des deux.

III.4.1. A partir de PBMC

- a. Culture et accumulation métaphasique :

Il a été ajouté 0.5 mL de sang périphérique à 5mL de milieu de culture contenant du RPMI 1640, 20% de sérum de veau foetal et 1% de phytohémagglutinine (PHA) (Invitrogen, Saint Aubin, France), qui est une lectine à fort pouvoir mitogène, afin de stimuler la prolifération des lymphocytes T. La culture est ensuite incubée à 37°C pour 72h puis bloquée en métaphase par l'ajout de colchicine (Invitrogen, France) (un alcaloïde tricyclique qui bloque les cellules en métaphase) à une concentration finale de 0.1µg/mL, et ce pendant 1h à 37°C et sous 5% de CO₂. Suite à cette dernière incubation, on obtient une accumulation de cellules en métaphase.

b. Traitement hypotonique et synchronisation des cellules en métaphase :

Les cellules sont ensuite soumises à un choc hypotonique. Pour cela, après le traitement par la colchicine, les cellules sont centrifugées pendant 7 min à 14000 tours/min. puis le culot, contenant les chromosomes en métaphase, est suspendu (tout en vortexant) dans une solution hypotonique de KCL 0,075M préchauffée à 37°C. Les cellules sont ensuite incubées pendant 20 min à 37°C. Les membranes cellulaires sont alors lysées et les cellules sont gonflées ce qui permet l'étalement des chromosomes dans les cellules. Ceci sert à optimiser la visualisation de chaque chromosome et à minimiser leurs chevauchements

c. Pré-fixation, fixation des cellules

La préfixation est réalisée en ajoutant quelques gouttes de fixateur Carnoy 2 (éthanol/acide acétique 3:1 v/v) et en homogénéisant par retournements. Après une centrifugation de 7 min. à 1400 tours/min., le culot est remis en suspension avec le fixateur tout en vortexant, puis centrifugé pendant 7 min à 1400 tours/min. Cette étape est répétée jusqu'à ce que les cellules soient bien en suspension.

Ensuite, pour la fixation, le culot cellulaire est remis en suspension dans un petit volume de fixateur à 4°C pendant une nuit. La fixation des cellules cause la dénaturation et la précipitation des protéines et des acides nucléiques, ce qui permet le durcissement de la chromatine.

III.4.2. A partir de cultures de lignées cellulaires

La procédure est la même que celle utilisée pour l'obtention de métaphases à partir du sang, sauf qu'une lignée cellulaire est en division permanente, alors la culture est directement traitée par la colchicine sans avoir à stimuler la prolifération cellulaire par de la PHA.

III.4.3. Etalement des lames

L'étalement est réalisé sur des lames en verre, nettoyées à l'eau, froide et humide. Les lames sont donc lavées et plongées dans de l'eau distillée puis placées pour au moins 4h à 4°C. Pendant ce temps, une étape de fixation des cellules est refaite. Ensuite, environ 15µL de suspension cellulaire sont déposés sur l'extrémité d'une lame glacée sortie au dernier moment, et positionnée verticalement pour que l'étalement puisse prendre forme. Puis la lame est remise à sécher à plat et à température ambiante (TA). La densité en cellules, la qualité et la distribution des métaphases, sont contrôlées par un microscope à contraste de phase. Les lames sont laissées une nuit à TA et à l'abri de la poussière, avant de procéder au marquage, ou à la congélation à -20°C.

III.5. Synthèse de la sonde de l'HHV-6

Une sonde fluorescente de 40 kpb a été réalisée à partir du génome de la souche virale HST, puis marquée par incorporation de dUTP marqués par des fluorochromes qui fluorescent en vert ou en rouge, en utilisant la technique de « Nick Translation ».

a. PCR

Pour cela, 4 PCR ont été réalisées sur de l'ADN de la souche HST. Les 4 fragments amplifiés étaient de taille d'environ 10 kpb chacun. Les amorces qui ont été choisies, couvrent une partie de la séquence unique 2 jusqu'à une partie de la séquence unique 13 du génome viral (Tableau VIII). Les amplifications ont été réalisées par l'enzyme TaKaRa Ex Taq Polymerase (Chemicon, Millipore, Molsheim, France) dans un mix de 50 µL contenant, 30 pmoles de chaque amorce, 1x de tampon contenant 20mM de MgCl₂, 200µM de chaque dNTP, 1,25U d'enzyme et 500ng d'ADN. Le programme d'amplification était de 30 cycles de 98°C (10 sec), 68°C (1min30) et 72°C (1min).

L'amplification a été contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. Le produit de PCR a ensuite été purifié sur colonne à membrane de silice par le Kit « NucleoSpin Gel and PCR Clean-up » (Macherey-Nagel, Hoerd, France).

	Amorce	Position sur HST	
1-S	5'-GAGAAAGTTGATAGACGGCAGGT-3'	9580	U2-->U11
1-RS	5'-GATTCCCCAGTGTTGAGAAAAC-3'	20643	
2-S	5'-CGACATTAACCTTTCCTGAGGTT-3'	20481	U11-->U19
2-RS	5'-TGAGGGTAGGATGAGTATGTTTG-3'	31537	
3-S	5'-CGGGACTTCTGTGCAATAAAATT-3'	31313	U19-->U28
3-RS	5'-AGATTTTGGCTACAACAGAAAAT-3'	42360	
4-S	5'-AACACCAAGCATCTAACCTGAG-3'	42203	U28-->U31
4-RS	5'-CGAGCTAGAGTGACATCTTTTAT-3'	52268	

Tableau VIII : Amorces utilisées pour la synthèse de la sonde HHV-6.

b. Marquage

Un pool de 2µg d'ADN a été réalisé par mélange de 500 ng de produit de chacune des PCR. Cet ADN a ensuite été marqué par « nick translation ». Les 2µg d'ADN ont été ajoutés à un mix contenant 1x de tampon de nick translation, 100µM de dATP, dCTP et dGTP (33,33 µM de chacun), 50µM de dTTP, 1mM de spectrum orange ou vert dUTP marqué et 10 µL de l'enzyme de nick translation (Abbott Molecular, Des Plaines, USA). La réaction se fait pendant 8 heures à 15°C puis est arrêtée par chauffage pendant 10 min. à 70°C.

c. Précipitation

Le produit de nick translation, a ensuite été précipité par de l'éthanol à 100%, acétate de sodium 3M, en présence de 18,2µg d'ADN COT-1 de sperme de hareng (Roche) et laissé incubé 30 min. à l'abri de la lumière dans de la glace puis centrifugé 35min. à 25 000 g à 4°C. Le culot a été lavé à l'éthanol 70% et centrifugé à 5 000 g pendant 15 min. puis laissé sécher 30 min. à l'obscurité. Le culot a ensuite été repris dans 27,3µL d'H₂O et 63,7µL de tampon d'hybridation (Sigma, Lyon, France). Après une incubation de 15 min. à 37°C, une centrifugation à 15 000g pendant 15 min. a été effectuée, le surnageant a été récupéré et la sonde était prête pour l'utilisation et stocké à 4°C.III.6.

III.6. FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization)

III.6.1. Détection de l'ADN du CIHHV-6

Une lame étalée comme précédemment décrit a été déshydratée dans des bains successifs d'éthanol à 70, 80 et 100% à TA pendant 5 min. chacun. Puis elle a été laissée sécher avant de déposer 3 μ L de la sonde marquée. La lame a alors été portée à 75°C pendant 2min pour permettre à la sonde d'être dénaturée. La lame a ensuite été incubée à 37°C pendant une nuit en boîte d'hybridation en présence de formamide 50% - SSC 2X (NaCl 0,3 M, citrate de sodium 0,03 M), pH7. Le lendemain elle a été rincée en SSC 0,4X (pH7) à 72°C pendant 3min, puis 1 min en SSCT (saline-sodium citrate buffer Tween 20 à 0,05%) 2X (pH7) et 5 min en PBS 1X (Phosphate Buffer Saline : NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 1,76 mM). Ensuite les métaphases ont été contre-colorées par du DAPI-II (4',6'-diamidino-2-phénylindole) (Vysis, Abbott, Rungis, France) à une concentration de 125ng/mL pendant 3min. à TA. Enfin les lames ont été montées sous lamelles de verre avec un réactif anti-« fade », la Para-PhénylèneDiamine (PPD) (Sigma, France). Ce réactif permet d'éviter l'extinction rapide des fluorochromes lorsqu'ils sont soumis à une forte excitation.

La lecture des lames a été réalisée à l'aide d'un microscope à fluorescence (MetaSystems, Altlusheim, Allemagne), doté du système Metafer4. Ce système est capable de scanner automatiquement la lame et de générer par la suite une galerie de métaphases capturées.

III.6.2. Doubles marquages, virus/chromosome

Pour identifier le chromosome dans lequel le virus était intégré, un double marquage du virus et du centromère ou du télomère du chromosome suspecté a été effectué.

La procédure de marquage est la même que celle appliquée pour marquer le virus seul, mais avec un mélange de sondes (sonde de virus : sonde spécifique du centromère ou télomères du chromosome suspecté d'être intégré, Cytocell, Compiègne, France) dans un rapport de 1 :1.

III.6.3. Marquage des télomères et centromères

Le marquage de tous les télomères et centromères de tous les chromosomes a été effectué à l'aide des sondes PNA (Applied Biosystems, Californie, USA). La sonde PNA télomérique (CCCTAA)₃ marquée avec la Cyanine 3 (Cy3) de fluorescence rouge (Perceptive Biosystem) est complémentaire à la séquence répétitive télomérique (TTAGGG). La sonde centromérique PNA couplée à l'Isothiocyanate de Fluorescéine (FITC) de fluorescence verte, est spécifique à la séquence centromérique. Les cellules étalées sur lames sont décongelées la veille du marquage chromosomique.

Les lames sont rincées pendant 5 min avec du PBS 1x, puis fixées au formaldéhyde 4% (VWR Prolabo®, Fontenay-sous-Bois, France) pendant 2 min, et à nouveau rincées 3 fois pendant 5 min avec du PBS 1X. Les lames sont incubées pendant 7 min à 37°C avec de la pepsine (0.5µg/ml). Cette enzyme hydrolyse les liaisons peptiques, ce qui permet de digérer les protéines interagissant avec l'ADN des cellules, et d'obtenir une meilleure accessibilité des sondes à l'ADN. Ensuite, les lames sont rincées pendant 30 secondes au PBS 1X, et à nouveau fixées au formaldéhyde 4%, rincées 3 fois 5 min au PBS 1X, puis déshydratées dans des bains successifs d'éthanol (VWR Prolabo®, France) à différentes concentrations (50% 5 min, 70% 5 min puis 100% 5 min). Les lames sont laissées à sécher pendant 20 min à température ambiante, pour limiter le bruit de fond. Les deux sondes PNA (centromérique et télomérique) sont diluées dans un tampon d'hybridation (0,3ng de chaque sonde PNA/µl ; 70% formamide ; 10mM de Tris HCl à pH 7,2 ; 1% de blockingréagent : BR), et déposées sur les noyaux, puis l'ADN est dénaturé sur plaque chauffante à 80°C pendant 3 minutes, pour que les sondes puissent s'apparier. L'hybridation s'effectue ensuite durant 2h dans une chambre humide, à l'abri de la lumière et à température ambiante. Les lames sont ensuite rincées 2 fois pendant 15 min dans du formamide 70% ; 10mM de Tris HCl à pH 7,2 (lavage I), puis 3 fois pendant 5 min dans du NaCl 150mM ; tween 20 à 0,05% ; 50mM de Tris HCl à pH 7,2 (lavage II). Enfin les lames sont rincées au PBS 1X et contre-colorées avec un intercalant de l'ADN, le DAPI (Vysis, Abbott, France) et à nouveau rincées avec du PBS 1x. Les lames sont ensuite montées avec des lamelles et du PPD, évitant la perte de fluorescence des sondes. Les métaphases sont ensuite capturées au microscope à fluorescence (Zeiss Axioplan) grâce au logiciel Metafer 4 (Metasystem®, Allemagne) puis analysées sous Isis (Metasystem®, Allemagne).

III.6.4. Double marquage virus-subtélomères

Une lame déjà marquée en télomères/centromères et analysée par le système Metafer4, a été déshybridée pour pouvoir la réhybrider avec la sonde de l'HHV-6 et une sonde spécifique du subtélomère du chromosome concerné par l'intégration du virus. Pour cela la lamelle a été décollée en PBS à 37°C, et par la suite, la lame a été rincée pendant 30 min. en SSCT 2X à 37°C.

Ensuite la procédure de marquage est la même que celle appliquée pour marquer le virus seul, le mélange de sonde utilisé pour ces marquages est 1 :1 sonde de virus : sonde spécifique du subtélomère (Vysis, Abbott, France).

La position de chaque métaphase capturée par le système Metafer4, a été enregistrée, d'où la possibilité de relocaliser une métaphase parmi celles enregistrées dans la galerie. Cela permet de comparer les résultats obtenus, avec le marquage précédent des télomères et centromères, avec celui obtenu par double marquage du virus et des subtélomères au niveau du même chromosome.

III.6.5. Multi-FISH

Le M-FISH permet l'identification de tous les chromosomes d'une même métaphase par une technique de FISH multicolore. Il s'agit de l'hybridation d'un ensemble de sondes, présentées sous forme de lots, spécifiques de chaque chromosome. Il permet d'identifier tous les chromosomes de la métaphase en une seule étape, les sondes ADN (24Xcyte mFISH) (Metasystems, Allemagne) étant marquées par une combinaison de fluorochromes. Ceux-ci sont au nombre de cinq (DEAC, Cyanine5, Fluorescein, Spectrum OrangeTM, Texas Red) et, combinés entre eux, ils vont générer une image comportant 24 couleurs.

Un contre-colorant est aussi ajouté, le DAPI. Celui-ci étant un intercalant de l'ADN, il permet de visualiser la métaphase dans son entier.

Dans l'enchaînement des techniques utilisées au laboratoire, la technique de M-FISH se fait sur les lames ayant déjà subi un marquage télomérique. Les lames sont donc rincées à plusieurs reprises dans une solution de SSC (Saline Citrate Sodium) d'abord à température ambiante puis à 70°C afin d'éliminer les sondes précédemment hybridées. Les chromosomes sont ensuite dénaturés par une solution basique de NaOH à 0,07N. Après plusieurs lavages dans du tampon salin SSC, les lames sont déshydratées dans de l'éthanol à différentes concentrations croissantes pour optimiser l'hybridation des sondes. En parallèle, les sondes

sont dénaturées dans un bain-marie à 75°C, préhybridées 30min à 37°C puis déposées sur la lame. L'incubation dans une atmosphère humide à 50% de formamide (Sigma, France) dure deux jours. Des lavages post-hybridation sont ensuite effectués. Une fois le DAPI ajouté et le montage des lames au PPD effectué, les métaphases sont capturées grâce à un microscope à fluorescence. Chaque chromosome de la métaphase apparaît donc dans une pseudo-couleur issue de la combinaison des différents fluorochromes

III.7. Immunofluorescence, études de l'expression des protéines impliquées dans la signalisation des dommages à l'ADN

Cytocentrifugation

Cette partie a été réalisée seulement sur les lignées établies. Les cellules des lignées DPL, GAN et CoAN ont été centrifugées, puis le culot a été suspendu dans du PBS à une concentration d'environ $0,3 \times 10^6$ cellules/ml. Une cytocentrifugation de 200µL de la suspension obtenue a été effectuée pendant 5 min. à 800 tours/min., sur des lames en verre, recouvertes de polylysine permettant une meilleure adhérence des cellules, qui sont projetées sur un spot de quelques millimètres de diamètre. Elles ont ensuite été fixées par incubation dans un mélange paraformaldéhyde 3% - sucrose 2% pendant 10 min.

Un marquage de 4 protéines différentes (γ H₂AX, PML, ATM, 53BP1) a été réalisé sur les noyaux interphasiques cytocentrifugés par immunofluorescence. Les cellules ont été perméabilisées par incubation 1 min. dans du Triton X-100 0,05 % en PBS 1X avant et après la fixation. Les lames ont ensuite été placées à 4°C pendant une nuit dans une solution de blocage à 2% de BSA (Bovine Serum Albumin). Cela permet de saturer les sites aspécifiques pour assurer une fixation optimale des anticorps. Le lendemain, les lames ont été incubées en chambre humide pendant 1h à 37°C avec des anticorps monoclonaux de souris (Millipore, France) anti- γ H₂AX (à 1/500^{ème}), anti-PML, anti-53BP ou anti-ATM les 3 à 1/200^{ème}. Après 3 lavages de 5 min. chacun en PBS 1X contenant 0,05% de tween 20, les lames ont été incubées avec l'anticorps secondaire anti-souris couplé à de la Cyanine 3, à 1/2000^{ème} (Sigma), en chambre noire humide à 37°C pendant 1h. Par la suite, une deuxième série de 3 lavages a été effectuée, suivie d'une contre-coloration au DAPI (à 1µL/mL). Pour finir, les lames ont été montées sous lamelle avec de la PPD et les noyaux ont été capturés et analysés à l'aide du logiciel Metacyte.

III.8. Irradiation

Les cellules des 3 lignées DPL, GAN et CoAN, ont été exposées à des doses de radiations 2Gy et 4Gy, à l'aide d'un irradiateur à rayons gamma IBL637 (CIS bio international, Gif sur Yvette, France) au ^{137}Cs avec un débit de référence de 0.61 Gy/min. Les flasques ont été placées à 45 cm de la source et irradiées pendant 198 secondes pour les 2Gy, et 403 secondes pour les 4Gy.

III.9. qRT-PCR, détection des transcrits codant des protéines induites par p53

Les qRT-PCR ont été réalisées dans le centre de radiation, Santé publique, Risque chimique et environnemental à Chilton, Royaume-Uni. La technique a été citée dans les deux articles suivant (Badie *et al.*, 2008; Badie *et al.*, 2013).

L'ARN total a été extrait pour chacune des 3 lignées DPL, GAN et CoAN, en utilisant le Kit « RNAqueous-4PCR » (Ambion, Applied Biosystems, Californie, USA). Les *reverse transcriptions* ont été réalisées avec 1-1,5 mg d'ARN total en utilisant le kit « High Capacity cDNA Archive » (Applied Biosystems).

Les PCR en temps réel ont été réalisées à l'aide du thermocycleur « iQ5 » (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Les valeurs Ct de 5 gènes cibles (SESN1, cycline G1, PUMA, ZMAT3 et p21) ont été recueillies et analysées par le logiciel « iQ5 detection System », puis ont été normalisées par rapport à un contrôle interne, HPRT1 (Hypoxanthine–Guanine phosphoribosyltransferase 1 human). Les valeurs de Ct ont été converties en « quantité de transcription » en utilisant des courbes d'étalonnage obtenues par dilution en cascade de fragments d'ADN amplifiés par PCR de chaque gène ou de l'ADNc. Les niveaux d'expression relatifs des gènes après irradiation ont été obtenus de manière similaire et comparés avec les contrôles (non irradiés).

III.10. Activité de la télomérase

L'activité de la télomérase a été détectée par la méthode « TRAP » (Telomere Repeat Amplification Protocol) couplée à une méthode de détection immuno-enzymatique photométrique (ELISA). Le principe de cette technique réside en deux étapes. La première consiste à ajouter par la télomérase des répétitions télomériques (TTAGGG) à l'extrémité 3' d'une amorce synthétique (substrat de la télomérase) marquée à la biotine « P1 -TS ». Ces élongations seront par la suite amplifiées par PCR à l'aide de la même amorce P1-TS et d'une autre appelée P2, en présence de la Taq polymérase (Figure 27).

Au cours de la deuxième étape, l'ADN amplifié est hybridé à une sonde spécifique des répétitions télomériques et marquée à la DIG. Après immobilisation du produit amplifié au moyen d'une réaction biotine/streptavidine, les amplicons sont détectés à l'aide d'anticorps conjugués à la peroxydase et dirigés contre la digoxigénine. En présence du substrat de la peroxydase, une lumière de faible intensité est émise à 428nm (Figure 27).

Cette technique a été réalisée grâce au kit « Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA PLUS » (Roche) sur deux de nos lignées DPL et CoAN, selon les instructions du fournisseur.

Les culots cellulaires ont été incubés pendant 30 min avec 200µL de la solution de lyse 1 (fournie dans le kit et prête à l'emploi) puis ils ont été centrifugés à 16 000 g pendant 20 min (à 4°C) et les surnageants contenant les protéines ont été récupérés.

Nous avons testé en parallèle de nos échantillons, un contrôle négatif et un contrôle positif de référence. Pour cela 25 µl de la solution 2 (contenant l'amorce biotinylée « P1-TS », substrat de la télomérase, l'amorce P2 des nucléotides et de la taq polymérase), et 5 µl de la solution 3 (contenant 0.001 amoles/µl de la séquence « IS », Internal Standard) (amoles = attomoles où 1 amoles = 1×10^{-18} moles) ont été ajoutés dans chaque tube. La séquence IS est un fragment de 216pb amplifiable par les amorces P1-TS et P2, utilisé pour contrôler l'absence d'inhibiteurs de la PCR.

Dans les tubes réactionnels de nos échantillons, une quantité égale d'extraits protéiques de chaque échantillon (0,5µg ou 1µg) a été ajoutée.

En parallèle, pour chaque échantillon, un témoin négatif a été réalisé par traitement thermique à 85 ° C pendant 10 minutes pour désactiver la télomérase. Ensuite 0,5µg ou 1µg de protéines ont été ajoutées au tube réactionnel préparé à l'avance (solution 2 + solution 5).

Pour le contrôle positif standard, il a été ajouté 1 µL de la solution 4 (contenant une séquence appelée la TS8 composée de 8 répétitions télomériques à 0,001amol/µL) aux solutions 2 et 5.

Ces différents tubes ont été incubés 30 min à 25°C. Pendant cette étape la télomérase va rallonger la P1-TS. Puis la télomérase a été inactivée par un traitement de 5 min à 94°C. Ensuite une amplification par la télomérase des produits de l'élongation a été déclenchée en utilisant le programme suivant : 30 cycles à 94°C pendant 30 sec, 50°C pendant 30 secondes, et 72°C pendant 90 secondes, suivis par 72°C pendant 10 min. L'élongation et l'amplification se passent en une seule étape.

Les produits de PCR provenant de produits d'élongation télomérique devrait contenir les incréments des 6 nucléotides spécifiques de la télomérase, alors que la « IS » génère un produit de PCR 216 bp (un contrôle de l'amplification).

Les produits de l'amplification ont été divisés en deux tubes et dénaturés dans la « solution 7 » (contenant de l'hydroxyde de sodium à 0,5%) pendant 10 min à 25°C. Ensuite l'un des tubes a été hybridé avec le tampon T qui contient une sonde (P3-T) marquée à la DIG (digoxigénine) et complémentaire de séquences télomériques répétées, l'autre tube a été hybridé avec une sonde spécifique des IS. Le contrôle négatif a été hybridé seulement avec le tampon T. Les hybridations ont été réalisées dans des microplaques comportant de la streptavidine au fond des puits, pendant 2h à 37°C, sous agitation (300 tours/min).

Trois séries de lavage de 30sec avec la «solution 10 » (washing buffer 1x) ont été réalisées. Les échantillons ont ensuite été incubés pendant 30 min à 25°C, sous agitation à 300 tours/min avec un anticorps anti-DIG conjugué à la peroxydase de radis noir (HRP, horseradish peroxidase) puis lavés 5 fois de la même façon, avec la solution 10 avant l'ajout de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB), substrat de la peroxydase, préchauffé à 25°C. La réaction enzymatique se déroule pendant 20 min à 25°C sous agitation à 300 tours/min en développant une couleur bleue. Puis la réaction est arrêtée par un tampon de blocage (> 5% d'acide sulfurique).

A la fin de la réaction, l'absorbance a été mesurée à 450 nm avec une longueur d'onde de référence de 690 nm grâce au lecteur de microplaque (Bio-Rad). L'activité relative de la télomérase a été calculée en utilisant l'équation suivante :

$$RTA = [(AS-ASO)/AS,IS]/[(ATS8-ATS8,0)/ATS8,IS]$$

AS : absorbance de l'échantillon

AS,0 : absorbance du contrôle négatif
 AS,IS : absorbance de IS de l'échantillon
 ATS8 : absorbance du *control template* (TS8)
 ATS8,0 : absorbance du tampon de lyse
 ATS8,IS : absorbance de IS du *control template* TS8

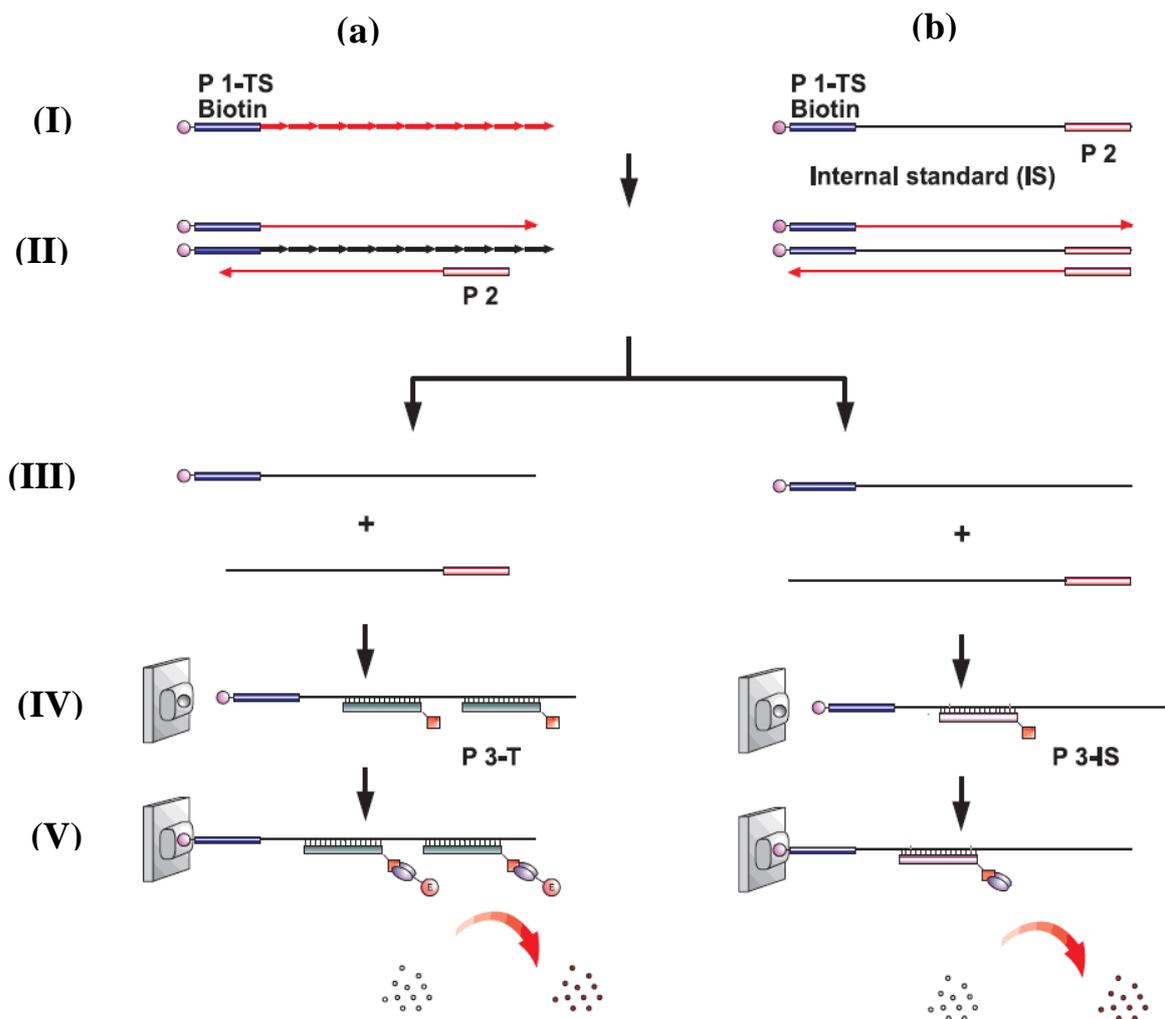


Figure 27 : Principe de la technique de mesure de l'activité relative de la télomérase.

(I,a) Elongation de l'amorce biothénylée P1-TS par la télomérase ; (I,b) ajout de la séquence « IS » de taille connue ; (II) amplification en utilisant les amorces P1-TS et P2 ; (III) dénaturation ; (IV) rétention sur la streptavidine et hybridation avec les sondes marquées à la DIG, la sonde P3-T qui est complémentaire aux séquences télomériques répétées (IV,a) et la sonde P3-IS qui est complémentaire à la séquence IS ; (V) ajout des anticorps anti-DIG conjugués à la peroxydase puis du TMB (substrat du peroxydase), développement d'une coloration bleue. Suite à cette étape, la réaction est bloquée avant la mesure de l'absorbance à 450nm.

Source : Roche, TeloTAAGGG Telomerase PCR ELISA^{plus}, Cat. No. 12013789001.

IV. Résultats

IV.1. Détection du CIHHV-6

IV.1.1 . « Screening » par qPCR

Par des PCR quantitatives TaqMan réalisées sur les extraits d'ADN à partir des PBMC de 414 patients, cinq patients provenant du département d'hématologie ont été trouvés positifs (5/249), soit 2% des patients atteints d'une pathologie hématologique. Aucun patient provenant du département de néphrologie n'a été trouvé positif. La charge en ADN d'HHV-6 était très élevée, > 1 000 000 copies/mL soit 6 log (Tableau IX). Ces résultats ont été confirmés en réalisant la qPCR sur plusieurs prélèvements d'un même patient ; les charges en ADN viral ont toujours été fortement positives. Parmi les patients positifs, 2 étaient atteints de néoplasmes à cellules B dont une leucémie lymphoïde chronique et un lymphome B diffus à grandes cellules (LDGCB). Les autres patients présentaient une leucémie aigüe myéloblastique de type 1, une amylose cardiaque, et le dernier patient avait été admis dans le département d'hématologie pour une thrombopénie au décours d'un carcinome hépatocellulaire sur cirrhose B-Delta survenant après un carcinome rénal.

Les cinq patients ont été considérés comme possédant le génome d'HHV-6 intégré dans leur génome. Parmi ces cinq patients, 3 avaient le type A d'HHV-6 et 2 avaient le type B.

IV.1.2 Détection du CIHHV-6 par FISH

Une sonde de 40 kb a été synthétisée à partir de l'ADN de la souche HST, et couplée au dUTP-FITC par Nick Translation. En même temps, nous avons réussi à obtenir pour trois des patients étudiés, des lignées stables immortalisées par l'EBV.

La sonde HHV-6 a servi pour confirmer par FISH la présence du virus intégré au sein du génome des 5 patients (GAN, CoAN, DPL, CDA et JOD). Les marquages par FISH ont été réalisés sur les étalements métaphasiques provenant directement des cellules de 3 patients (CDA, JOD et CoAN) et à partir des 3 lignées (GAN, DPL et CoAN) qui ont été effectuées.

Le CIHHV-6 a été détecté dans toutes les métaphases analysées et aussi dans les noyaux interphasiques. Cette localisation est située dans la région terminale d'un chromosome (figure 28).

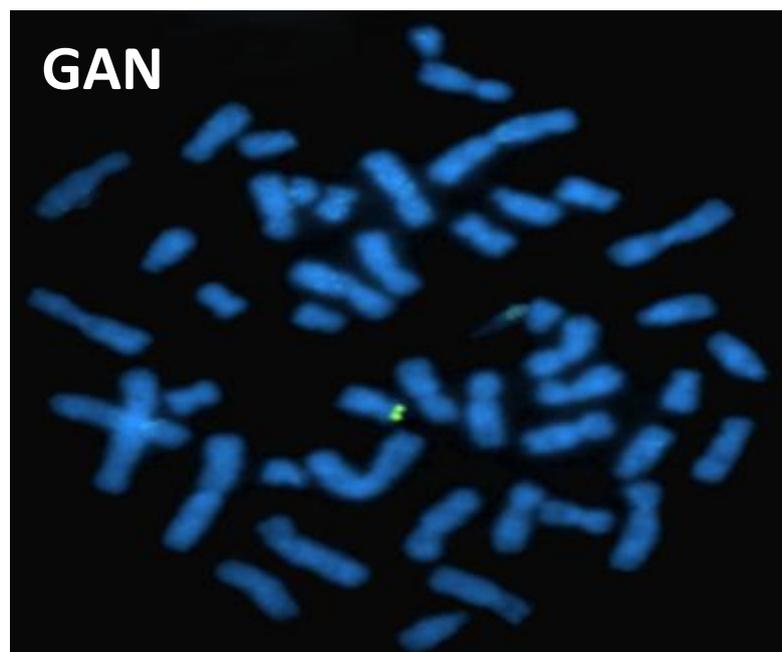
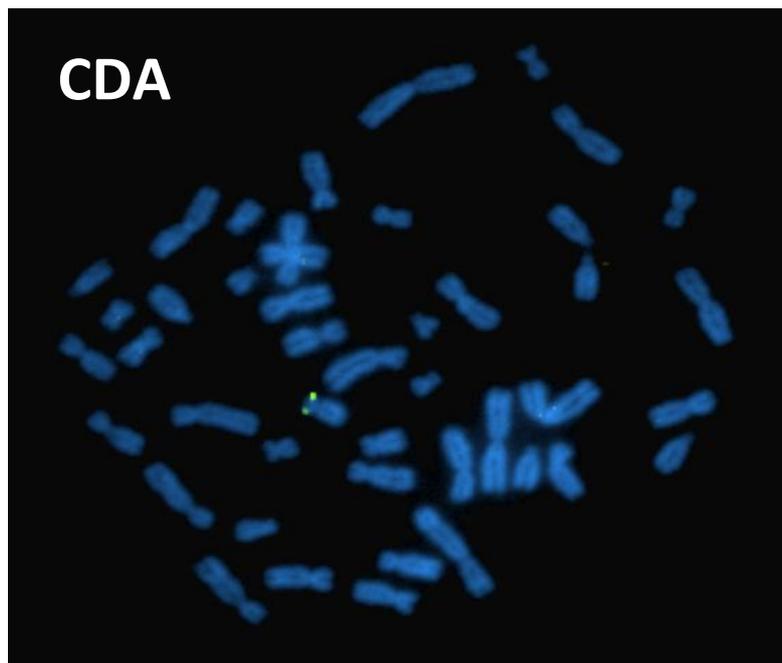


Figure 28 : Marquage FISH du HHV-6 en FITC (vert) à partir des métaphases des patients CDA et GAN.

IV.2. Localisation du CIHHV-6

Le chromosome portant le CIHHV-6 a été identifié par FISH (Figure 29), en utilisant la sonde de l'HHV-6 et une sonde spécifique des télomères ou du centromère du chromosome suspecté. Le virus a été localisé au niveau du chromosome 17p chez 3 patients, au niveau du chromosome 20q chez un seul. La 5ème patiente, JOD, avait des métaphases avec du CIHHV-6 au niveau du chromosome 2 puis d'autres au niveau du chromosome 19.

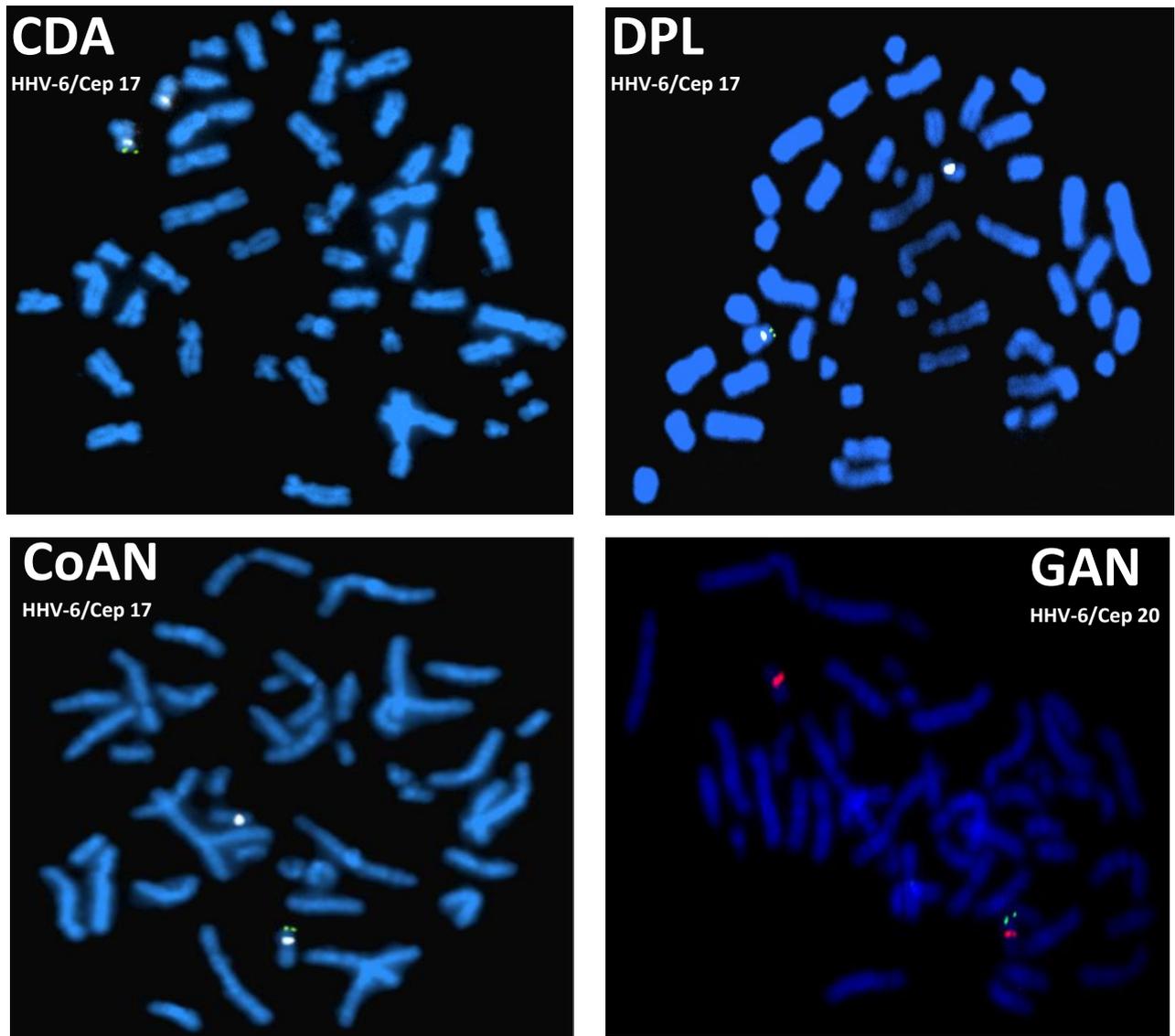


Figure 29 : Exemple de double marquage HHV-6 (en vert)/centromère (cep) du chromosome portant le virus intégré, effectué sur les lignées CDA, DPL et GAN et les PBMC du CoAN.

Ensuite, pour affiner la localisation du virus, une autre FISH a été réalisée en utilisant la sonde HHV-6 et une autre sonde spécifique de la région sub-télomérique du chromosome qui porte le virus intégré (Figure 30). L'analyse avec un microscope à fluorescence montre que tous les CIHHV-6 chez les 5 patients sont très proches de la région subtélomérique.

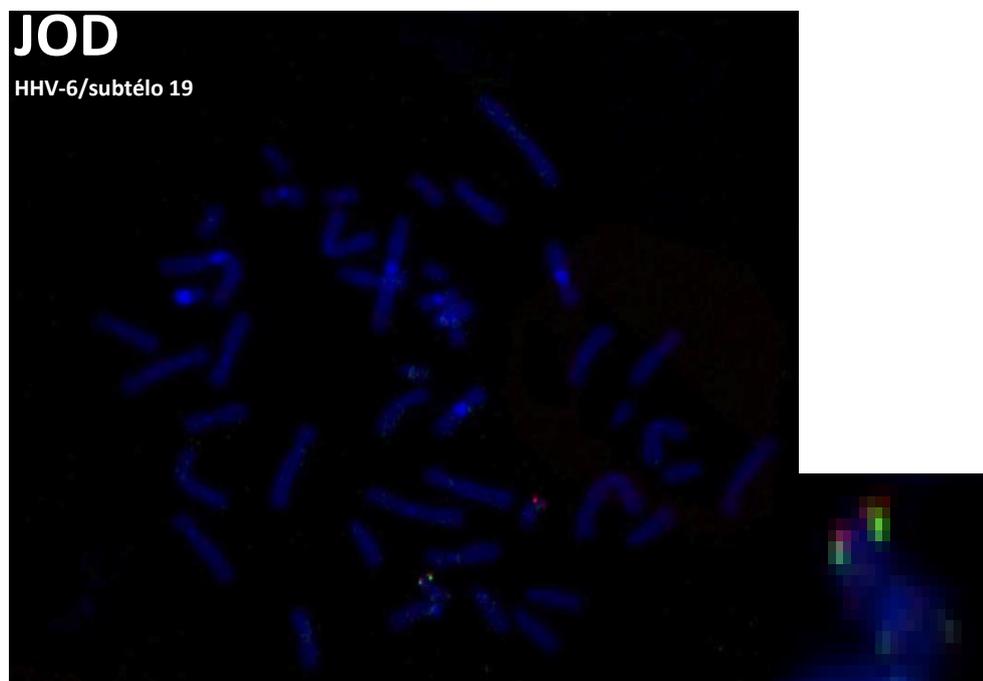
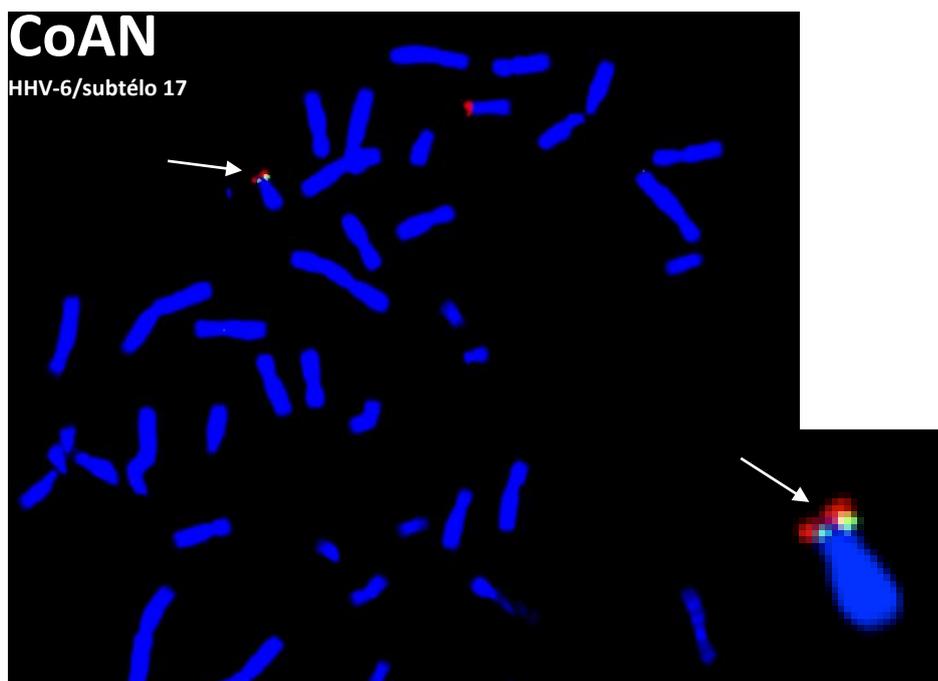


Figure 30 : Exemple de double marquage HHV-6 (en vert)/subtélomère du chromosome portant le virus intégré (en rouge), effectué sur les patientes CoAN et JOD.

	Pathologie	Charge en ADN d'HHV-6 (copies/mL)	Chromosome intégré	Type d'HHV-6
CoAN	Thrombopénie	5 150 000	17p13.3	A
DPL	Amylose cardiaque	5 850 000	17p13.3	A
GAN	Lymphome B diffus à grandes cellules	7 450 000	20p12.3	B
CDA	Leucémie lymphoïde chronique	1 600 000	17p13.3	B
JOD	Leucémie aigüe myéloblastique	7 650 000	19q13.4 ou 2q37.3	A

Tableau IX : Tableau récapitulatif des résultats obtenus pour les 5 patients positifs.

IV.3. Obtention des lignées

Nous avons réussi à avoir des lignées lymphocytaires à partir des PBMC des patients GAN, CoAN, CDA et DPL. Mais, la lignée CDA avait perdu le virus après plusieurs passages en culture. Au final, nous avons obtenu des étalements métaphasiques pour GAN, CDA et CoAN réalisés à partir des lignées, et de CoAN, JOD et DPL réalisés directement à partir des lymphocytes de ces patients.

IV.4. Etude de dysfonctionnement télomérique

L'HHV-6 possède un génome de taille de 160 à 170 kb, il est possible que l'intégration d'un si grand fragment d'ADN puisse conduire à des aberrations chromosomiques et induire certaines instabilités génomiques.

IV.4.1. Quantification des aberrations télomériques : délétion perte et doublet

Une FISH a été réalisée sur des métaphases pour nos 3 lignées DPL, GAN et CoAN et pour des cellules de patients pour CDA et CoAN, ainsi que sur des métaphases provenant de 3 donneurs de sang sains (contrôle). Les télomères et le centromère de tous les chromosomes ont été marqués en vert et rouge respectivement (Figure 31a ; 32). Nous avons observé certaines aberrations récurrentes au niveau des télomères (délétion, perte ou doublement). Les délétions se traduisent par une absence de fluorescence au niveau du télomère d'un seul chromatide alors qu'une perte se manifeste par l'absence de fluorescence du télomère sur les deux chromatides, c'est-ce qu'on appelle le « free-end ». Un doublement est la présence d'un double signal sur un chromatide.

A part dans les lignées DPL et CoAN, les pertes télomériques sont plus importantes dans nos échantillons que dans les contrôles. Les lignées DPL et CoAN ainsi que la patiente JOD n'ont pas montré de délétions au niveau des télomères, alors que les patients CoAN, CDA et la lignée GAN présentaient nettement plus de délétions que ce qui est observé chez les contrôles. A part la lignée DPL, tous nos échantillons présentent des moyennes de doublement plus basses que celles des contrôles.

Des chromosomes acentriques ou dicentriques ont été détectés chez tous les sujets étudiés sauf pour la lignée GAN.

Ces résultats montrent une instabilité au niveau des télomères de nos échantillons avec la présence d'une hétérogénéité de ces 3 phénomènes de délétion, perte et doublement (Figure 32, 33). Ceci est une caractéristique des cellules utilisant la voie alternative « ALT » pour reproduire des télomères.

Cette technique a été réalisée sur lame vierge non hybridée, ensuite nous avons effectué sur la même lame le marquage du virus/subtélomère puis le marquage M-FISH. Le but est de pouvoir superposer les photos et comparer une même métaphase en ces 3 marquages. Alors il est possible d'identifier dans chacune de ces manipulations le chromosome porteur du virus. Ceci était intéressant du fait que nous avons remarqué une amplification récurrente qui survenait au niveau des télomères du chromosome porteur (sur le bras porteur d'HHV-6) (ceci se présente par un signal de fluorescence plus fort) et pas sur les télomères du chromosome adjacent non porteur du virus (Figure 31a). C'était le cas pour les 5 cas étudiés, sauf les télomères du chromosome 2 porteurs du virus chez JOD.

IV.4.2. Perte dans la région subtélomérique au niveau du chromosome porteur du virus

En effectuant la FISH avec le double marquage virus/subtélomère, nous avons mis en évidence une perte récurrente qui survient au niveau de la région subtélomérique du chromosome porteur du virus et qui n'est pas présente dans le même chromosome non porteur du virus (Figure 31b, 34). Ceci a été vu pour 4 patients mais pas pour JOD où un très petit nombre de métaphases a été obtenu et uniquement à partir des lymphocytes puisque nous n'avons pu obtenir de lignée.

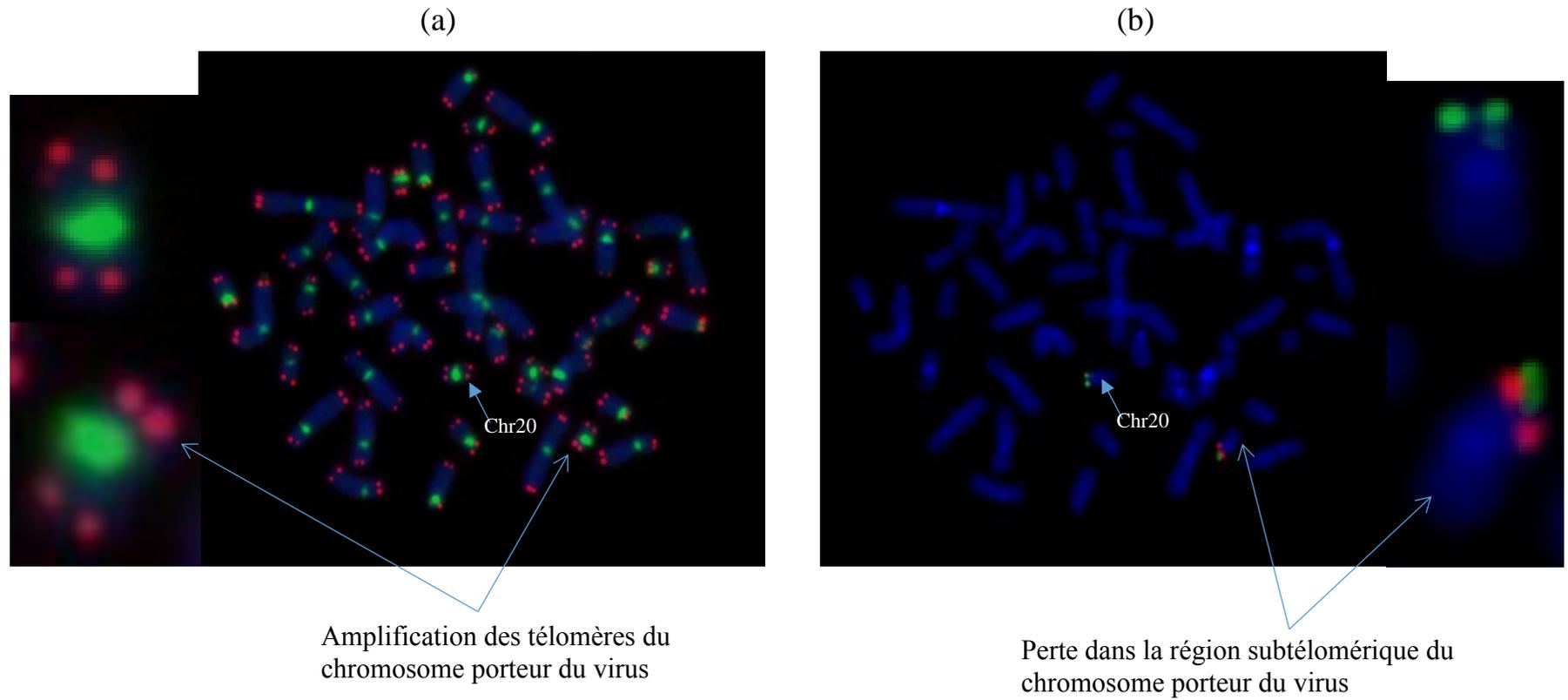


Figure 31 : Marquage métaphasique de la patiente GAN. (a) Marquage télomère /centromère. (b) Marquage CIHV-6(vert)/subtélomère du chromosome 20 (rouge).

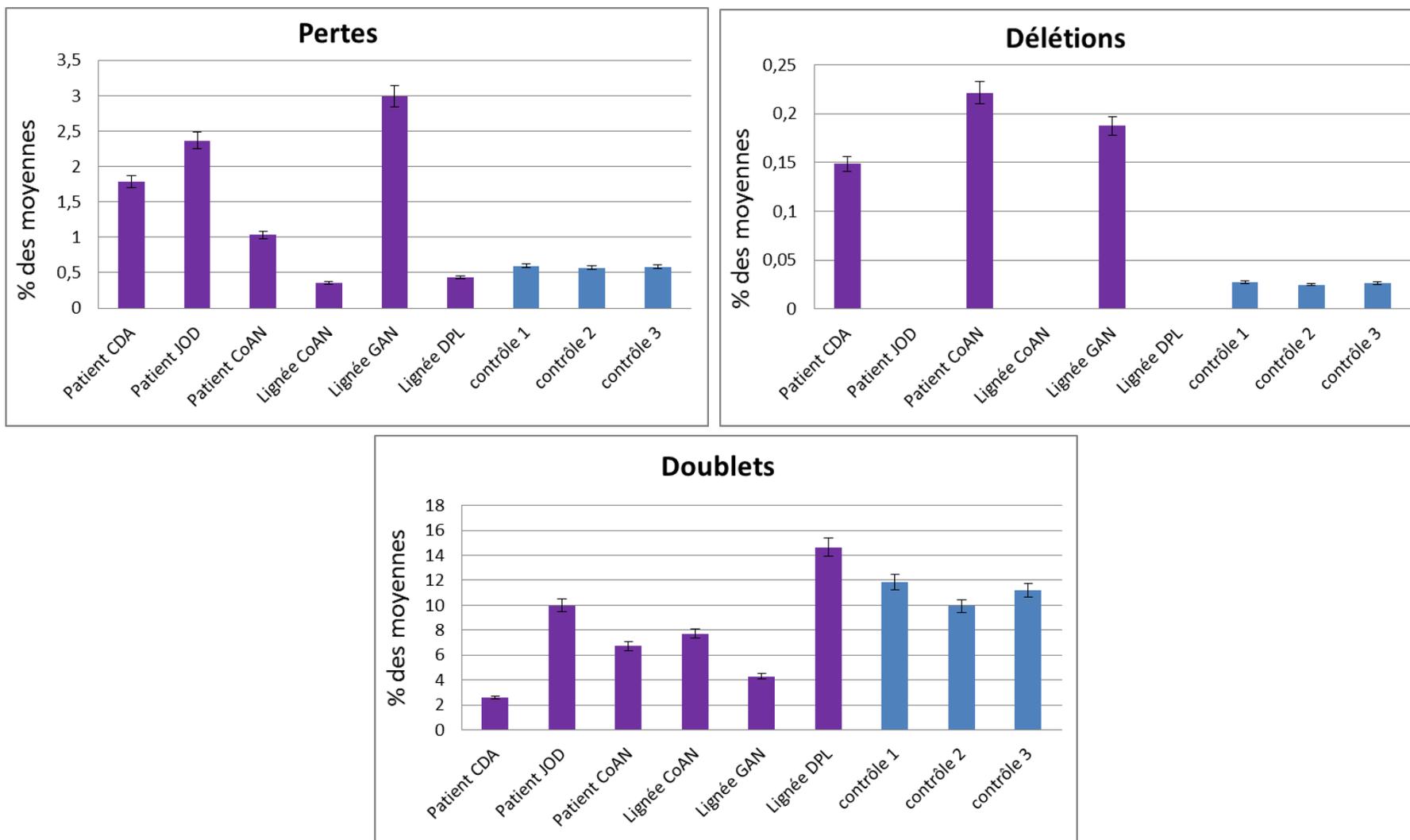


Figure 33 : Etude de l'instabilité au niveau des télomères. Résultats exprimés en pourcentage de survenue des 3 aspects, délétion, perte ou doublement du télomère.

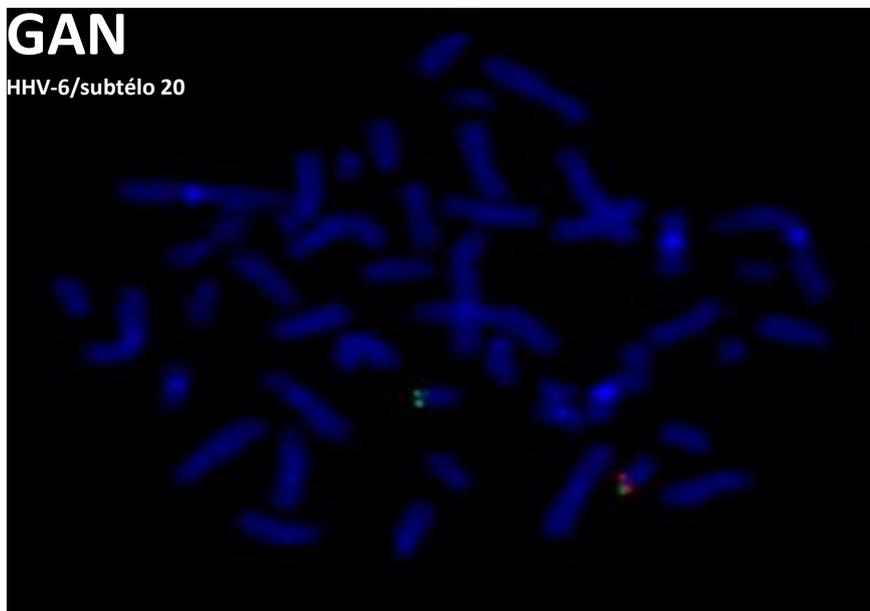
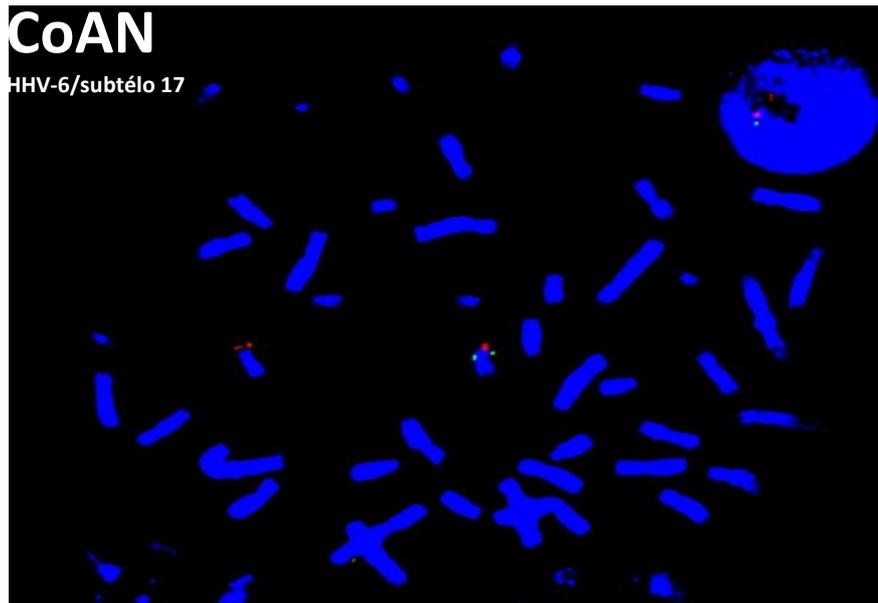


Figure 34 : Exemple de la perte survenue dans la région subtélomérique du chromosome porteur du virus pour la patient CoAN (virus en vert et subtélomère en rouge) et dans la lignée GAN (virus en rouge et subtélomère en vert).

IV.4.3 Mesure de l'activité de la télomérase

Nos résultats montrent qu'il y a une forte activité de la télomérase, qui dépasse les 6000%, dans les deux lignées CoAN et DPL. Pour éviter une saturation de la réaction, la technique a été réalisée avec de différentes quantités de protéine (Figure 35).

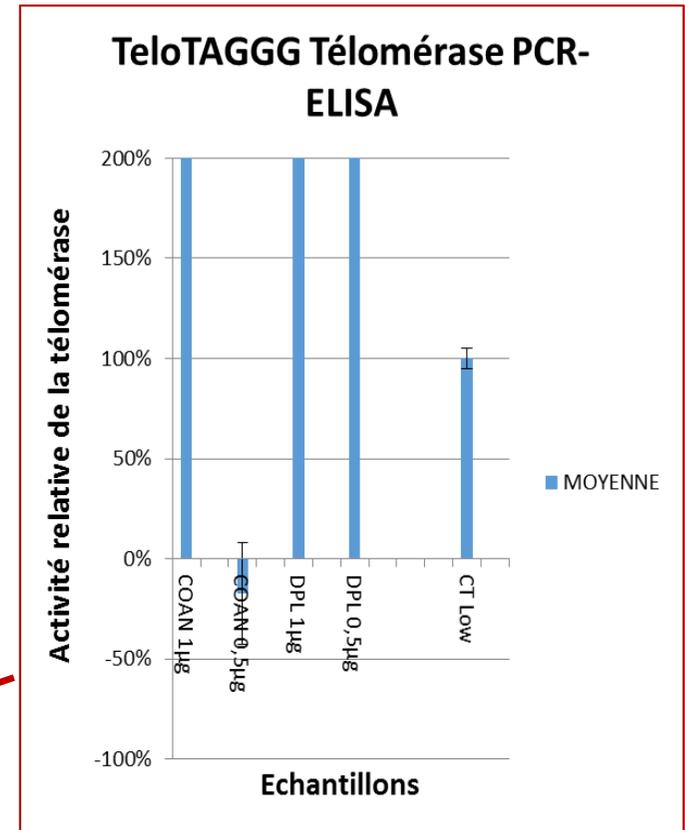
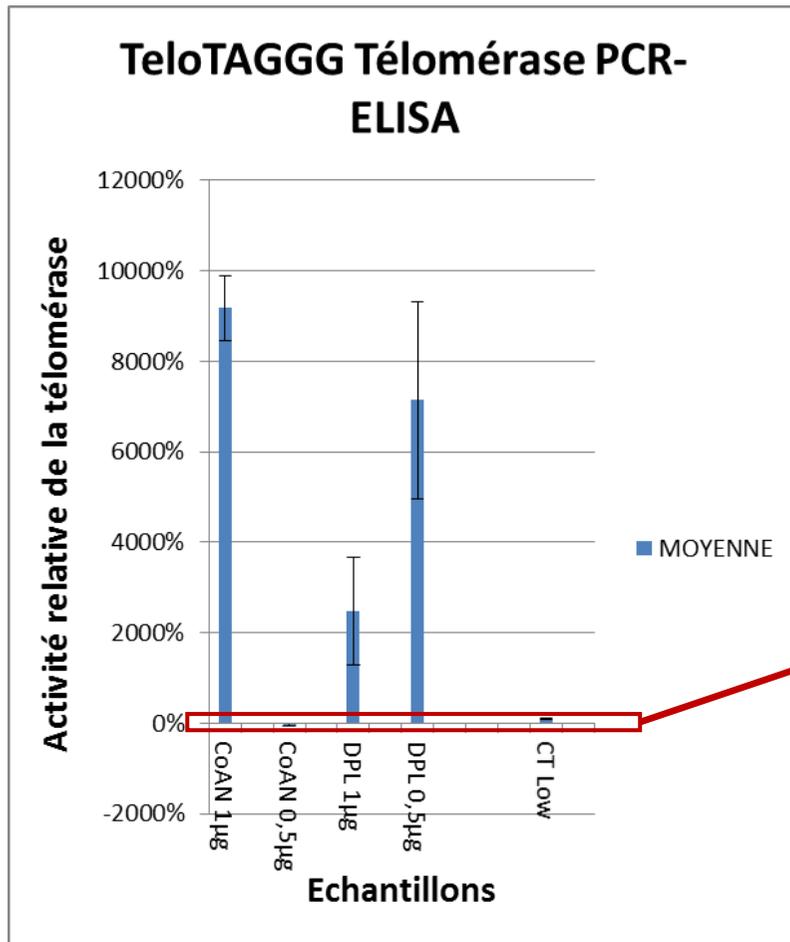


Figure 35 : (a) Activité relative de la télomérase; CT Low est l'activité de la télomérase mesurée pour l'échantillon contrôle. Elle est égale à 100% et sert de référence pour la mesure de l'activité relative de la télomérase pour les deux lignées CoAN et DPL avec deux quantités différentes de protéines, 0,5 et 1 µg. (b) Un zoom sur le graphe (a) montrant l'activité de l'échantillon référence CT Low de 100%.

IV.5. Les aberrations chromosomiques

Des aberrations chromosomiques de structure ont été détectées dans les 3 échantillons provenant des patients et dans la lignée DPL, mais pas au niveau des métaphases provenant de la lignée GAN (Tableau 4). Il a été observé aussi des aberrations de nombre. Des pertes de chromosomes ont été détectées assez fréquemment.

Parmi les aberrations de structure détectées, il y a la survenue des translocations et l'existence de chromosomes dicentriques, généralement dues à des délétions au niveau des télomères qui normalement devraient empêcher la fusion de deux chromosomes par leurs extrémités. Des exemples existent pour le patient CoAN avec un dicentrique 13 (Figure 36a), pour la lignée DPL avec la fragmentation du chromosome 7 et chez les patients JOD et CDA ainsi que dans la lignée DPL, on note la présence de chromosomes acentriques (Tableau).

Les résultats obtenus pour la patiente JOD (qui possède un chimérisme de ses cellules avec un donneur mâle) révèlent des aberrations survenant d'une manière récurrente, comme la délétion au niveau du bras q du chromosome 1. Et d'une manière intéressante, nous avons observé une délétion au niveau du bras q du chromosome 2 portant le virus et qui survient d'une manière récurrente dans ses propres cellules (XX) (Figure 36b), alors que dans les cellules (XY) provenant du donneur mâle, le chromosome 2 semble normal.

Le RAD (dicentrique) chez le patient CoAN, survient sur le chromosome 17 qui porte l'HHV-6 intégré mais ceci n'a été vu qu'une seule fois.

Patient ou lignée	Nombre de métaphases analysées	nombre de chromosomes ; aberration structurale (nombre de fois)	nombre de chromosomes ; Gain ou perte de chromosome
JOD (patient)	*18 métaphases avec XX * 21 avec XY * 1 avec un seul X * 1 avec XXXXY *1 avec ni X ni Y	44XX; Del1q (9) 43X; Del1q (1) 37; Del1q (1) 44XX; (Del1q)x2 (1) 44XX; Del2q (2) 43XX; Del2q (1) 44XY; Del2q (1) 44XX; Del1q + del2q (1) 44XX; Del1q + del3q (1) 88XXXXXY; Del2q + acentrique2 (1)	40XY-1-6-18-20 41XY-13-14-21 43XY; -20 43X; -20-X-Xou Y 35XX; -1-9-11-12-12-18-19-20-22 88XXXXXY; -10+X 43XX; -3 37;-5-5-8-10-14-15-18-X-X ou Y 38XY; -1-2-10-11-12
CDA (patient)	34	44XX; Acentrique3 (1)	36; -1-1-5-9-15-19-X-X 29XX; -3-8-10-18-15-14-13-16-16-18-21-20-19 42XX; -12-18 41XX; -6-5-19 43XX; -17 43XX; -21 45XX; +18
GAN (lignée)	9	Pas d'aberrations observées	42XY; -19-20 41XY; -15-20-22
DPL (lignée)	15	42XY; Acentrique1 (1) 42XY; Acentrique5 (1) 43XY; Frag7 (1)	42XY; -17-15 42XY; -4-19 42XY; -6-12 43XY; -10
COAN (patient)	14	42XX; Dicentrique13 (1) 43XX; Rad17 (1) 45XXT(X;12) (1) T(19;20);t(20;19) 43XX; DelXq et Del16q (1)	45XX; +7 45XX; +19 45XX; + X 43XX; -6 42XX; -3-12 43XX; -18

Tableau X : Tableau récapitulatif des aberrations observées chez les patients JOD, CDA et CoAN et dans les deux lignées GAN et DPL détectées par M-FISH.

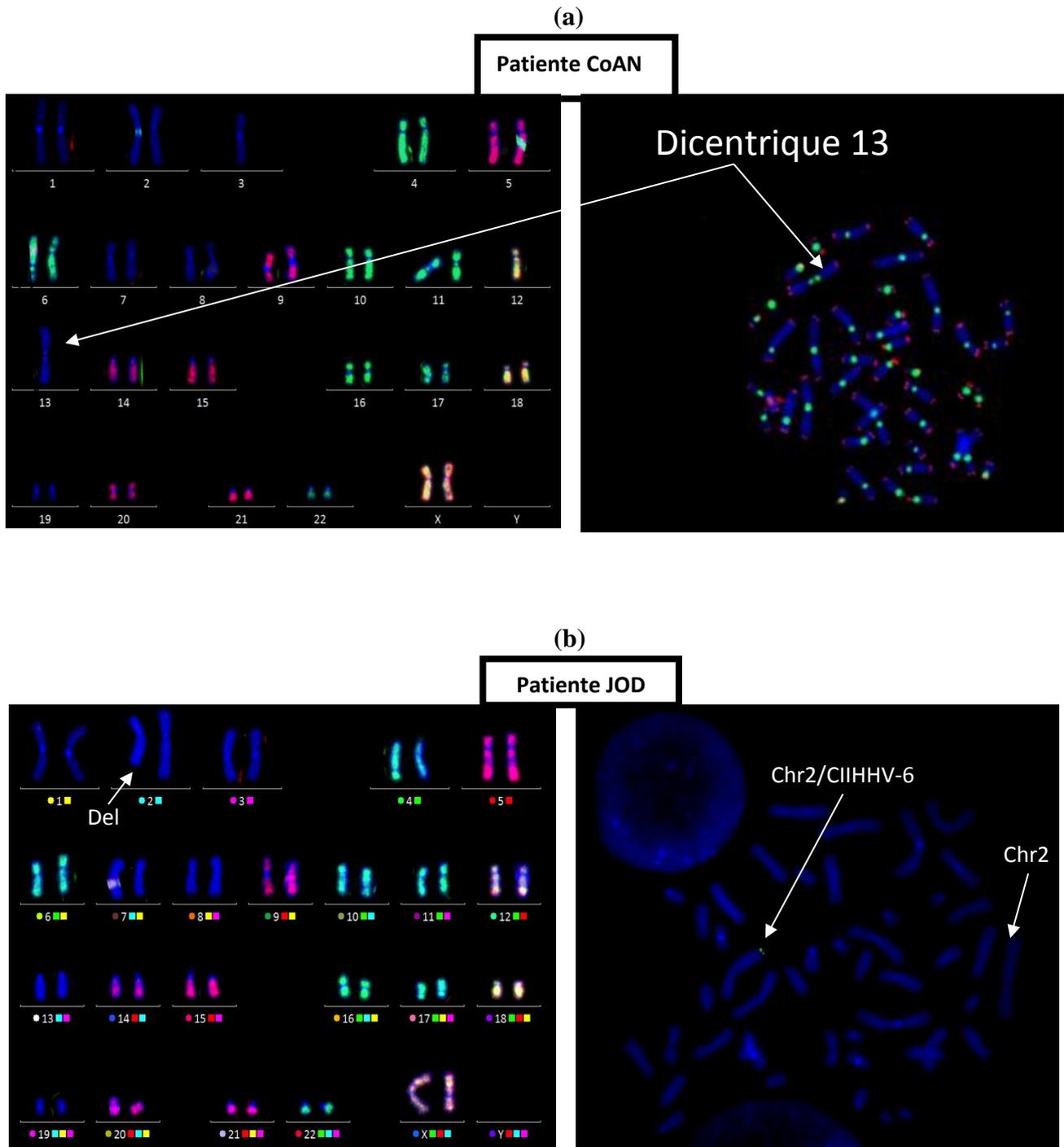


Figure 36 : (a) Exemple d'un dicentrique des chromosomes 13 présent au sein du génome de la patiente CoAN (à gauche, marquage M-FISH, à droite marquage des télomères/centromères). (b) Exemple de la délétion récurrente au niveau du chromosome 2 porteur de CIHHV-6 chez la patiente JOD (à gauche, coloration M-FISH, à droite marquage simple du CIHHV-6 en vert).

IV.6. Expression basale des protéines impliquées dans la réparation des cassures double brin

L'expression des protéines impliquées dans les voies de signalisation/réparation aux dommages à l'ADN a été étudiée par des marquages par immunofluorescence réalisée sur les lignées DPL, GAN et CoAN. Une forte expression de la protéine ATM a été observée ainsi que les 3 autres protéines γ H2AX, 53BP1 et PML (Figure 37).

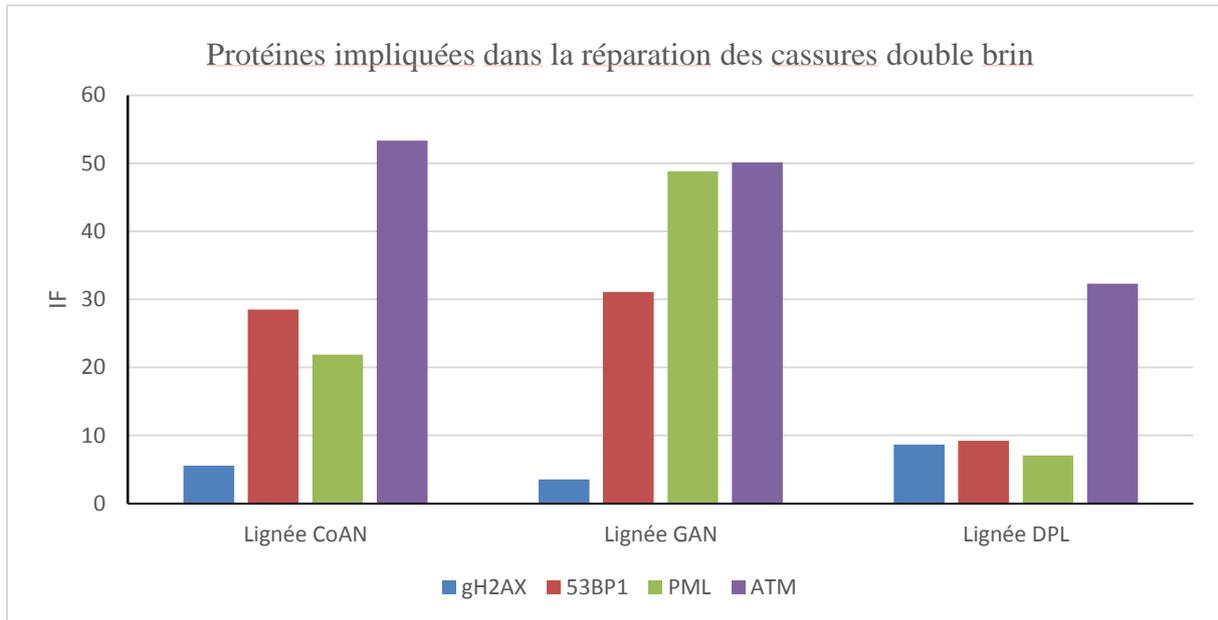


Figure 37 : L'expression des protéines γ H2AX, 53BP1, PML et ATM sur 1000 cellules pour chacune des lignées CoAN, GAN et DPL, mise en évidence par immunofluorescence.

IV.7. Radiosensibilité des lignées, expression génique

Les cultures des 3 lignées, DPL, GAN et CoAN ont été arrêtées 2h et 24h après leur exposition à des radiations γ (2 Gy), puis le niveau d'expression de 5 transcrits codant les protéines CyclineG1, PUMA, p21, ZMAT3 et sestrin1 (SESN1) a été mesuré. Quatre lignées lymphocytaires B immortalisées par l'EBV (NAD, REMB, RMD32 et RMD33) ont été utilisées comme contrôles (Figure 38). Ces protéines sont toutes induites par la protéine suppresseur de tumeur p53. Elles interviennent dans l'arrêt du cycle cellulaire et dans l'apoptose, lorsqu'une réponse de dommage à l'ADN est déclenchée. L'irradiation de ces différentes cellules induit toujours une augmentation d'expression des 5 transcrits étudiées. A part l'expression de SESN1, CoAN semble toujours avoir de forts niveaux d'expression des transcrits par rapport aux lignées contrôles.

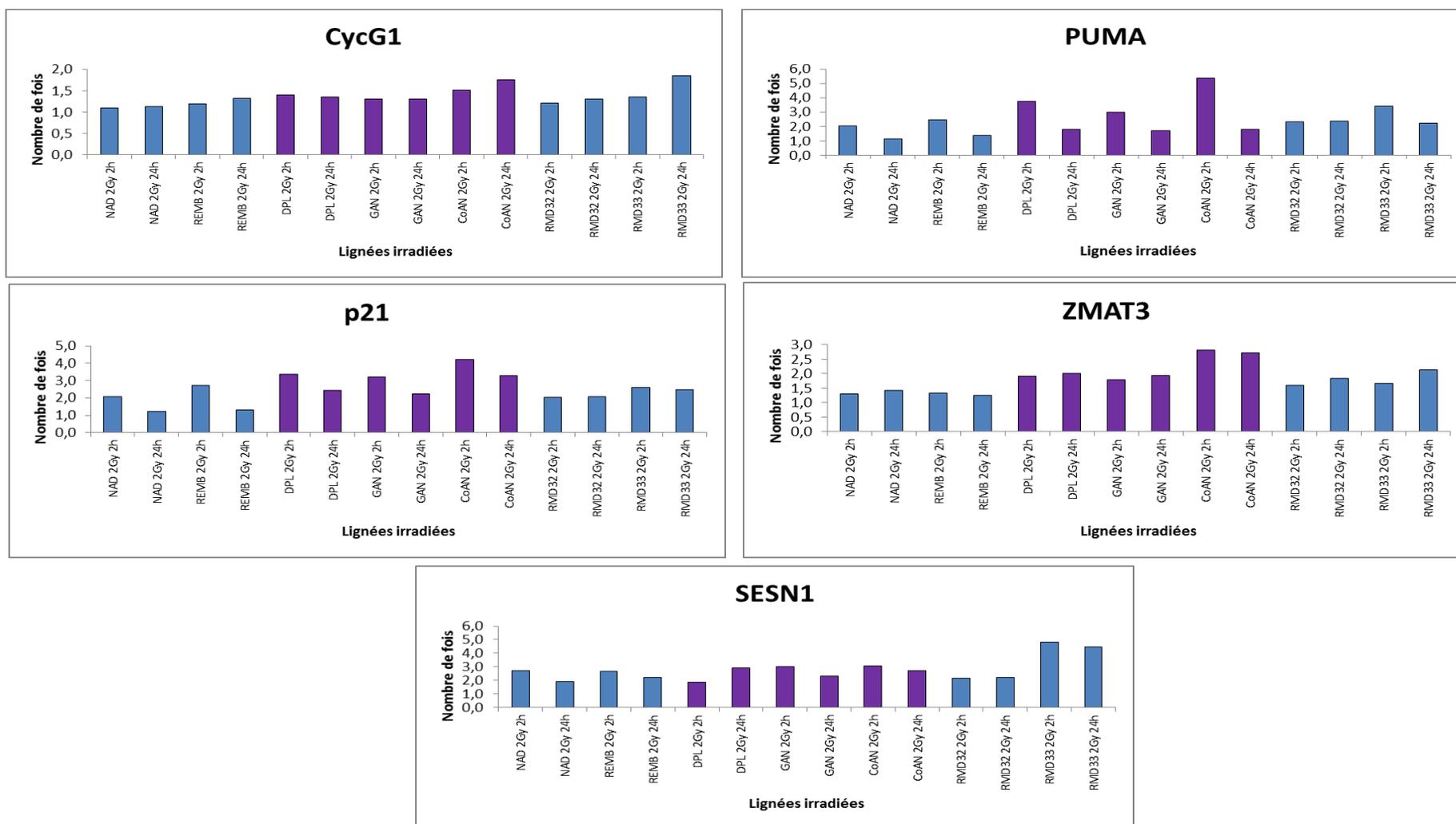


Figure 38 : Variation du niveau d'expression des transcrits de GycG1, PUMA, P21, ZMAT3, SESN1 dans des lignées irradiées à 2Gy, exprimée en nombre de fois par rapport à celle obtenue pour des cellules non irradiées, 2h et 24 h après irradiation.

Les valeurs obtenues pour les transcrits des 3 lignées DPL, GAN et CoAN sont reportées en violet ; celles obtenues pour les 4 lignées contrôles immortalisées par l'EBV, NAD, REMB, RMD32 et RMD33 sont reportées en bleu.

V. Discussion de l'article III

Dans un groupe de 249 patients provenant du département d'hématologie, 2% portaient le CIHHV-6. Ces résultats vont dans le même sens que la prévalence rapportée dans la population mondiale. La prévalence de l'intégration est estimée à 0,85% dans des groupes de donneurs (sains) du sang. Cependant, cette prévalence est estimée à 1,99% (en moyenne) chez des sujets malades (Pellett *et al.*, 2012). Par exemple, dans un groupe de patients souffrants de la maladie de Hodgkin, le CIHHV-6 a été détecté à 12,73% (7/55 patients) (Torelli *et al.*, 1995). Alors que la prévalence était égale à 0,74% (1/135 patients) chez des receveurs d'une greffe d'organe solide (Potenza *et al.*, 2009). Il en est de même pour ce qui concerne le site d'intégration d'HHV-6 qui est rapporté le plus fréquemment, comme nous l'avons détecté, au niveau du chromosome 17p13.3. Bien que l'HHV-6 ne s'intègre pas spécifiquement dans un seul chromosome à l'inverse de l'AAV-2 qui ne s'intègre qu'au niveau du chromosome 19, il semble que le chromosome 17 porte le site préférentiel de l'intégration de l'HHV-6.

Parmi les 5 patients étudiés, deux (JOD et CDA) avaient bénéficié d'une allogreffe et à chaque fois le donneur des cellules souches transplantées était porteur du CIHHV-6.

Le donneur de cellules souches pour la patiente JOD était un homme. L'examen des cellules de JOD a montré du CIHHV-6 au sein du chromosome 19 des cellules de caryotype masculin (46 XY). Mais JOD avait un chimérisme incomplet, donc elle possédait toujours des cellules de caryotype féminin (46 XX) qui, elles, portaient aussi du CIHHV-6 mais au niveau du chromosome 2. Le CIHHV-6 a été détecté dans toutes les métaphases analysées. Nous n'avons découvert le cas de JOD qu'après son allogreffe et nous n'avons pas eu de prélèvements avant la transplantation. Il semble donc que JOD ait du virus intégré dans le chromosome 2 de ses propres cellules et qu'elle ait reçu des cellules avec le CIHHV-6 dans le chromosome 19 via la transplantation. Nous n'avons pas réussi à établir de lignée à partir des lymphocytes de JOD, probablement parce que le seul prélèvement sanguin obtenu dans cette perspective a été effectué lors d'une acutisation de sa leucémie et 24h avant son décès.

Le donneur des cellules souches pour CDA était sa sœur. Une PCR quantitative sur des prélèvements en amont de la transplantation, montre que CDA n'avait pas le virus intégré dans son génome. Après la transplantation, la PCR sur les PBMC de CDA s'est révélée très positive.

CDA avait un chimérisme complet. Le caryotype de son génome a montré qu'il ne possédait que des cellules (46 XX) de sa sœur, avec de CIHHV-6 au niveau du chromosome 17.

Nous avons établi une lignée à partir des lymphocytes de CDA, mais nous nous sommes rendu compte après plusieurs passages, que cette lignée avait perdu le virus : elle présentait une qPCR négative. Nous supposons que dès le départ nous avons eu dans la culture un mélange de cellules lymphoblastoïdes de CDA sans le virus intégré et de cellules lymphoblastoïdes de sa sœur ayant le CIHHV-6. Pourtant le chimérisme chez CDA a été à 100, il est probable que ce n'était pas tout à fait vrai. Il semble que les cellules de CDA soient mieux développées et plus rapidement, et que progressivement les cellules portant le CIHHV-6 aient disparues.

En ce qui concerne GAN, qui constitue la première patiente pour laquelle nous avons trouvé du CIHHV-6, nous avons réussi à établir une lignée et à effectuer quelques étalements directement à partir des PBMC. Malheureusement GAN est décédée peu de temps après.

Concernant le patient DPL, nous avons seulement réussi à établir une lignée et à faire des étalements à partir de celle-ci. En effet, des problèmes techniques n'ont pas permis d'obtenir d'étalements à partir des cellules du patient.

Il a été détecté par des techniques de biologie moléculaire du CIHHV-6 intégré au niveau de télomères du chromosome intégré *via* les répétitions télomériques parfaites présentes au niveau de la séquence DRR du génome viral (Arbuckle *et al.*, 2010). Les sondes que nous avons utilisées dans notre étude pour marquer les régions subtélomériques s'hybrident (selon le fournisseur) à la partie la plus distale du subtélomère chromosomique. Le signal de l'HHV-6 a été détecté juste en-dessous. Il n'a malheureusement pas été possible de réaliser une lecture par microscopie confocale des lames FISH. La microscopie confocale, bien que moins sensible est plus résolutive mais, notre sonde de 40 kb n'a pas pu être détectée par le microscope confocal.

Nous avons observé une amplification récurrente au niveau de télomères du chromosome porteur du virus par rapport à son homologue non porteur pour les 5 cas de cette étude. A l'inverse, Huang et ses collaborateurs ont rapporté dans leur étude publiée très récemment (septembre 2013) un raccourcissement des télomères du chromosome porteur du CIHHV-6. Cela a été observé dans 45% de leurs échantillons provenant de cellules somatiques (40 échantillons), mais ils n'ont pas observé de raccourcissement des télomères associé au CIHHV-6 dans des cellules germinales de 4 donneurs du sperme (Huang *et al.*, 2013). Ils supposent que ces

télomères sont déjà rallongés par la télomérase. Pour mesurer la taille des télomères, ils ont utilisé la technique « STELA », décrite pour la première fois par Baird et ses collaborateurs (Baird *et al.*, 2003). Elle consiste à lier l'extrémité 5' libre du télomère avec une séquence adaptatrice appelée « Telorette », formée de 7 nucléotides complémentaires à la séquence 3' riche en G, étendue par une queue de nucléotides non complémentaires de l'extrémité 3'. Ensuite une amplification est réalisée en utilisant une amorce sur la région non complémentaire de Telorette et une autre soit au niveau de l'extrémité DR du virus soit dans la région subtélomérique du chromosome intégré (adjacent au télomère). Dans ce même article, les auteurs ont évoqué le cas de deux personnes différentes (2/3859) ayant un CIHHV-6 qui a perdu sa séquence U et il ne reste intégré qu'un seul DR-HHV-6B (sans les PAC1 et PAC2). Les auteurs suggèrent que ce CIHHV-6 a probablement déjà subi un phénomène d'excision, mais ils n'abandonnent pas l'hypothèse d'une intégration partielle du virus.

Toujours dans la même étude, les auteurs ont détecté sur 5 lignées obtenues à partir des membres d'une même famille ayant le CIHHV-6, des ADN viraux circulaires entiers avec un seul DR. Ils suggèrent que ce phénomène survienne suite à la formation d'une boucle-T entre l'extrémité 3' libre (simple brin) du télomère et les régions TR du CIHHV-6. Ils proposent que ce phénomène puisse être la première étape avant une éventuelle réactivation du virus.

La seule fois où nous n'avons pas détecté d'amplification de télomère a été sur le chromosome 2 porteur de CIHHV-6 de la patiente JOD. Ensuite par la M-FISH, une délétion récurrente a été détectée au niveau de ce même chromosome 2. Il se peut que le virus intégré ait altéré l'intégrité de ce chromosome, probablement des troncations au niveau de bras chromosomique ont eu lieu lors de l'intégration de l'IHHV-6. Mais pour le moment il n'est pas possible d'avoir une confirmation sur ce fait

Les études publiées récemment se sont intéressées à analyser la région télomérique du chromosome intégré (Arbuckle *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2013). Comme les télomères sont considérés être les sites dans lesquels le CIHHV-6 s'insère, la région subtélomérique n'a jamais été étudiée. Nous avons détecté une perte récurrente au niveau de la région subtélomérique du chromosome porteur. Cela va bien avec l'hypothèse que le CIHHV-6 puisse induire une instabilité dans le chromosome où il s'intègre, mais les mécanismes ne sont pas connus.

Nous avons observé une instabilité au niveau des télomères due aux délétions, pertes ou doublets de télomère. Une forte hétérogénéité en longueur de télomère a été observée, cela est une caractéristique des cellules utilisant le mécanisme alternatif « ALT » (Bryan *et al.*, 1995).

Les cellules provenant directement du PBMC du CoAN présentent plus de délétions et des pertes que celles provenant de la lignée CoAN. Il est alors probable que l'immortalisation par l'EBV a pu avoir un effet sur la stabilité au niveau des télomères.

Dans l'hypothèse que le virus pourra avoir un effet sur la taille des télomères, il était logique chercher à identifier le mécanisme utilisé par ces cellules afin de rallonger leurs télomères chromosomiques.

L'expression des protéines ATM, γ H2AX, 53BP1 et PML témoigne aussi un mécanisme « ALT ». En effet la protéine ATM joue un rôle clé dans la perception du signal de dommages à l'ADN. L'ATM activée, phosphoryle H2AX pour l'activer et la recruter au niveau des cassures double brin. Par la suite, γ H2AX est responsable de l'activation de la protéine 53BP1. La protéine PML joue un rôle essentiel dans la recombinaison homologe qui se passe entre deux chromatides (lors d'un ALT).

Ces protéines sont produites lorsqu'une cassure double brin est survenue. Mais dans la majorité des cas, elles sont recrutées au niveau des télomères pour contribuer à leur rallongement *via* la voie alternative. Dans les cellules proliférantes, des dommages au niveau des télomères ou un problème de fin de réplication surviennent toujours, mais à faible niveau, ce qui est sûrement le cas pour les 3 lignées. Nous proposons que les 3 lignées DPL, GAN et CoAN utilisent la voie alternative « ALT » pour rallonger leur séquence télomérique. La voie ALT est souvent associée à une hétérogénéité de longueur du télomère, alors le marquage FISH réalisé précédemment sur les télomères supporte cette hypothèse.

Mais par la technique TRAP effectuée sur les deux lignées CoAN et DPL, nous montrons une forte activité de la télomérase. Nous suggérons que les deux lignées DPL et CoAN puissent utiliser simultanément la voie ALT ainsi que la télomérase pour rallonger les télomères. Normalement, il n'y a qu'un seul mécanisme utilisé par la cellule pendant que l'autre est inhibé. Il a été déjà rapporté dans la littérature la coexistence de ces deux mécanismes lorsque hTERT est introduite expérimentalement dans les cellules ALT-positives (Cerone *et al.*, 2001; Grobelny *et al.*, 2001; Perrem *et al.*, 2001).

L'activité de la télomérase chez la lignée DPL a été environ 2100% lorsque 1µg de protéine a servi pour la manipulation. Mais l'activité a augmenté vers 7000% avec l'utilisation de 0,5 µg. DPL semble avoir une forte activité télomérase, ce qui fait qu'à 1µg de protéine, la réaction était saturée. Cela est corrélé aussi avec la forte survenue de doublet. Dans le sens inverse, pour la lignée CoAN il a fallu utiliser 1µg de protéine pour pouvoir détecter l'activité de la télomérase. La lignée CoAN présentait nettement moins de doublets que la lignée DPL.

En conclusion le CIHHV-6 semble induire des instabilités au niveau de génome et plus précisément au niveau de chromosome dans lequel il est intégré.

Conclusions et Perspectives

La réactivation de l'HHV-6 a notamment été associée à des rejets de greffe, un retard à la prise de greffe, des encéphalites et autres atteints neurologiques, et le syndrome d'hypersensibilité médicamenteuse ou DRESS.

Dans une première partie, nous avons présenté les travaux effectués en collaboration avec le Pr. Vincent Descamps. En partant de l'hypothèse que la réactivation des herpèsvirus lors du DRESS pourrait débiter de l'oropharynx (un site de latence des HHV-6, EBV, CMV et HHV-7) et que ces herpèsvirus sont excrétés dans la salive, nous avons pu montrer que la détection et le suivi d'une réactivation virale est possible par qPCR appliquée sur la salive des patients atteints de DRESS. Cette qPCR est intéressante pour détecter la réactivation de l'HHV-6 et du CMV. Les résultats sur la salive sont corrélés à ceux obtenus sur le sang. Mais il est plus difficile de conclure pour l'HHV-7 qui est excrété à un titre aussi élevé chez les patients que chez les contrôles, et pour l'EBV qui était fortement excrété chez les patients atteints de DRESS comme chez les patients immunodéprimés. Suite à ces résultats prometteurs, nous proposons de reprendre cette étude avec un nombre d'échantillons plus important, en pratiquant cette recherche conjointement sur la salive et sur le sang afin de rechercher une corrélation. Cela permettra de confirmer si la PCR sur la salive peut remplacer celle effectuée sur le sang.

Une autre question était de savoir si des molécules impliquées dans le DRESS peuvent induire une réactivation virale à partir de CIHHV-6, permettant alors d'avoir une très forte réplication virale et entraînant la symptomatologie du DRESS. Le traitement d'une lignée lymphocytaire B provenant d'un patient ayant le CIHHV-6 avec de l'acide valproïque, de l'amoxicilline, de la sulfazalazine ou de la phénytoïne, n'a pas entraîné de réactivation virale. Il n'a pas été observé de production de protéine p41, protéine associée à l'ADN polymérase virale pour la réplication, mais une production aléatoire de transcrits très précoces ou précoces a pu être détectée de manière indépendante de la molécule utilisée.

En supposant que la réactivation du CIHHV-6 puisse avoir lieu, le mécanisme d'excision virale du chromosome reste inconnu et sujet à différentes hypothèses (TREMPE *et al.*, 2011; Arbuckle *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2013). Ainsi il n'est pas encore connu si une telle réactivation peut faire suite à des réponses intra-cellulaires comme une réponse à la production de cytokines,

de facteurs de croissance... De plus, l'HHV-6 montre un tropisme *in-vivo* pour les lymphocytes T. De ce fait, nous avons eu l'idée de réaliser une lignée lymphocytaire T, le siège naturel de la réplication d'HHV-6. Cette lignée est en cours de réalisation.

La non-réactivation du CIHHV-6 suite aux traitements, peut être en relation avec la forme du virus intégré, le chromosome dans lequel il est intégré, son site d'intégration sur le chromosome ou d'autres facteurs encore inconnus. Alors, il sera judicieux de tester d'autres lignées ayant ce virus intégré, par ces mêmes traitements (en essayant des durées de traitement supérieures à 3 jours) et de vérifier si le virus se comporte différemment.

Il sera aussi intéressant d'essayer de faire réactiver le CIHHV-6 par un traitement des PBMC non immortalisées.

La dernière partie de notre travail a consisté à étudier les conséquences sur le génome cellulaire de l'intégration virale dans la cellule, ceci pour 5 patients avec du CIHHV-6 (3 HHV-6A et 2 HHV-6B) dans une série de 249 patients (2%) provenant du service d'hématologie de CHU de Limoges. Le CIHHV-6 a été détecté 3 fois au niveau du chromosome 17, une fois sur le chromosome 20, et chez une patiente il a été détecté sur les chromosomes 2 ou 19.

Le site d'intégration a été adjacent à la région subtélomérique du chromosome cible. Pour une colocalisation plus précise, il serait intéressant de faire les analyses par microscopie confocale qui est plus résolutive. Pour ce faire, il faut travailler avec une sonde plus grande que 40 Kb et qui sera détectable par microscopie confocale. L'idéal serait d'identifier le site d'intégration par des techniques de biologie moléculaire (identification de la jonction ADN viral/ADN chromosomique).

L'instabilité télomérique et chromosomique a été détectée par des techniques de FISH. A part le chromosome 2 de JOD, il a été observé de manière récurrente des amplifications de télomères au niveau du chromosome porteur du virus. Une perte dans la région subtélomérique du chromosome porteur du CIHHV-6 a aussi été observée. Le marquage de tous les télomères par la sonde PNA a révélé une forte hétérogénéité de la taille des télomères due à des délétions, des pertes ou des doublements des télomères.

Il serait important de procéder ensuite à une vérification de la taille des télomères du chromosome porteur du virus intégré et de le comparer à celui non porteur via la technique de STELLA décrite en 2003 (Baird *et al.*, 2003).

La perte dans la région subtélomérique du chromosome porteur du CIHHV-6 n'a jamais été analysée, il serait intéressant de vérifier cette perte. La région subtélomérique a été associée à différentes pathologies comme par exemple la myopathie facio-scapulo-humérale (FSHD) (associée à des délétions de la répétition D4Z4 dans la région subtélomérique 4q35).

Certaines aberrations chromosomiques ont été observées (dicentriques, acentriques...) et d'une manière intéressante, une délétion récurrente au niveau du chromosome 2, porteur du virus chez la patiente JOD a été détectée.

Des aberrations chromosomiques ont été détectées dans les lymphocytes des patients comme dans les lignées établies. Ces aberrations sont associées à une augmentation significative de la fréquence des micronoyaux. .

La mesure de l'expression des protéines impliquées dans la voie ALT ainsi que la mesure de l'activité de la télomérase nous permet de conclure que les cellules des deux lignées CoAN et DPL utilisent vraisemblablement les deux voies pour la maintenance des télomères.

Nous proposons de faire ensuite la colocalisation des foci γ H2AX, PML, 53BP1 et ATM avec le marquage des télomères, ce qui permettrait de vérifier que l'activation de ces protéines responsables de la réparation des cassures double brin sont recrutées vers la région télomérique et que la perte des télomères est considérée comme une cassure double brin.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- ABLASHI D. V., BALACHANDRAN N., JOSEPHS S. F., HUNG C. L., KRUEGER G. R., KRAMARSKY B., SALAHUDDIN S. Z. & GALLO R. C. 1991. Genomic polymorphism, growth properties, and immunologic variations in human herpesvirus-6 isolates. *Virology*, 184, 545-52.
- ABLASHI D. V., SALAHUDDIN S. Z., JOSEPHS S. F., IMAM F., LUSSO P., GALLO R. C., HUNG C., LEMP J. & MARKHAM P. D. 1987. HBLV (or HHV-6) in human cell lines. *Nature*, 329, 207.
- ADAMS O., KREMPE C., KOGLER G., WERNET P. & SCHEID A. 1998. Congenital infections with human herpesvirus 6. *J Infect Dis*, 178, 544-6.
- AGUT H., AUBIN J. T. & HURAUX J. M. 1991. Homogeneous susceptibility of distinct human herpesvirus 6 strains to antivirals in vitro. *J Infect Dis*, 163, 1382-3.
- AGUT H., GUETARD D., COLLANDRE H., DAUGUET C., MONTAGNIER L., MICLEA J. M., BAURMANN H. & GESSAIN A. 1988. Concomitant infection by human herpesvirus 6, HTLV-I, and HIV-2. *Lancet*, 1, 712.
- AHLQVIST J., FOTHERINGHAM J., AKHYANI N., YAO K., FOGDELL-HAHN A. & JACOBSON S. 2005. Differential tropism of human herpesvirus 6 (HHV-6) variants and induction of latency by HHV-6A in oligodendrocytes. *J Neurovirol*, 11, 384-94.
- AIHARA M., SUGITA Y., TAKAHASHI S., NAGATANI T., ARATA S., TAKEUCHI K. & IKEZAWA Z. 2001. Anticonvulsant hypersensitivity syndrome associated with reactivation of cytomegalovirus. *Br J Dermatol*, 144, 1231-4.
- ALAIN S., COTIN S. & HANTZ S. 2009. Résistance du Cytomégalovirus aux antiviraux. *Virologie*, 13, 215-22.
- ALBRIGHT A. V., LAVI E., BLACK J. B., GOLDBERG S., O'CONNOR M. J. & GONZALEZ-SCARANO F. 1998. The effect of human herpesvirus-6 (HHV-6) on cultured human neural cells: oligodendrocytes and microglia. *J Neurovirol*, 4, 486-94.
- AMIRIAN E. S. & SCHEURER M. E. 2012. Chromosomally-integrated human herpesvirus 6 in familial glioma etiology. *Med Hypotheses*, 79, 193-6.
- ANDERSON L., HENDERSON C. & ADACHI Y. 2001. Phosphorylation and rapid relocalization of 53BP1 to nuclear foci upon DNA damage. *Mol Cell Biol*, 21, 1719-29.
- ANDRE-GARNIER E., ROBILLARD N., COSTA-MATTIOLI M., BESSE B., BILLAUDEL S. & IMBERT-MARCILLE B. M. 2003. A one-step RT-PCR and a flow cytometry method as two specific tools for direct evaluation of human herpesvirus-6 replication. *J Virol Methods*, 108, 213-22.
- ANSARI A. & 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.
- ARAT N. O. & GRIFFITH J. D. 2012. Human Rap1 interacts directly with telomeric DNA and regulates TRF2 localization at the telomere. *J Biol Chem*, 287, 41583-94.
- ARBUCKLE J. H., MEDVECZKY M. M., LUKA J., HADLEY S. H., LUEGMAYR A., ABLASHI D., LUND T. C., TOLAR J., DE MEIRLEIR K., MONTOYA J. G., KOMAROFF A. L., AMBROS P. F. & MEDVECZKY P. G. 2010. The latent human herpesvirus-6A genome specifically integrates in telomeres of human chromosomes in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 5563-8.
- ARBUCKLE J. H. & MEDVECZKY P. G. 2011. The molecular biology of human herpesvirus-6 latency and telomere integration. *Microbes Infect*, 13, 731-41.
- ARBUCKLE J. H., PANTRY S. N., MEDVECZKY M. M., PRICHETT J., LOOMIS K. S., ABLASHI D. & MEDVECZKY P. G. 2013. Mapping the telomere integrated genome of human herpesvirus 6A and 6B. *Virology*, 442, 3-11.

- ARENA A., LIBERTO M. C., CAPOZZA A. B. & FOCA A. 1997. Productive HHV-6 infection in differentiated U937 cells: role of TNF alpha in regulation of HHV-6. *New Microbiol*, 20, 13-20.
- ARENA A., LIBERTO M. C., IANNELLO D., CAPOZZA A. B. & FOCA A. 1999. Altered cytokine production after human herpes virus type 6 infection. *New Microbiol*, 22, 293-300.
- ASANO Y., YOSHIKAWA T., SUGA S., KOBAYASHI I., NAKASHIMA T., YAZAKI T., KAJITA Y. & OZAKI T. 1994. Clinical features of infants with primary human herpesvirus 6 infection (exanthem subitum, roseola infantum). *Pediatrics*, 93, 104-8.
- ASANO Y., YOSHIKAWA T., SUGA S., YAZAKI T., KONDO K. & YAMANISHI K. 1990. Fatal fulminant hepatitis in an infant with human herpesvirus-6 infection. *Lancet*, 335, 862-3.
- AUBIN J. T., POIREL L., AGUT H., HURAUX J. M., BIGNOZZI C., BROSSARD Y., MULLIEZ N., ROUME J., LECURU F. & TAURELLE R. 1992. Intrauterine transmission of human herpesvirus 6. *Lancet*, 340, 482-3.
- AZZALIN C. M., REICHENBACH P., KHORIAULI L., GIULOTTO E. & LINGNER J. 2007. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science*, 318, 798-801.
- BADIE C., DZIWURA S., RAFFY C., TSIGANI T., ALSBEIH G., MOODY J., FINNON P., LEVINE E., SCOTT D. & BOUFFLER S. 2008. Aberrant CDKN1A transcriptional response associates with abnormal sensitivity to radiation treatment. *Br J Cancer*, 98, 1845-51.
- BADIE C., KABACIK S., BALAGURUNATHAN Y., BERNARD N., BRENGUES M., FAGGIONI G., GREITHER R., LISTA F., PEINNEQUIN A., POYOT T., HERODIN F., MISSEL A., TERBRUEGGEN B., ZENHAUSERN F., ROTHKAMM K., MEINEKE V., BRASELMANN H., BEINKE C. & ABEND M. 2013. Laboratory intercomparison of gene expression assays. *Radiat Res*, 180, 138-48.
- BAIRD D. M., ROWSON J., WYNFORD-THOMAS D. & KIPLING D. 2003. Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells. *Nat Genet*, 33, 203-7.
- BALACHANDRAN N., AMELSE R. E., ZHOU W. W. & CHANG C. K. 1989. Identification of proteins specific for human herpesvirus 6-infected human T cells. *J Virol*, 63, 2835-40.
- BARONE S. R., KAPLAN M. H. & KRILOV L. R. 1995. Human herpesvirus-6 infection in children with first febrile seizures. *J Pediatr*, 127, 95-7.
- BERG J. M. 1992. Sp1 and the subfamily of zinc finger proteins with guanine-rich binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 11109-10.
- BERNS K. I. & GIRAUD C. 1996. Biology of adeno-associated virus. *Curr Top Microbiol Immunol*, 218, 1-23.
- BHANUSHALI M. J., KRANICK S. M., FREEMAN A. F., CUELLAR-RODRIGUEZ J. M., BATTIWALLA M., GEABANACLOCHE J. C., HICKSTEIN D. D., PAVLETIC S., FAHLE G. & NATH A. 2013. Human herpes 6 virus encephalitis complicating allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Neurology*, 80, 1494-500.
- BIBERFELD P., KRAMARSKY B., SALAHUDDIN S. Z. & GALLO R. C. 1987. Ultrastructural characterization of a new human B lymphotropic DNA virus (human herpesvirus 6) isolated from patients with lymphoproliferative disease. *J Natl Cancer Inst*, 79, 933-41.
- BIRNBAUM T., PADOVAN C. S., SPORER B., RUPPRECHT T. A., AUSSERER H., JAEGER G. & PFISTER H. W. 2005. Severe meningoencephalitis caused by human herpesvirus 6 type B in an immunocompetent woman treated with ganciclovir. *Clin Infect Dis*, 40, 887-9.
- BLACK J. B., LOPEZ C. & PELLETT P. E. 1992. Induction of host cell protein synthesis by human herpesvirus 6. *Virus Res*, 22, 13-23.
- BLACKBURN E. H. & GALL J. G. 1978. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol*, 120, 33-53.

- BLASCO M. A. 2003. Mammalian telomeres and telomerase: why they matter for cancer and aging. *Eur J Cell Biol*, 82, 441-6.
- BOARDMAN L. A., JOHNSON R. A., VIKER K. B., HAFNER K. A., JENKINS R. B., RIEGERT-JOHNSON D. L., SMYRK T. C., LITZELMAN K., SEO S., GANGNON R. E., ENGELMAN C. D., RIDER D. N., VANDERBOOM R. J., THIBODEAU S. N., PETERSEN G. M. & SKINNER H. G. 2013. Correlation of chromosomal instability, telomere length and telomere maintenance in microsatellite stable rectal cancer: a molecular subclass of rectal cancer. *PLoS One*, 8, e80015.
- BOCQUET H., BAGOT M. & ROUJEAU J. C. 1996. Drug-induced pseudolymphoma and drug hypersensitivity syndrome (Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms: DRESS). *Semin Cutan Med Surg*, 15, 250-7.
- BODNAR A. G., OUELLETTE M., FROLKIS M., HOLT S. E., CHIU C. P., MORIN G. B., HARLEY C. B., SHAY J. W., LICHTSTEINER S. & WRIGHT W. E. 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, 279, 349-52.
- BONNAFOUS P., BOGAERT S., GODET A. N. & AGUT H. 2013. HDP-CDV as an alternative for treatment of human herpesvirus-6 infections. *J Clin Virol*, 56, 175-6.
- BRAUN D. K., DOMINGUEZ G. & PELLETT P. E. 1997. Human herpesvirus 6. *Clin Microbiol Rev*, 10, 521-67.
- BROWN A. C., BAIGENT S. J., SMITH L. P., CHATTOO J. P., PETHERBRIDGE L. J., HAWES P., ALLDAY M. J. & NAIR V. 2006. Interaction of MEQ protein and C-terminal-binding protein is critical for induction of lymphomas by Marek's disease virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 1687-92.
- BRYAN T. M., ENGLEZOU A., DALLA-POZZA L., DUNHAM M. A. & REDDEL R. R. 1997. Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med*, 3, 1271-4.
- BRYAN T. M., ENGLEZOU A., GUPTA J., BACCHETTI S. & REDDEL R. R. 1995. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *Embo j*, 14, 4240-8.
- BUDANOV A. V. & KARIN M. 2008. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell*, 134, 451-60.
- CACOUB P., MUsETTE P., DESCAMPS V., MEYER O., SPEIRS C., FINZI L. & ROUJEAU J. C. 2011. The DRESS syndrome: a literature review. *Am J Med*, 124, 588-97.
- CALLOT V., ROUJEAU J. C., BAGOT M., WECHSLER J., CHOSIDOW O., SOUTEYRAND P., MOREL P., DUBERTRET L., AVRIL M. F. & REVUZ J. 1996. Drug-induced pseudolymphoma and hypersensitivity syndrome. Two different clinical entities. *Arch Dermatol*, 132, 1315-21.
- CARTEAU S., HOFFMANN C. & BUSHMAN F. 1998. Chromosome structure and human immunodeficiency virus type 1 cDNA integration: centromeric alphoid repeats are a disfavored target. *J Virol*, 72, 4005-14.
- CASELLI E., BRACCI A., GALVAN M., BONI M., ROTOLA A., BERGAMINI C., CERMELLI C., DAL MONTE P., GOMPELS U. A., CASSAI E. & DI LUCA D. 2006. Human herpesvirus 6 (HHV-6) U94/REP protein inhibits betaherpesvirus replication. *Virology*, 346, 402-14.
- CASERTA M. T., HALL C. B., SCHNABEL K., LOFTHUS G., MARINO A., SHELLEY L., YOO C., CARNAHAN J., ANDERSON L. & WANG H. 2010. Diagnostic assays for active infection with human herpesvirus 6 (HHV-6). *J Clin Virol*, 48, 55-7.
- CASERTA M. T., HALL C. B., SCHNABEL K., MCINTYRE K., LONG C., COSTANZO M., DEWHURST S., INSEL R. & EPSTEIN L. G. 1994. Neuroinvasion and persistence of human herpesvirus 6 in children. *J Infect Dis*, 170, 1586-9.
- CELESTE A., FERNANDEZ-CAPETILLO O., KRUIHLAK M. J., PILCH D. R., STAUDT D. W., LEE A., BONNER R. F., BONNER W. M. & NUSSENZWEIG A. 2003. Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol*, 5, 675-9.

- CERONE M. A., LONDONO-VALLEJO J. A. & BACCHETTI S. 2001. Telomere maintenance by telomerase and by recombination can coexist in human cells. *Hum Mol Genet*, 10, 1945-52.
- CESARE A. J. & REDDEL R. R. 2008. Telomere uncapping and alternative lengthening of telomeres. *Mech Ageing Dev*, 129, 99-108.
- CESARE A. J. & REDDEL R. R. 2010. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat Rev Genet*, 11, 319-30.
- CHAIKEN B. H., GOLDBERG B. I. & SEGAL J. P. 1950. Dilantin sensitivity; report of a case of hepatitis with jaundice, pyrexia and exfoliative dermatitis. *N Engl J Med*, 242, 897-8.
- CHALLONER P. B., SMITH K. T., PARKER J. D., MACLEOD D. L., COULTER S. N., ROSE T. M., SCHULTZ E. R., BENNETT J. L., GARBER R. L., CHANG M. & ET AL. 1995. Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 7440-4.
- CHAN S. R. & BLACKBURN E. H. 2004. Telomeres and telomerase. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 359, 109-21.
- CHEN M., POPESCU N., WOODWORTH C., BERNEMAN Z., CORBELLINO M., LUSSO P., ABLASHI D. V. & DIPAOLO J. A. 1994. Human herpesvirus 6 infects cervical epithelial cells and transactivates human papillomavirus gene expression. *J Virol*, 68, 1173-8.
- CHI J., GU B., ZHANG C., PENG G., ZHOU F., CHEN Y., ZHANG G., GUO Y., GUO D., QIN J., WANG J., LI L., WANG F., LIU G., XIE F., FENG D., ZHOU H., HUANG X., LU S., LIU Y., HU W. & YAO K. 2012. Human herpesvirus 6 latent infection in patients with glioma. *J Infect Dis*, 206, 1394-8.
- CHIN L., ARTANDI S. E., SHEN Q., TAM A., LEE S. L., GOTTLIEB G. J., GREIDER C. W. & DEPINHO R. A. 1999. p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell*, 97, 527-38.
- CHIOU C. C., YANG L. C., HUNG S. I., CHANG Y. C., KUO T. T., HO H. C., HU S., HONG H. S. & CHUNG W. H. 2008. Clinicopathological features and prognosis of drug rash with eosinophilia and systemic symptoms: a study of 30 cases in Taiwan. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 22, 1044-9.
- CIESLA S. L., TRAHAN J., WAN W. B., BEADLE J. R., ALDERN K. A., PAINTER G. R. & HOSTETLER K. Y. 2003. Esterification of cidofovir with alkoxyalkanols increases oral bioavailability and diminishes drug accumulation in kidney. *Antiviral Res*, 59, 163-71.
- CIHLAR T. & CHEN M. S. 1996. Identification of enzymes catalyzing two-step phosphorylation of cidofovir and the effect of cytomegalovirus infection on their activities in host cells. *Mol Pharmacol*, 50, 1502-10.
- CLARK D. A. 2000. Human herpesvirus 6. *Rev Med Virol*, 10, 155-73.
- CLARK D. A., NACHEVA E. P., LEONG H. N., BRAZMA D., LI Y. T., TSAO E. H., BUYCK H. C., ATKINSON C. E., LAWSON H. M., POTTER M. N. & GRIFFITHS P. D. 2006. Transmission of integrated human herpesvirus 6 through stem cell transplantation: implications for laboratory diagnosis. *J Infect Dis*, 193, 912-6.
- CLARK D. A. & WARD K. N. 2008. Importance of chromosomally integrated HHV-6A and -6B in the diagnosis of active HHV-6 infection. *Herpes*, 15, 28-32.
- CMIELOVA J. & REZACOVA M. 2011. p21Cip1/Waf1 protein and its function based on a subcellular localization [corrected]. *J Cell Biochem*, 112, 3502-6.
- COLLOT S., PETIT B., BORDESSOULE D., ALAIN S., TOUATI M., DENIS F. & RANGER-ROGEZ S. 2002. Real-time PCR for quantification of human herpesvirus 6 DNA from lymph nodes and saliva. *J Clin Microbiol*, 40, 2445-51.
- CONE R. W., HACKMAN R. C., HUANG M. L., BOWDEN R. A., MEYERS J. D., METCALF M., ZEH J., ASHLEY R. & COREY L. 1993. 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., COREY L., ZEH J., ASHLEY R. & BOWDEN R. 1999. Human herpesvirus 6 infections after bone marrow transplantation: clinical and virologic manifestations. *J Infect Dis*, 179, 311-8.
- CORDEL N., LENORMAND B., COURVILLE P. & JOLY P. 2004. [Study of the clonality of cutaneous and blood lymphocytes during drug-induced hypersensitivity in 6 patients]. *Ann Dermatol Venereol*, 131, 1059-61.
- CORTI M., VILLAFANE M. F., TRIONE N., MAMANNA L. & BOUZAS B. 2011. Human herpesvirus 6: report of emerging pathogen in five patients with HIV/AIDS and review of the literature. *Rev Soc Bras Med Trop*, 44, 522-5.
- COUNTER C. M., MEYERSON M., EATON E. N. & WEINBERG R. A. 1997. The catalytic subunit of yeast telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 9202-7.
- CRAWFORD J. R., SANTI M. R., CORNELISON R., SALLINEN S. L., HAAPASALO H. & MACDONALD T. J. 2009. Detection of human herpesvirus-6 in adult central nervous system tumors: predominance of early and late viral antigens in glial tumors. *J Neurooncol*, 95, 49-60.
- CSIRE M., MIKALA G., JAKO J., MASSZI T., JANOSI J., DOLGOS J., FULE T., TORDAI A., BERENCSI G. & VALYI-NAGY I. 2007. Persistent long-term human herpesvirus 6 (HHV-6) infection in a patient with langerhans cell histiocytosis. *Pathol Oncol Res*, 13, 157-60.
- CUOMO L., TRIVEDI P., CARDILLO M. R., GAGLIARDI F. M., VECCHIONE A., CARUSO R., CALOGERO A., FRATI L., FAGGIONI A. & RAGONA G. 2001. Human herpesvirus 6 infection in neoplastic and normal brain tissue. *J Med Virol*, 63, 45-51.
- DAIBATA M., HATAKEYAMA N., KAMIOKA M., NEMOTO Y., HIROI M., MIYOSHI I. & 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. & MIYOSHI I. 1999. Inheritance of chromosomally integrated human herpesvirus 6 DNA. *Blood*, 94, 1545-9.
- DAIBATA M., TAGUCHI T., SAWADA T., TAGUCHI H. & MIYOSHI I. 1998. Chromosomal transmission of human herpesvirus 6 DNA in acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, 352, 543-4.
- DE ALMEIDA RODRIGUES G., NAGENDRA S., LEE C. K. & DE MAGALHAES-SILVERMAN M. 1999. Human herpes virus 6 fatal encephalitis in a bone marrow recipient. *Scand J Infect Dis*, 31, 313-5.
- DE BOLLE L., ANDREI G., SNOECK R., ZHANG Y., VAN LOMMEL A., OTTO M., BOUSSEAU A., ROY C., DE CLERCQ E. & NAESENS L. 2004. Potent, selective and cell-mediated inhibition of human herpesvirus 6 at an early stage of viral replication by the non-nucleoside compound CMV423. *Biochem Pharmacol*, 67, 325-36.
- DE BOLLE L., NAESENS L. & DE CLERCQ E. 2005. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clin Microbiol Rev*, 18, 217-45.
- DE CLERCQ E., NAESENS L., DE BOLLE L., SCHOLS D., ZHANG Y. & NEYTS J. 2001. Antiviral agents active against human herpesviruses HHV-6, HHV-7 and HHV-8. *Rev Med Virol*, 11, 381-95.
- DE LANGE T. 2005. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev*, 19, 2100-10.
- DE PAGTER P. J., VIRGILI A., NACHEVA E., VAN BAARLE D., SCHUURMAN R. & BOELEN J. J. 2010. Chromosomally integrated human herpesvirus 6: transmission via cord blood-derived unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 16, 130-2.
- DELBRIDGE M. S., KARIM M. S., SHRESTHA B. M. & MCKANE W. 2006. Colitis in a renal transplant patient with human herpesvirus-6 infection. *Transpl Infect Dis*, 8, 226-8.

- DERAY G., MARTINEZ F., KATLAMA C., LEVALTIER B., BEAUFILS H., DANIS M., ROZENHEIM M., BAUMELOU A., DOHIN E., GENTILINI M. & ET AL. 1989. Foscarnet nephrotoxicity: mechanism, incidence and prevention. *Am J Nephrol*, 9, 316-21.
- DESCAMPS V., BOUSCARAT F., LAGLENNE S., ASLANGUL E., VEBER B., DESCAMPS D., SARAUX J. L., GRANGE M. J., GROSSIN M., NAVRATIL E., CRICKX B. & BELAICH S. 1997. Human herpesvirus 6 infection associated with anticonvulsant hypersensitivity syndrome and reactive haemophagocytic syndrome. *Br J Dermatol*, 137, 605-8.
- DESCAMPS V., MAHE E., HOUBOU N., ABRAMOWITZ L., ROZENBERG F., RANGER-ROGEZ S. & CRICKX B. 2003. Drug-induced hypersensitivity syndrome associated with Epstein-Barr virus infection. *Br J Dermatol*, 148, 1032-4.
- DESCAMPS V., MARDIVIRIN L. & RANGER-ROGEZ S. 2008. Chromosomal integration of human herpesvirus 6 DNA in anticonvulsant hypersensitivity syndrome: a unique opportunity for the understanding of their relation. *Br J Dermatol*, 159, 759.
- DESCAMPS V., VALANCE A., EDLINGER C., FILLET A. M., GROSSIN M., LEBRUN-VIGNES B., BELAICH S. & CRICKX B. 2001. Association of human herpesvirus 6 infection with drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms. *Arch Dermatol*, 137, 301-4.
- DEWHURST S., MCINTYRE K., SCHNABEL K. & HALL C. B. 1993. Human herpesvirus 6 (HHV-6) variant B accounts for the majority of symptomatic primary HHV-6 infections in a population of U.S. infants. *J Clin Microbiol*, 31, 416-8.
- DHEPAKSON P., MORI Y., JIANG Y. B., HUANG H. L., AKKAPAIBOON P., OKUNO T. & YAMANISHI K. 2002. Human herpesvirus-6 rep/U94 gene product has single-stranded DNA-binding activity. *J Gen Virol*, 83, 847-54.
- DI LUCA D., KATSAFANAS G., SCHIRMER E. C., BALACHANDRAN N. & FRENKEL N. 1990. The replication of viral and cellular DNA in human herpesvirus 6-infected cells. *Virology*, 175, 199-210.
- DOMINGUEZ G., DAMBAUGH T. R., STAMEY F. R., DEWHURST S., INOUE N. & PELLETT P. E. 1999. Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A. *J Virol*, 73, 8040-52.
- DONATI D., AKHYANI N., FOGDELL-HAHN A., CERMELLI C., CASSIANI-INGONI R., VORTMEYER A., HEISS J. D., COGEN P., GAILLARD W. D., SATO S., THEODORE W. H. & JACOBSON S. 2003. Detection of human herpesvirus-6 in mesial temporal lobe epilepsy surgical brain resections. *Neurology*, 61, 1405-11.
- DOWNING R. G., SEWANKAMBO N., SERWADDA D., HONESS R., CRAWFORD D., JARRETT R. & GRIFFIN B. E. 1987. Isolation of human lymphotropic herpesviruses from Uganda. *Lancet*, 2, 390.
- DROBYSKI W. R., KNOX K. K., MAJEWSKI D. & CARRIGAN D. R. 1994. Brief report: fatal encephalitis due to variant B human herpesvirus-6 infection in a bone marrow-transplant recipient. *N Engl J Med*, 330, 1356-60.
- DUNHAM M. A., NEUMANN A. A., FASCHING C. L. & REDDEL R. R. 2000. Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet*, 26, 447-50.
- ELZAGALLAAI A. A., KNOWLES S. R., RIEDER M. J., BEND J. R., SHEAR N. H. & KOREN G. 2009. Patch testing for the diagnosis of anticonvulsant hypersensitivity syndrome: a systematic review. *Drug Saf*, 32, 391-408.
- 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. & 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.

- ENSOLI B., LUSSO P., SCHACHTER F., JOSEPHS S. F., RAPPAPORT J., NEGRO F., GALLO R. C. & WONG-STAAAL F. 1989. Human herpes virus-6 increases HIV-1 expression in co-infected T cells via nuclear factors binding to the HIV-1 enhancer. *Embo j*, 8, 3019-27.
- FENG J., FUNK W. D., WANG S. S., WEINRICH S. L., AVILION A. A., CHIU C. P., ADAMS R. R., CHANG E., ALLSOPP R. C., YU J. & ET AL. 1995. The RNA component of human telomerase. *Science*, 269, 1236-41.
- FLAMAND L., GOSSELIN J., D'ADDARIO M., HISCOTT J., ABLASHI D. V., GALLO R. C. & MENEZES J. 1991. Human herpesvirus 6 induces interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha, but not interleukin-6, in peripheral blood mononuclear cell cultures. *J Virol*, 65, 5105-10.
- FLAMAND L., GOSSELIN J., STEFANESCU I., ABLASHI D. & MENEZES J. 1995. Immunosuppressive effect of human herpesvirus 6 on T-cell functions: suppression of interleukin-2 synthesis and cell proliferation. *Blood*, 85, 1263-71.
- FOREST F., DUBAND S., PILLET S., STACHOWICZ M. L., CORNILLON J., DUMOLLARD J. M. & PEOC'H M. 2011. Lethal human herpesvirus-6 encephalitis after cord blood transplant. *Transpl Infect Dis*, 13, 646-9.
- FOTHERINGHAM J., DONATI D., AKHYANI N., FOGDELL-HAHN A., VORTMEYER A., HEISS J. D., WILLIAMS E., WEINSTEIN S., BRUCE D. A., GAILLARD W. D., SATO S., THEODORE W. H. & JACOBSON S. 2007. Association of human herpesvirus-6B with mesial temporal lobe epilepsy. *PLoS Med*, 4, e180.
- FOTHERINGHAM J., WILLIAMS E. L., AKHYANI N. & JACOBSON S. 2008. Human herpesvirus 6 (HHV-6) induces dysregulation of glutamate uptake and transporter expression in astrocytes. *J Neuroimmune Pharmacol*, 3, 105-16.
- FOUCHE N., CESARE A. J., WILLCOX S., OZGUR S., COMPTON S. A. & GRIFFITH J. D. 2006. The basic domain of TRF2 directs binding to DNA junctions irrespective of the presence of TTAGGG repeats. *J Biol Chem*, 281, 37486-95.
- FOX J. D., BRIGGS M., WARD P. A. & TEDDER R. S. 1990. Human herpesvirus 6 in salivary glands. *Lancet*, 336, 590-3.
- FURLINI G., VIGNOLI M., RAMAZZOTTI E., RE M. C., VISANI G. & LA P. 1996. A concurrent human herpesvirus-6 infection renders two human hematopoietic progenitor (TF-1 and KG-1) cell lines susceptible to human immunodeficiency virus type-1. *Blood*, 87, 4737-45.
- GALLOIS-MONTBRUN S., SCHNEIDER B., CHEN Y., GIACOMONI-FERNANDES V., MULARD L., MORERA S., JANIN J., DEVILLE-BONNE D. & VERON M. 2002. Improving nucleoside diphosphate kinase for antiviral nucleotide analogs activation. *J Biol Chem*, 277, 39953-9.
- GANDHI M. K. & KHANNA R. 2004. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *Lancet Infect Dis*, 4, 725-38.
- GAO X., IKUTA K., TAJIMA M. & SAIRENJI T. 2001. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induces Epstein-Barr virus reactivation via NF-kappaB and AP-1 as regulated by protein kinase C and mitogen-activated protein kinase. *Virology*, 286, 91-9.
- GARDELL J. L., DAZIN P., ISLAR J., MENGE T., GENAIN C. P. & LALIVE P. H. 2006. Apoptotic effects of Human Herpesvirus-6A on glia and neurons as potential triggers for central nervous system autoimmunity. *J Clin Virol*, 37 Suppl 1, S11-6.
- GARDELLA T., MEDVECZKY P., SAIRENJI T. & MULDER C. 1984. Detection of circular and linear herpesvirus DNA molecules in mammalian cells by gel electrophoresis. *J Virol*, 50, 248-54.
- GENTILE I., TALAMO M. & BORGIA G. 2010. Is the drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS) due to human herpesvirus 6 infection or to allergy-mediated viral reactivation? Report of a case and literature review. *BMC Infect Dis*, 10, 49.

- GOEDHARD J. G., GALAMA J. M. & 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. & MACAULAY H. A. 1995. The DNA sequence of human herpesvirus-6: structure, coding content, and genome evolution. *Virology*, 209, 29-51.
- GORLIN J. B. & FERRY J. A. 1996. *A seven-year old boy with fever, lymphadenopathy, hepatosplenomegaly, and prominent eosinophilia*, Waltham, MA, ETATS-UNIS, Massachusetts Medical Society.
- GRAVEL A., HALL C. B. & FLAMAND L. 2013. Sequence analysis of transplacentally acquired human herpesvirus 6 DNA is consistent with transmission of a chromosomally integrated reactivated virus. *J Infect Dis*, 207, 1585-9.
- GREENBERG R. A., CHIN L., FEMINO A., LEE K. H., GOTTLIEB G. J., SINGER R. H., GREIDER C. W. & DEPINHO R. A. 1999. Short dysfunctional telomeres impair tumorigenesis in the INK4a(delta2/3) cancer-prone mouse. *Cell*, 97, 515-25.
- GREIDER C. W. & BLACKBURN E. H. 1985. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*, 43, 405-13.
- GREIDER C. W. & BLACKBURN E. H. 1989. A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature*, 337, 331-7.
- GRIFFITH J. D., COMEAU L., ROSENFELD S., STANSEL R. M., BIANCHI A., MOSS H. & DE LANGE T. 1999. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*, 97, 503-14.
- GRIVEL J. C., SANTORO F., CHEN S., FAGA G., MALNATI M. S., ITO Y., MARGOLIS L. & LUSSO P. 2003. Pathogenic effects of human herpesvirus 6 in human lymphoid tissue ex vivo. *J Virol*, 77, 8280-9.
- GROBELNY J. V., KULP-MCELIECE M. & BROCCOLI D. 2001. Effects of reconstitution of telomerase activity on telomere maintenance by the alternative lengthening of telomeres (ALT) pathway. *Hum Mol Genet*, 10, 1953-61.
- GRUHNE B., SOMPALLAE R., MARESCOTTI D., KAMRANVAR S. A., GASTALDELLO S. & MASUCCI M. G. 2009. The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 promotes genomic instability via induction of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 2313-8.
- GU B., ZHANG G. F., LI L. Y., ZHOU F., FENG D. J., DING C. L., CHI J., ZHANG C., GUO D. D., WANG J. F., ZHOU H., YAO K. & HU W. X. 2011. Human herpesvirus 6A induces apoptosis of primary human fetal astrocytes via both caspase-dependent and -independent pathways. *Virology*, 427, 530.
- GUBERMAN A. H., BESAG F. M., BRODIE M. J., DOOLEY J. M., DUCHOWNY M. S., PELLOCK J. M., RICHENS A., STERN R. S. & TREVATHAN E. 1999. Lamotrigine-associated rash: risk/benefit considerations in adults and children. *Epilepsia*, 40, 985-91.
- HACKETT J. A., FELDSER D. M. & GREIDER C. W. 2001. Telomere dysfunction increases mutation rate and genomic instability. *Cell*, 106, 275-86.
- HAKACOVA N., KLINGEL K., KANDOLF R., ENGDAHL E., FOGDELL-HAHN A. & HIGGINS T. 2013. First therapeutic use of Artesunate in treatment of human herpesvirus 6B myocarditis in a child. *J Clin Virol*, 57, 157-60.
- HALL C. B., CASERTA M. T., SCHNABEL K., SHELLEY L. M., MARINO A. S., CARNAHAN J. A., YOO C., LOFTHUS G. K. & MCDERMOTT M. P. 2008. Chromosomal integration of human herpesvirus 6 is the major mode of congenital human herpesvirus 6 infection. *Pediatrics*, 122, 513-20.
- HALL C. B., CASERTA M. T., SCHNABEL K. C., BOETRICH C., MCDERMOTT M. P., LOFTHUS G. K., CARNAHAN J. A. & DEWHURST S. 2004. Congenital infections with human herpesvirus 6 (HHV6) and human herpesvirus 7 (HHV7). *J Pediatr*, 145, 472-7.

- HALL C. B., CASERTA M. T., SCHNABEL K. C., LONG C., EPSTEIN L. G., INSEL R. A. & 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., CASERTA M. T., SCHNABEL K. C., SHELLEY L. M., CARNAHAN J. A., MARINO A. S., YOO C. & LOFTHUS G. K. 2010. Transplacental congenital human herpesvirus 6 infection caused by maternal chromosomally integrated virus. *J Infect Dis*, 201, 505-7.
- 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. & EPSTEIN L. G. 1994. Human herpesvirus-6 infection in children. A prospective study of complications and reactivation. *N Engl J Med*, 331, 432-8.
- HAN J., QURESHI A. A., PRESCOTT J., GUO Q., YE L., HUNTER D. J. & DE VIVO I. 2009. A prospective study of telomere length and the risk of skin cancer. *J Invest Dermatol*, 129, 415-21.
- HANDE P., SLIJEPCEVIC P., SILVER A., BOUFFLER S., VAN BUUL P., BRYANT P. & LANSDORP P. 1999. Elongated telomeres in scid mice. *Genomics*, 56, 221-3.
- HARLEY C. B. 1997. Human ageing and telomeres. *Ciba Found Symp*, 211, 129-39; discussion 139-44.
- HARUDA F. 1979. Phenytoin hypersensitivity: 38 cases. *Neurology*, 29, 1480-5.
- HASHIMOTO H., MARUYAMA H., FUJIMOTO K., SAKAKURA T., SEISHU S. & OKUDA N. 2002. Hematologic findings associated with thrombocytopenia during the acute phase of exanthem subitum confirmed by primary human herpesvirus-6 infection. *J Pediatr Hematol Oncol*, 24, 211-4.
- HASHIZUME H. & TAKIGAWA M. 2005. Drug-induced hypersensitivity syndrome associated with cytomegalovirus reactivation: immunological characterization of pathogenic T cells. *Acta Derm Venereol*, 85, 47-50.
- HASHIZUME H., TAKIGAWA M. & TOKURA Y. 2002. Characterization of drug-specific T cells in phenobarbital-induced eruption. *J Immunol*, 168, 5359-68.
- HERMONAT P. L., LABOW M. A., WRIGHT R., BERNS K. I. & MUZYCZKA N. 1984. Genetics of adeno-associated virus: isolation and preliminary characterization of adeno-associated virus type 2 mutants. *J Virol*, 51, 329-39.
- HERMOUET S. & MINVIELLE S. 2000. Inheritance of chromosomally integrated viral DNA? *Blood*, 95, 1108-9.
- HINDSON B. J., NESS K. D., MASQUELIER D. A., BELGRADER P., HEREDIA N. J., MAKAREWICZ A. J., BRIGHT I. J., LUCERO M. Y., HIDDESEN A. L., LEGLER T. C., KITANO T. K., HODEL M. R., PETERSEN J. F., WYATT P. W., STEENBLOCK E. R., SHAH P. H., BOUSSE L. J., TROUP C. B., MELLEN J. C., WITTMANN D. K., ERNDT N. G., CAULEY T. H., KOEHLER R. T., SO A. P., DUBE S., ROSE K. A., MONTESCLAROS L., WANG S., STUMBO D. P., HODGES S. P., ROMINE S., MILANOVICH F. P., WHITE H. E., REGAN J. F., KARLIN-NEUMANN G. A., HINDSON C. M., SAXONOV S. & COLSTON B. W. 2011. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem*, 83, 8604-10.
- HOWIE H. L., KATZENELLENBOGEN R. A. & GALLOWAY D. A. 2009. Papillomavirus E6 proteins. *Virology*, 384, 324-34.
- HUANG Y., HIDALGO-BRAVO A., ZHANG E., COTTON V. E., MENDEZ-BERMUDEZ A., WIG G., MEDINA-CALZADA Z., NEUMANN R., JEFFREYS A. J., WINNEY B., WILSON J. F., CLARK D. A., DYER M. J. & ROYLE N. J. 2013. Human telomeres that carry an integrated copy of human herpesvirus 6 are often short and unstable, facilitating release of the viral genome from the chromosome. *Nucleic Acids Research*.
- HUBACEK P., MAALOUF J., ZAJICKOVA M., KOUBA M., CINEK O., HYNCOVA K., FALES I. & CETKOVSKY P. 2007. Failure of multiple antivirals to affect high HHV-6 DNAemia resulting from viral chromosomal integration in case of severe aplastic anaemia. *Haematologica*, 92, e98-e100.

- HUBACEK P., MUZIKOVA K., HRDLICKOVA A., CINEK O., HYNČICOVA K., HRSTKOVA H., SEDLACEK P. & STARY J. 2009a. Prevalence of HHV-6 integrated chromosomally among children treated for acute lymphoblastic or myeloid leukemia in the Czech Republic. *J Med Virol*, 81, 258-63.
- HUBACEK P., VIRGILI A., WARD K. N., POHLREICH D., KESLOVA P., GOLDOVA B., MARKOVA M., ZAJAC M., CINEK O., NACHEVA E. P., SEDLACEK P. & CETKOVSKY P. 2009b. HHV-6 DNA throughout the tissues of two stem cell transplant patients with chromosomally integrated HHV-6 and fatal CMV pneumonitis. *Br J Haematol*, 145, 394-8.
- HURWITZ L. M., HEAPHY C. M., JOSHU C. E., ISAACS W. B., KONISHI Y., DE MARZO A. M., ISAACS S. D., WILEY K. E., PLATZ E. A. & MEEKER A. K. 2013. Telomere length as a risk factor for hereditary prostate cancer. *Prostate*.
- IM D. S. & MUZYCZKA N. 1990. The AAV origin binding protein Rep68 is an ATP-dependent site-specific endonuclease with DNA helicase activity. *Cell*, 61, 447-57.
- INAOKA M. 2005. Innate immunity and hypersensitivity syndrome. *Toxicology*, 209, 161-3.
- INOUE Y., YASUKAWA M. & FUJITA S. 1997. Induction of T-cell apoptosis by human herpesvirus 6. *J Virol*, 71, 3751-9.
- ISEGAWA Y., MUKAI T., NAKANO K., KAGAWA M., CHEN J., MORI Y., SUNAGAWA T., KAWANISHI K., SASHIHARA J., HATA A., ZOU P., KOSUGE H. & YAMANISHI K. 1999. Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B. *J Virol*, 73, 8053-63.
- ISHIKAWA K., HASEGAWA K., NARITOMI T., KANAI N., OGAWA M., KATO Y., KOBAYASHI M., TORII N. & HAYASHI N. 2002. Prevalence of herpesviridae and hepatitis virus sequences in the livers of patients with fulminant hepatitis of unknown etiology in Japan. *J Gastroenterol*, 37, 523-30.
- JEULIN H., SALMON A., GAUTHERET-DEJEAN A., AGUT H., BORDIGONI P., FORTIER B. & VENARD V. 2009. Contribution of human herpesvirus 6 (HHV-6) viral load in whole blood and serum to investigate integrated HHV-6 transmission after haematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Virol*, 45, 43-6.
- JOSEPHS S. F., SALAHUDDIN S. Z., ABLASHI D. V., SCHACHTER F., WONG-STAAAL F. & GALLO R. C. 1986. Genomic analysis of the human B-lymphotropic virus (HBLV). *Science*, 234, 601-3.
- KAMBLE R. T., CLARK D. A., LEONG H. N., HESLOP H. E., BRENNER M. K. & CARRUM G. 2007. Transmission of integrated human herpesvirus-6 in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 40, 563-6.
- KAMRANVAR S. A. & MASUCCI M. G. 2011. The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 promotes telomere dysfunction via induction of oxidative stress. *Leukemia*, 25, 1017-25.
- KANO Y., HIRAHARAS K., SAKUMA K. & SHIOHARA T. 2006. Several herpesviruses can reactivate in a severe drug-induced multiorgan reaction in the same sequential order as in graft-versus-host disease. *Br J Dermatol*, 155, 301-6.
- KANO Y., INAOKA M. & SHIOHARA T. 2004. Association between anticonvulsant hypersensitivity syndrome and human herpesvirus 6 reactivation and hypogammaglobulinemia. *Arch Dermatol*, 140, 183-8.
- KARDAUN S. H., SIDOROFF A., VALEYRIE-ALLANORE L., HALEVY S., DAVIDOVICI B. B., MOCKENHAUPT M. & ROUJEAU J. C. 2007. Variability in the clinical pattern of cutaneous side-effects of drugs with systemic symptoms: does a DRESS syndrome really exist? *Br J Dermatol*, 156, 609-11.
- 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. & 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. & KONDO N. 2003. Acute cerebellitis in primary human herpesvirus-6 infection. *Eur J Pediatr*, 162, 801-3.
- KATZENELLENBOGEN R. A., EGELKROUT E. M., VLIET-GREGG P., GEWIN L. C., GAFKEN P. R. & GALLOWAY D. A. 2007. NFX1-123 and poly(A) binding proteins synergistically augment activation of telomerase in human papillomavirus type 16 E6-expressing cells. *J Virol*, 81, 3786-96.
- KAUFER B. B., JAROSINSKI K. W. & OSTERRIEDER N. 2011. Herpesvirus telomeric repeats facilitate genomic integration into host telomeres and mobilization of viral DNA during reactivation. *J Exp Med*, 208, 605-15.
- KAUFER B. B., TRAPP S., JAROSINSKI K. W. & OSTERRIEDER N. 2010. Herpesvirus telomerase RNA(vTR)-dependent lymphoma formation does not require interaction of vTR with telomerase reverse transcriptase (TERT). *PLoS Pathog*, 6, e1001073.
- KIDD I. M., CLARK D. A., AIT-KHALED M., GRIFFITHS P. D. & EMERY V. C. 1996. Measurement of human herpesvirus 7 load in peripheral blood and saliva of healthy subjects by quantitative polymerase chain reaction. *J Infect Dis*, 174, 396-401.
- KIM S. H., BEAUSEJOUR C., DAVALOS A. R., KAMINKER P., HEO S. J. & CAMPISI J. 2004. TIN2 mediates functions of TRF2 at human telomeres. *J Biol Chem*, 279, 43799-804.
- KIM S. H., HAN S., YOU Y. H., CHEN D. J. & CAMPISI J. 2003. The human telomere-associated protein TIN2 stimulates interactions between telomeric DNA tracts in vitro. *EMBO Rep*, 4, 685-91.
- KIM S. H., KAMINKER P. & CAMPISI J. 1999. TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat Genet*, 23, 405-12.
- KINNER A., WU W., STAUDT C. & ILIAKIS G. 2008. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res*, 36, 5678-94.
- KIRKPATRICK K. L. & MOKBEL K. 2001. The significance of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in cancer. *Eur J Surg Oncol*, 27, 754-60.
- KITO Y., ITO T., TOKURA Y. & HASHIZUME H. 2012. High-dose intravenous immunoglobulin monotherapy for drug-induced hypersensitivity syndrome. *Acta Derm Venereol*, 92, 100-1.
- KNECHT H., BRUDERLEIN S., WEGENER S., LICHTENSZTEJN D., LICHTENSZTEJN Z., LEMIEUX B., MOLLER P. & MAI S. 2010. 3D nuclear organization of telomeres in the Hodgkin cell lines U-HO1 and U-HO1-PTPN1: PTPN1 expression prevents the formation of very short telomeres including "t-stumps". *BMC Cell Biol*, 11, 99.
- KNOWLES S. R., DEWHURST N. & SHEAR N. H. 2012. Anticonvulsant hypersensitivity syndrome: an update. *Expert Opin Drug Saf*, 11, 767-78.
- KNOWLES S. R., SHAPIRO L. E. & SHEAR N. H. 1999. Anticonvulsant hypersensitivity syndrome: incidence, prevention and management. *Drug Saf*, 21, 489-501.
- KNOX K. K. & CARRIGAN D. R. 1996. Active HHV-6 infection in the lymph nodes of HIV-infected patients: in vitro evidence that HHV-6 can break HIV latency. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 11, 370-8.
- KOBAYASHI D., KOGAWA K., IMAI K., TANAKA T., HIROI S., SATOH H., TANAKA-TAYA K. & NONOYAMA S. 2011. Quantitation of human herpesvirus-6 (HHV-6) DNA in a cord blood transplant recipient with chromosomal integration of HHV-6. *Transpl Infect Dis*, 13, 650-3.
- KONDO K., KONDO T., OKUNO T., TAKAHASHI M. & YAMANISHI K. 1991. Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. *J Gen Virol*, 72 (Pt 6), 1401-8.
- KONG H., BAERBIG Q., DUNCAN L., SHEPEL N. & MAYNE M. 2003. Human herpesvirus type 6 indirectly enhances oligodendrocyte cell death. *J Neurovirol*, 9, 539-50.

- KOTIN R. M., SINISCALCO M., SAMULSKI R. J., ZHU X. D., HUNTER L., LAUGHLIN C. A., MCLAUGHLIN S., MUZYCZKA N., ROCCHI M. & BERNS K. I. 1990. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 2211-5.
- KOTTON C. N. & FISHMAN J. A. 2005. Viral infection in the renal transplant recipient. *J Am Soc Nephrol*, 16, 1758-74.
- KRUEGER G. R. & 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. & BERTRAM G. 1991. Clinical indications and diagnostic techniques of human herpesvirus-6 (HHV-6) infection. *In Vivo*, 5, 287-95.
- KRUEGER G. R., WASSERMANN K., DE CLERCK L. S., STEVENS W. J., BOURGEOIS N., ABLASHI D. V., JOSEPHS S. F. & BALACHANDRAN N. 1990. Latent herpesvirus-6 in salivary and bronchial glands. *Lancet*, 336, 1255-6.
- LABOW M. A., HERMONAT P. L. & BERNS K. I. 1986. Positive and negative autoregulation of the adeno-associated virus type 2 genome. *J Virol*, 60, 251-8.
- LACROIX A., COLLOT-TEIXEIRA S., MARDIVIRIN L., JACCARD A., PETIT B., PIGUET C., STURTZ F., PREUX P. M., BORDESSOULE D. & RANGER-ROGEZ S. 2010. Involvement of human herpesvirus-6 variant B in classic Hodgkin's lymphoma via DR7 oncoprotein. *Clin Cancer Res*, 16, 4711-21.
- LACROIX A., JACCARD A., ROUZIOUX C., PIGUET C., PETIT B., BORDESSOULE D. & RANGER-ROGEZ S. 2007. HHV-6 and EBV DNA quantitation in lymph nodes of 86 patients with Hodgkin's lymphoma. *J Med Virol*, 79, 1349-56.
- LANSDORP P. M. 1995. Telomere length and proliferation potential of hematopoietic stem cells. *J Cell Sci*, 108 (Pt 1), 1-6.
- LEE S. O., BROWN R. A., EID A. J. & RAZONABLE R. R. 2011. Chromosomally integrated human herpesvirus-6 in kidney transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant*, 26, 2391-3.
- LEE S. O., BROWN R. A. & RAZONABLE R. R. 2012. Chromosomally integrated human herpesvirus-6 in transplant recipients. *Transpl Infect Dis*, 14, 346-54.
- LEE Y. H., OH B. K., YOO J. E., YOON S. M., CHOI J., KIM K. S. & PARK Y. N. 2009. Chromosomal instability, telomere shortening, and inactivation of p21(WAF1/CIP1) in dysplastic nodules of hepatitis B virus-associated multistep hepatocarcinogenesis. *Mod Pathol*, 22, 1121-31.
- LEONG H. N., TUKE P. W., TEDDER R. S., KHANOM A. B., EGLIN R. P., ATKINSON C. E., WARD K. N., GRIFFITHS P. D. & CLARK D. A. 2007. The prevalence of chromosomally integrated human herpesvirus 6 genomes in the blood of UK blood donors. *J Med Virol*, 79, 45-51.
- LEVY J. A., FERRO F., LENNETTE E. T., OSHIRO L. & POULIN L. 1990. Characterization of a new strain of HHV-6 (HHV-6SF) recovered from the saliva of an HIV-infected individual. *Virology*, 178, 113-21.
- LI H., MENG S., LEVINE S. M., STRATTON C. W. & TANG Y. W. 2009. Sensitive, qualitative detection of human herpesvirus-6 and simultaneous differentiation of variants A and B. *J Clin Virol*, 46, 20-3.
- LI J. M., LEI D., PENG F., ZENG Y. J., LI L., XIA Z. L., XIA X. Q. & ZHOU D. 2011. Detection of human herpes virus 6B in patients with mesial temporal lobe epilepsy in West China and the possible association with elevated NF-kappaB expression. *Epilepsy Res*, 94, 1-9.
- LINDEN R. M., WARD P., GIRAUD C., WINOCOUR E. & BERNS K. I. 1996. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 11288-94.
- LINDQUESTER G. J. & PELLETT P. E. 1991. Properties of the human herpesvirus 6 strain Z29 genome: G + C content, length, and presence of variable-length directly repeated terminal sequence elements. *Virology*, 182, 102-10.

- LINGNER J., HUGHES T. R., SHEVCHENKO A., MANN M., LUNDBLAD V. & CECH T. R. 1997. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science*, 276, 561-7.
- LISZEWSKI M. K., POST T. W. & ATKINSON J. P. 1991. Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu Rev Immunol*, 9, 431-55.
- LIU J. L. & KUNG H. J. 2000. Marek's disease herpesvirus transforming protein MEQ: a c-Jun analogue with an alternative life style. *Virus Genes*, 21, 51-64.
- LIU X., DAKIC A., ZHANG Y., DAI Y., CHEN R. & SCHLEGEL R. 2009. HPV E6 protein interacts physically and functionally with the cellular telomerase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 18780-5.
- LJUNGMAN P., DAHL H., XU Y. H., LARSSON K., BRYTTING M. & LINDE A. 2007. Effectiveness of ganciclovir against human herpesvirus-6 excreted in saliva in stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*, 39, 497-9.
- LJUNGMAN P., DELILIERIS G. L., PLATZBECKER U., MATTHES-MARTIN S., BACIGALUPO A., EINSELE H., ULLMANN J., MUSSO M., TRENSCHEL R., RIBAUD P., BORNHAUSER M., CESARO S., CROOKS B., DEKKER A., GRATECOS N., KLINGEBIEL T., TAGLIAFERRI E., ULLMANN A. J., WACKER P. & CORDONNIER C. 2001. Cidofovir for cytomegalovirus infection and disease in allogeneic stem cell transplant recipients. The Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood*, 97, 388-92.
- LLOYD D. C., PURROTT R. J. & REEDER E. J. 1980. The incidence of unstable chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes from unirradiated and occupationally exposed people. *Mutat Res*, 72, 523-32.
- LOAYZA D. & DE LANGE T. 2003. POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature*, 423, 1013-8.
- LOPEZ C., PELLETT P., STEWART J., GOLDSMITH C., SANDERLIN K., BLACK J., WARFIELD D. & FEORINO P. 1988. Characteristics of human herpesvirus-6. *J Infect Dis*, 157, 1271-3.
- LUKA J., KALLIN B. & KLEIN G. 1979. Induction of the Epstein-Barr virus (EBV) cycle in latently infected cells by n-butyrate. *Virology*, 94, 228-31.
- LUKA J., OKANO M. & THIELE G. 1990. Isolation of human herpesvirus-6 from clinical specimens using human fibroblast cultures. *J Clin Lab Anal*, 4, 483-6.
- LUNDBLAD V. & SZOSTAK J. W. 1989. A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell*, 57, 633-43.
- LUPIANI B., LEE L. F., CUI X., GIMENO I., ANDERSON A., MORGAN R. W., SILVA R. F., WITTER R. L., KUNG H. J. & REDDY S. M. 2004. Marek's disease virus-encoded Meq gene is involved in transformation of lymphocytes but is dispensable for replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 11815-20.
- LUPPI M., BAROZZI P., BOSCO R., VALLERINI D., POTENZA L., FORGHIERI F. & TORELLI G. 2006. Human herpesvirus 6 latency characterized by high viral load: chromosomal integration in many, but not all, cells. *J Infect Dis*, 194, 1020-1; author reply 1021-3.
- LUPPI M., BAROZZI P., MARASCA R. & TORELLI G. 1994. Integration of human herpesvirus-6 (HHV-6) genome in chromosome 17 in two lymphoma patients. *Leukemia*, 8 Suppl 1, S41-5.
- LUPPI M., BAROZZI P., MORRIS C., MAIORANA A., GARBER R., BONACORSI G., DONELLI A., MARASCA R., TABILIO A. & TORELLI G. 1999. Human herpesvirus 6 latently infects early bone marrow progenitors in vivo. *J Virol*, 73, 754-9.
- LUPPI M., BAROZZI P., MORRIS C. M., MERELLI E. & TORELLI G. 1998. Integration of human herpesvirus 6 genome in human chromosomes. *Lancet*, 352, 1707-8.
- LUPPI M., MARASCA R., BAROZZI P., ARTUSI T. & TORELLI G. 1993a. Frequent detection of human herpesvirus-6 sequences by polymerase chain reaction in paraffin-embedded lymph nodes from

- patients with angioimmunoblastic lymphadenopathy and angioimmunoblastic lymphadenopathy-like lymphoma. *Leuk Res*, 17, 1003-11.
- LUPPI M., MARASCA R., BAROZZI P., FERRARI S., CECCHERINI-NELLI L., BATONI G., MERELLI E. & TORELLI G. 1993b. Three cases of human herpesvirus-6 latent infection: integration of viral genome in peripheral blood mononuclear cell DNA. *J Med Virol*, 40, 44-52.
- LUSSO P., DE MARIA A., MALNATI M., LORI F., DEROCCO S. E., BASELER M. & GALLO R. C. 1991a. Induction of CD4 and susceptibility to HIV-1 infection in human CD8+ T lymphocytes by human herpesvirus 6. *Nature*, 349, 533-5.
- LUSSO P., ENSOLI B., MARKHAM P. D., ABLASHI D. V., SALAHUDDIN S. Z., TSCHACHLER E., WONG-STAAAL F. & GALLO R. C. 1989. Productive dual infection of human CD4+ T lymphocytes by HIV-1 and HHV-6. *Nature*, 337, 370-3.
- LUSSO P. & GALLO R. C. 1995. Human herpesvirus 6 in AIDS. *Immunol Today*, 16, 67-71.
- LUSSO P., MALNATI M., DE MARIA A., BALOTTA C., DEROCCO S. E., MARKHAM P. D. & GALLO R. C. 1991b. Productive infection of CD4+ and CD8+ mature human T cell populations and clones by human herpesvirus 6. Transcriptional down-regulation of CD3. *J Immunol*, 147, 685-91.
- LUSSO P., MALNATI M. S., GARZINO-DEMO A., CROWLEY R. W., LONG E. O. & GALLO R. C. 1993. Infection of natural killer cells by human herpesvirus 6. *Nature*, 362, 458-62.
- LUSSO P., MARKHAM P. D., TSCHACHLER E., DI MARZO VERONESE F., SALAHUDDIN S. Z., ABLASHI D. V., PAHWA S., KROHN K. & GALLO R. C. 1988. In vitro cellular tropism of human B-lymphotropic virus (human herpesvirus-6). *J Exp Med*, 167, 1659-70.
- MAEDA T., OKUNO T., HAYASHI K., NAGATA M., UEDA M., TERASHIMA K., KAWASHIMA T., MIYAMOTO H., MORI T. & 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.
- MARDIVIRIN L., DESCAMPS V., LACROIX A., DELEBASSEE S. & RANGER-ROGEZ S. 2009. Early effects of drugs responsible for DRESS on HHV-6 replication in vitro. *J Clin Virol*, 46, 300-2.
- MARDIVIRIN L., VALEYRIE-ALLANORE L., BRANLANT-REDON E., BENETON N., JIDAR K., BARBAUD A., CRICKX B., RANGER-ROGEZ S. & DESCAMPS V. 2010. Amoxicillin-induced flare in patients with DRESS (Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms): report of seven cases and demonstration of a direct effect of amoxicillin on Human Herpesvirus 6 replication in vitro. *Eur J Dermatol*, 20, 68-73.
- MATTHEWS T. & BOEHME R. 1988. Antiviral activity and mechanism of action of ganciclovir. *Rev Infect Dis*, 10 Suppl 3, S490-4.
- MAYNE M., CHEADLE C., SOLDAN S. S., CERPELLI C., YAMANO Y., AKHYANI N., NAGEL J. E., TAUB D. D., BECKER K. G. & JACOBSON S. 2001. Gene expression profile of herpesvirus-infected T cells obtained using immunomicroarrays: induction of proinflammatory mechanisms. *J Virol*, 75, 11641-50.
- MCCLINTOCK B. 1929. A Cytological and Genetical Study of Triploid Maize. *Genetics*, 14, 180-222.
- MCCLINTOCK B. 1941. The Stability of Broken Ends of Chromosomes in Zea Mays. *Genetics*, 26, 234-82.
- MCGAVIN J. K. & 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.
- MCGEACHY T. E. & BLOOMER W. E. 1953. The phenobarbital sensitivity syndrome. *Am J Med*, 14, 600-4.
- MENDEZ VIDAL C., PRAHL M. & WIMAN K. G. 2006. The p53-induced Wig-1 protein binds double-stranded RNAs with structural characteristics of siRNAs and miRNAs. *FEBS Lett*, 580, 4401-8.
- MILBRADT J., AUEROCHS S., KORN K. & MARSCHALL M. 2009. Sensitivity of human herpesvirus 6 and other human herpesviruses to the broad-spectrum anti-infective drug artesunate. *J Clin Virol*, 46, 24-8.

- MIRANDOLA P., MENEGAZZI P., MERIGHI S., RAVAIOLI T., CASSAI E. & DI LUCA D. 1998. Temporal mapping of transcripts in herpesvirus 6 variants. *J Virol*, 72, 3837-44.
- MOCK D. J., POWERS J. M., GOODMAN A. D., BLUMENTHAL S. R., ERGIN N., BAKER J. V., MATTSON D. H., ASSOULINE J. G., BERGEY E. J., CHEN B., EPSTEIN L. G. & BLUMBERG B. M. 1999. Association of human herpesvirus 6 with the demyelinating lesions of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurovirol*, 5, 363-73.
- MOCKENHAUPT M. 2012. Epidemiology of cutaneous adverse drug reactions. *Chem Immunol Allergy*, 97, 1-17.
- MOODY C. A. & LAIMINS L. A. 2010. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*, 10, 550-60.
- MORI T., TANAKA-TAYA K., SATOH H., AISA Y., YAMAZAKI R., KATO J., IKEDA Y. & OKAMOTO S. 2009. Transmission of chromosomally integrated human herpesvirus 6 (HHV-6) variant A from a parent to children leading to misdiagnosis of active HHV-6 infection. *Transpl Infect Dis*, 11, 503-6.
- MORI Y., AKKAPAIBOON P., YANG X. & YAMANISHI K. 2003a. The human herpesvirus 6 U100 gene product is the third component of the gH-gL glycoprotein complex on the viral envelope. *J Virol*, 77, 2452-8.
- MORI Y., DHEPAKSON P., SHIMAMOTO T., UEDA K., GOMI Y., TANI H., MATSUURA Y. & YAMANISHI K. 2000. Expression of human herpesvirus 6B rep within infected cells and binding of its gene product to the TATA-binding protein in vitro and in vivo. *J Virol*, 74, 6096-104.
- MORI Y., YANG X., AKKAPAIBOON P., OKUNO T. & YAMANISHI K. 2003b. Human herpesvirus 6 variant A glycoprotein H-glycoprotein L-glycoprotein Q complex associates with human CD46. *J Virol*, 77, 4992-9.
- MORISSETTE G. & FLAMAND L. 2010. Herpesviruses and chromosomal integration. *J Virol*, 84, 12100-9.
- MOSSMAN K. L. 2002. Activation and inhibition of virus and interferon: the herpesvirus story. *Viral Immunol*, 15, 3-15.
- MOYZIS R. K., BUCKINGHAM J. M., CRAM L. S., DANI M., DEAVEN L. L., JONES M. D., MEYNE J., RATLIFF R. L. & WU J. R. 1988. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 6622-6.
- MÜLLER H. 1938. . The remaking of chromosomes. *Collecting Net*, 13, 181-198.
- MULLER P., DUBREIL P., MAHE A., LAMAURY I., SALZER B., DELOUMEAUX J. & STROBEL M. 2003. Drug Hypersensitivity Syndrome in a West-Indian population. *Eur J Dermatol*, 13, 478-81.
- MUTA T., FUKUDA T. & HARADA M. 2009. Human herpesvirus-6 encephalitis in hematopoietic SCT recipients in Japan: a retrospective multicenter study. *Bone Marrow Transplant*, 43, 583-5.
- NACHEVA E. P., WARD K. N., BRAZMA D., VIRGILI A., HOWARD J., LEONG H. N. & CLARK D. A. 2008. Human herpesvirus 6 integrates within telomeric regions as evidenced by five different chromosomal sites. *J Med Virol*, 80, 1952-8.
- NAESENS L., BONNAFOUS P., AGUT H. & DE CLERCQ E. 2006. Antiviral activity of diverse classes of broad-acting agents and natural compounds in HHV-6-infected lymphoblasts. *J Clin Virol*, 37 Suppl 1, S69-75.
- NAHDI I., BOUKOUM H., NABIL BEN SALEM A., BEN ROMDANE F., HAMMAMI S., CHEBEL S., MAHBOUBA F. A., GUEDICHE M. N., CHAKROUN M., AOUNI M., IMBERT-MARCILLE B. M. & BRESSOLLETTE-BODIN C. 2012. Detection of herpes simplex virus (1 and 2), varicella-zoster virus, cytomegalovirus, human herpesvirus 6 and enterovirus in immunocompetent Tunisian patients with acute neuromeningeal disorder. *J Med Virol*, 84, 282-9.

- NAKAMURA T. M., MORIN G. B., CHAPMAN K. B., WEINRICH S. L., ANDREWS W. H., LINGNER J., HARLEY C. B. & CECH T. R. 1997. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science*, 277, 955-9.
- NAKANO K. & VOUSDEN K. H. 2001. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*, 7, 683-94.
- NANIWA T., MAEDA S., SAWADA H., WATANABE Y., OSAWA T., HAYAMI Y., BANNO S., MORITA A. & UEDA R. 2007. Drug-induced hypersensitivity syndrome associated with a marked increase in anti-paramyxovirus antibody titers in a scleroderma patient. *Allergol Int*, 56, 303-8.
- NIEDERMAN J. C., LIU C. R., KAPLAN M. H. & BROWN N. A. 1988. Clinical and serological features of human herpesvirus-6 infection in three adults. *Lancet*, 2, 817-9.
- NIGRO G., LUZI G., KRZYSZTOFIK A., D'ORIO F. & 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. & YAMANISHI K. 1990. Replication of human herpesvirus 6 (HHV-6): morphological aspects. *Adv Exp Med Biol*, 278, 19-28.
- NISHIMOTO M., NAKAMAE H., HAYASHI Y., KOH H., NAKANE T., YOSHIDA M., BINGO M., OKAMURA H., AIMOTO M., NANNO S., YOSHIMURA T., INABA A., HAGIHARA K., NAKAMAE M., HIROSE A., NAKAO Y., TERADA Y. & HINO M. 2012. Prolonged sinus tachycardia caused by human herpesvirus 6 (HHV6) encephalomyelitis after allogeneic bone marrow transplantation. *Intern Med*, 51, 1265-7.
- NORA G. J., BUNCHER N. A. & OPRESKO P. L. 2010. Telomeric protein TRF2 protects Holliday junctions with telomeric arms from displacement by the Werner syndrome helicase. *Nucleic Acids Res*, 38, 3984-98.
- O'CONNOR M. S., SAFARI A., LIU D., QIN J. & SONGYANG Z. 2004. The human Rap1 protein complex and modulation of telomere length. *J Biol Chem*, 279, 28585-91.
- O'HAGAN R. C., CHANG S., MASER R. S., MOHAN R., ARTANDI S. E., CHIN L. & DEPINHO R. A. 2002. Telomere dysfunction provokes regional amplification and deletion in cancer genomes. *Cancer Cell*, 2, 149-55.
- OESEBURG H., DE BOER R. A., VAN GILST W. H. & VAN DER HARST P. 2010. Telomere biology in healthy aging and disease. *Pflugers Arch*, 459, 259-68.
- OGATA M., SATOU T., INOUE Y., TAKANO K., IKEBE T., ANDO T., IKEWAKI J., KOHNO K., NISHIDA A., SABURI M., MIYAZAKI Y., OHTSUKA E., SABURI Y., FUKUDA T. & KADOTA J. 2013. Foscarnet against human herpesvirus (HHV)-6 reactivation after allo-SCT: breakthrough HHV-6 encephalitis following antiviral prophylaxis. *Bone Marrow Transplant*, 48, 257-264.
- OH B. K., KIM Y. J., PARK C. & PARK Y. N. 2005. Up-regulation of telomere-binding proteins, TRF1, TRF2, and TIN2 is related to telomere shortening during human multistep hepatocarcinogenesis. *Am J Pathol*, 166, 73-80.
- OHYASHIKI J. H., TAKAKU T., OJIMA T., ABE K., YAMAMOTO K., ZHANG Y. & OHYASHIKI K. 2005. Transcriptional profiling of human herpesvirus type B (HHV-6B) in an adult T cell leukemia cell line as in vitro model for persistent infection. *Biochem Biophys Res Commun*, 329, 11-7.
- OKUNO T., OISHI H., HAYASHI K., NONOGAKI M., TANAKA K. & YAMANISHI K. 1995. Human herpesviruses 6 and 7 in cervixes of pregnant women. *J Clin Microbiol*, 33, 1968-70.
- OLOVNIKOV A. M. 1971. [Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides]. *Dokl Akad Nauk SSSR*, 201, 1496-9.
- OPSAHL M. L. & KENNEDY P. G. 2005. Early and late HHV-6 gene transcripts in multiple sclerosis lesions and normal appearing white matter. *Brain*, 128, 516-27.

- OSKAY T., KARADEMIR A. & ERTURK O. I. 2006. Association of anticonvulsant hypersensitivity syndrome with Herpesvirus 6, 7. *Epilepsy Res*, 70, 27-40.
- OSTER B. & HOLLSBERG P. 2002. Viral gene expression patterns in human herpesvirus 6B-infected T cells. *J Virol*, 76, 7578-86.
- OSTERRIEDER N., KAMIL J. P., SCHUMACHER D., TISCHER B. K. & TRAPP S. 2006. Marek's disease virus: from miasma to model. *Nat Rev Microbiol*, 4, 283-94.
- PALM W. & DE LANGE T. 2008. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet*, 42, 301-34.
- PANIER S. & BOULTON S. J. 2013. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol*.
- PANTRY S. N., MEDVECZKY M. M., ARBUCKLE J. H., LUKA J., MONTOYA J. G., HU J., RENNE R., PETERSON D., PRITCHETT J. C., ABLASHI D. V. & MEDVECZKY P. G. 2013. Persistent human herpesvirus-6 infection in patients with an inherited form of the virus. *J Med Virol*, 85, 1940-6.
- PEDERSEN S. M. & HOLLSBERG P. 2006. Complexities in human herpesvirus-6A and -6B binding to host cells. *Virology*, 356, 1-3.
- PELLETT P. & DOMINGUEZ G. 2001. Human herpesviruses 6A, 6B, and 7 and their replication. *in: Knipe D.M., Hawley P.M. (ed.) Fields Virology Fourth Edition. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia*, 2, 2369-84.
- PELLETT P. E., ABLASHI D. V., AMBROS P. F., AGUT H., CASERTA M. T., DESCAMPS V., FLAMAND L., GAUTHERET-DEJEAN A., HALL C. B., KAMBLE R. T., KUEHL U., LASSNER D., LAUTENSCHLAGER I., LOOMIS K. S., LUPPI M., LUSSO P., MEDVECZKY P. G., MONTOYA J. G., MORI Y., OGATA M., PRITCHETT J. C., ROGEZ S., SETO E., WARD K. N., YOSHIKAWA T. & RAZONABLE R. R. 2012. Chromosomally integrated human herpesvirus 6: questions and answers. *Rev Med Virol*, 22, 144-55.
- PELLOCK J. M. 1987. Carbamazepine side effects in children and adults. *Epilepsia*, 28 Suppl 3, S64-70.
- PERREM K., COLGIN L. M., NEUMANN A. A., YEAGER T. R. & REDDEL R. R. 2001. Coexistence of alternative lengthening of telomeres and telomerase in hTERT-transfected GM847 cells. *Mol Cell Biol*, 21, 3862-75.
- PICARD D., JANELA B., DESCAMPS V., D'INCAN M., COURVILLE P., JACQUOT S., ROGEZ S., MARDIVIRIN L., MOINS-TEISSERENC H., TOUBERT A., BENICHOU J., JOLY P., MUsETTE P. 2010. Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS): a multiorgan antiviral T cell response. *Sci Transl Med*, 2, 46ra62.
- PIRMOHAMED M. 2006. Genetic factors in the predisposition to drug-induced hypersensitivity reactions. *Aaps j*, 8, E20-6.
- PORTOLANI M., CERMELLI C., MEACCI M., PIETROSEMOLI P., PECORARI M., SABBATINI A. M., LEONI S., GUERRA A. & BONACCORSI G. 1997. Primary infection by HHV-6 variant B associated with a fatal case of hemophagocytic syndrome. *New Microbiol*, 20, 7-11.
- POTENZA L., BAROZZI P., MASETTI M., PECORARI M., BRESCIANI P., GAUTHERET-DEJEAN A., RIVA G., VALLERINI D., TAGLIAZUCCHI S., CODELUPPI M., DI BENEDETTO F., GERUNDA G. E., NARNI F., TORELLI G. & LUPPI M. 2009. Prevalence of human herpesvirus-6 chromosomal integration (CIHHV-6) in Italian solid organ and allogeneic stem cell transplant patients. *Am J Transplant*, 9, 1690-7.
- PRADEAU K., BORDESSOULE D., SZELAG J. C., ROLLE F., FERRAT P., LE MEUR Y., TURLURE P., DENIS F. & RANGER-ROGEZ S. 2006. A reverse transcription-nested PCR assay for HHV-6 mRNA early transcript detection after transplantation. *J Virol Methods*, 134, 41-7.

- QAVI H. B., GREEN M. T., LEWIS D. E., HOLLINGER F. B., PEARSON G. & ABLASHI D. V. 1995. HIV-1 and HHV-6 antigens and transcripts in retinas of patients with AIDS in the absence of human cytomegalovirus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 36, 2040-7.
- QUENELLE D. C., LAMPERT B., COLLINS D. J., RICE T. L., PAINTER G. R. & KERN E. R. 2010. Efficacy of CMX001 against herpes simplex virus infections in mice and correlations with drug distribution studies. *J Infect Dis*, 202, 1492-9.
- RAJPAR S., GUIJTAT L. & MERGNY J. L. 2011. [Telomeres: a Nobel Prize at the beginning... of the end]. *Bull Cancer*, 98, 999-1009.
- RALEIGH D. R. & HAAS-KOGAN D. A. 2013. Molecular targets and mechanisms of radiosensitization using DNA damage response pathways. *Future Oncol*, 9, 219-33.
- RAPP J. C., KRUG L. T., INOUE N., DAMBAUGH T. R. & PELLETT P. E. 2000. U94, the human herpesvirus 6 homolog of the parvovirus nonstructural gene, is highly conserved among isolates and is expressed at low mRNA levels as a spliced transcript. *Virology*, 268, 504-16.
- RAZZAQUE A. 1990. Oncogenic potential of human herpesvirus-6 DNA. *Oncogene*, 5, 1365-70.
- RAZZAQUE A., WILLIAMS O., WANG J. & RHIM J. S. 1993. Neoplastic transformation of immortalized human epidermal keratinocytes by two HHV-6 DNA clones. *Virology*, 195, 113-20.
- REICHEL T. M., BRADY J. & ARVIN A. M. 2009. The replication cycle of varicella-zoster virus: analysis of the kinetics of viral protein expression, genome synthesis, and virion assembly at the single-cell level. *J Virol*, 83, 3904-18.
- REYME D., NAESENS L., BALZARINI J., HOLY A., DVORAKOVA H. & DE CLERCQ E. 1995. Antiviral activity of selected acyclic nucleoside analogues against human herpesvirus 6. *Antiviral Res*, 28, 343-57.
- RILEY-VARGAS R. C., GILL D. B., KEMPER C., LISZEWSKI M. K. & ATKINSON J. P. 2004. CD46: expanding beyond complement regulation. *Trends Immunol*, 25, 496-503.
- ROHDEWOHL D. H., WEIHER H., REIK W., JAENISCH R. & BREINDL M. 1987. Retrovirus integration and chromatin structure: Moloney murine leukemia proviral integration sites map near DNase I-hypersensitive sites. *J Virol*, 61, 336-43.
- ROTOLO A., RAVAIOLI T., GONELLI A., DEWHURST S., CASSAI E. & DI LUCA D. 1998. U94 of human herpesvirus 6 is expressed in latently infected peripheral blood mononuclear cells and blocks viral gene expression in transformed lymphocytes in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 13911-6.
- ROUJEAU J. C. & STERN R. S. 1994. Severe adverse cutaneous reactions to drugs. *N Engl J Med*, 331, 1272-85.
- SALAHUDDIN S. Z., ABLASHI D. V., MARKHAM P. D., JOSEPHS S. F., STURZENEGGER S., KAPLAN M., HALLIGAN G., BIBERFELD P., WONG-STAAAL F., KRAMARSKY B. & ET AL. 1986. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science*, 234, 596-601.
- SALONEN M. J., SIIMES M. A., SALONEN E. M., VAHERI A. & KOSKINIEMI M. 2002. Antibody status to HHV-6 in children with leukaemia. *Leukemia*, 16, 716-9.
- SALTZSTEIN S. L. & ACKERMAN L. V. 1959. Lymphadenopathy induced by anticonvulsant drugs and mimicking clinically pathologically malignant lymphomas. *Cancer*, 12, 164-82.
- SANTIAGO F., GONCALO M., VIEIRA R., COELHO S. & FIGUEIREDO A. 2010. Epicutaneous patch testing in drug hypersensitivity syndrome (DRESS). *Contact Dermatitis*, 62, 47-53.
- SANTORO F., KENNEDY P. E., LOCATELLI G., MALNATI M. S., BERGER E. A. & LUSSO P. 1999. CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell*, 99, 817-27.
- SCHIRMER E. C., WYATT L. S., YAMANISHI K., RODRIGUEZ W. J. & FRENKEL N. 1991. Differentiation between two distinct classes of viruses now classified as human herpesvirus 6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 5922-6.

- SCHMIDT C. A., OETTLER H., PENG R., BINDER T., WILBORN F., HUHNS D., SIEGERT W. & HERBST H. 2000. Presence of human beta- and gamma-herpes virus DNA in Hodgkin's disease. *Leuk Res*, 24, 865-70.
- SCHOEFTNER S. & BLASCO M. A. 2008. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nat Cell Biol*, 10, 228-36.
- SECCHIERO P., CARRIGAN D. R., ASANO Y., BENEDETTI L., CROWLEY R. W., KOMAROFF A. L., GALLO R. C. & 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.
- SEISHIMA M., YAMANAKA S., FUJISAWA T., TOHYAMA M. & HASHIMOTO K. 2006. Reactivation of human herpesvirus (HHV) family members other than HHV-6 in drug-induced hypersensitivity syndrome. *Br J Dermatol*, 155, 344-9.
- SEKINE N., MOTOKURA T., OKI T., UMEDA Y., SASAKI N., HAYASHI M., SATO H., FUJITA T., KANEKO T., ASANO Y. & KIKUCHI K. 2001. Rapid loss of insulin secretion in a patient with fulminant type 1 diabetes mellitus and carbamazepine hypersensitivity syndrome. *Jama*, 285, 1153-4.
- SHAMAY M., LIU J., LI R., LIAO G., SHEN L., GREENWAY M., HU S., ZHU J., XIE Z., AMBINDER R. F., QIAN J., ZHU H. & HAYWARD S. D. 2012. A protein array screen for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus LANA interactors links LANA to TIP60, PP2A activity, and telomere shortening. *J Virol*, 86, 5179-91.
- SHAY J. W. 1999. At the end of the millennium, a view of the end. *Nat Genet*, 23, 382-3.
- SHEAR N. H. & SPIELBERG S. P. 1988. Anticonvulsant hypersensitivity syndrome. In vitro assessment of risk. *J Clin Invest*, 82, 1826-32.
- SHIOHARA T., IJIMA M., IKEZAWA Z. & HASHIMOTO K. 2007. The diagnosis of a DRESS syndrome has been sufficiently established on the basis of typical clinical features and viral reactivations. *Br J Dermatol*, 156, 1083-4.
- SHIOHARA T., INAOKA M. & KANO Y. 2006. Drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS): a reaction induced by a complex interplay among herpesviruses and antiviral and antidrug immune responses. *Allergol Int*, 55, 1-8.
- SHIOHARA T. & KANO Y. 2007. A complex interaction between drug allergy and viral infection. *Clin Rev Allergy Immunol*, 33, 124-33.
- SIMMONS A., DEMMICH Y., LA VISTA A. & SMITH K. 1992. Replication of human herpesvirus 6 in epithelial cells in vitro. *J Infect Dis*, 166, 202-5.
- SMITH R. H. & KOTIN R. M. 2000. An adeno-associated virus (AAV) initiator protein, Rep78, catalyzes the cleavage and ligation of single-stranded AAV ori DNA. *J Virol*, 74, 3122-9.
- SOBUE R., MIYAZAKI H., OKAMOTO M., HIRANO M., YOSHIKAWA T., SUGA S. & ASANO Y. 1991. Fulminant hepatitis in primary human herpesvirus-6 infection. *N Engl J Med*, 324, 1290.
- SRIVASTAVA A., LUSBY E. W. & BERNS K. I. 1983. Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J Virol*, 45, 555-64.
- STRAAT K., LIU C., RAHBAR A., ZHU Q., LIU L., WOLMER-SOLBERG N., LOU F., LIU Z., SHEN J., JIA J., KYO S., BJORKHOLM M., SJOBERG J., SODERBERG-NAUCLER C. & XU D. 2009. Activation of telomerase by human cytomegalovirus. *J Natl Cancer Inst*, 101, 488-97.
- SUGA S., YAZAKI T., KAJITA Y., OZAKI T. & ASANO Y. 1995. Detection of human herpesvirus 6 DNAs in samples from several body sites of patients with exanthem subitum and their mothers by polymerase chain reaction assay. *J Med Virol*, 46, 52-5.
- SUGA S., YOSHIKAWA T., ASANO Y., KOZAWA T., NAKASHIMA T., KOBAYASHI I., YAZAKI T., YAMAMOTO H., KAJITA Y., OZAKI T. & ET AL. 1993. Clinical and virological analyses of 21 infants with

- exanthem subitum (roseola infantum) and central nervous system complications. *Ann Neurol*, 33, 597-603.
- SUGA S., YOSHIKAWA T., KAJITA Y., OZAKI T. & 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.
- SUGITA K., KURUMADA H., EGUCHI M. & FURUKAWA T. 1995. Human herpesvirus 6 infection associated with hemophagocytic syndrome. *Acta Haematol*, 93, 108-9.
- SUMIYOSHI Y., KIKUCHI M., OHSHIMA K., TAKESHITA M., EIZURU Y. & MINAMISHIMA Y. 1993. Analysis of human herpes virus-6 genomes in lymphoid malignancy in Japan. *J Clin Pathol*, 46, 1137-8.
- SUROSKY R. T., URABE M., GODWIN S. G., MCQUISTON S. A., KURTZMAN G. J., OZAWA K. & NATSOULIS G. 1997. Adeno-associated virus Rep proteins target DNA sequences to a unique locus in the human genome. *J Virol*, 71, 7951-9.
- SUZUKI Y., INAGI R., AONO T., YAMANISHI K. & SHIOHARA T. 1998. Human herpesvirus 6 infection as a risk factor for the development of severe drug-induced hypersensitivity syndrome. *Arch Dermatol*, 134, 1108-12.
- TAJIRI H., NOSE O., BABA K. & OKADA S. 1990. Human herpesvirus-6 infection with liver injury in neonatal hepatitis. *Lancet*, 335, 863.
- TAJIRI H., TANAKA-TAYA K., OZAKI Y., OKADA S., MUSHIAKE S. & YAMANISHI K. 1997. Chronic hepatitis in an infant, in association with human herpesvirus-6 infection. *J Pediatr*, 131, 473-5.
- TAKAHASHI K., SONODA S., HIGASHI K., KONDO T., TAKAHASHI H., TAKAHASHI M. & YAMANISHI K. 1989. Predominant CD4 T-lymphocyte tropism of human herpesvirus 6-related virus. *J Virol*, 63, 3161-3.
- TAKAI K. K., HOOPER S., BLACKWOOD S., GANDHI R. & DE LANGE T. 2010. In vivo stoichiometry of shelterin components. *J Biol Chem*, 285, 1457-67.
- TAKEMOTO M., MORI Y., UEDA K., KONDO K. & YAMANISHI K. 2004. Productive human herpesvirus 6 infection causes aberrant accumulation of p53 and prevents apoptosis. *J Gen Virol*, 85, 869-79.
- TANAKA-TAYA K., SASHIHARA J., KURAHASHI H., AMO K., MIYAGAWA H., KONDO K., OKADA S. & YAMANISHI K. 2004. Human herpesvirus 6 (HHV-6) is transmitted from parent to child in an integrated form and characterization of cases with chromosomally integrated HHV-6 DNA. *J Med Virol*, 73, 465-73.
- TANAKA Y., SUENAGA T., MATSUMOTO M., SEYA T. & ARASE H. 2013. Herpesvirus 6 Glycoproteins B (gB), gH, gL and gQ are Necessary and Sufficient for Cell-to-Cell Fusion. *J Virol*.
- TANG H., SERADA S., KAWABATA A., OTA M., HAYASHI E., NAKA T., YAMANISHI K. & MORI Y. 2013. CD134 is a cellular receptor specific for human herpesvirus-6B entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 9096-9.
- TANIGUCHI T., SHIMAMOTO T., ISEGAWA Y., KONDO K. & 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.
- TENNIS P. & STERN R. S. 1997. Risk of serious cutaneous disorders after initiation of use of phenytoin, carbamazepine, or sodium valproate: a record linkage study. *Neurology*, 49, 542-6.
- TERAKI Y., MUROTA H. & IZAKI S. 2008. Toxic epidermal necrolysis due to zonisamide associated with reactivation of human herpesvirus 6. *Arch Dermatol*, 144, 232-5.
- TERRIN L., DAL COL J., RAMPAZZO E., ZANCAI P., PEDROTTI M., AMMIRABILE G., BERGAMIN S., RIZZO S., DOLCETTI R. & DE ROSSI A. 2008. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus activates the hTERT promoter and enhances telomerase activity in B lymphocytes. *J Virol*, 82, 10175-87.

- THOMSON B. J., EFSTATHIOU S. & HONESS R. W. 1991. Acquisition of the human adeno-associated virus type-2 rep gene by human herpesvirus type-6. *Nature*, 351, 78-80.
- THOMSON B. J., WEINDLER F. W., GRAY D., SCHWAAB V. & HEILBRONN R. 1994. Human herpesvirus 6 (HHV-6) is a helper virus for adeno-associated virus type 2 (AAV-2) and the AAV-2 rep gene homologue in HHV-6 can mediate AAV-2 DNA replication and regulate gene expression. *Virology*, 204, 304-11.
- TOHYAMA M., HASHIMOTO K., YASUKAWA M., KIMURA H., HORIKAWA T., NAKAJIMA K., URANO Y., MATSUMOTO K., IJIMA M. & SHEAR N. H. 2007. Association of human herpesvirus 6 reactivation with the flaring and severity of drug-induced hypersensitivity syndrome. *Br J Dermatol*, 157, 934-40.
- TOHYAMA M., YAHATA Y., YASUKAWA M., INAGI R., URANO Y., YAMANISHI K. & HASHIMOTO K. 1998. Severe hypersensitivity syndrome due to sulfasalazine associated with reactivation of human herpesvirus 6. *Arch Dermatol*, 134, 1113-7.
- TORELLI G., BAROZZI P., MARASCA R., COCCONCELLI P., MERELLI E., CECCHERINI-NELLI L., FERRARI S. & LUPPI M. 1995. Targeted integration of human herpesvirus 6 in the p arm of chromosome 17 of human peripheral blood mononuclear cells in vivo. *J Med Virol*, 46, 178-88.
- TORELLI G., MARASCA R., LUPPI M., SELLERI L., FERRARI S., NARNI F., MARIANO M. T., FEDERICO M., CECCHERINI-NELLI L., BENDINELLI M. & ET AL. 1991. Human herpesvirus-6 in human lymphomas: identification of specific sequences in Hodgkin's lymphomas by polymerase chain reaction. *Blood*, 77, 2251-8.
- TORRISI M. R., GENTILE M., CARDINALI G., CIRONE M., ZOMPETTA C., LOTTI L. V., FRATI L. & FAGGIONI A. 1999. Intracellular transport and maturation pathway of human herpesvirus 6. *Virology*, 257, 460-71.
- TRATSCHIN J. D., TAL J. & CARTER B. J. 1986. Negative and positive regulation in trans of gene expression from adeno-associated virus vectors in mammalian cells by a viral rep gene product. *Mol Cell Biol*, 6, 2884-94.
- TREMPE, #160, FR, #233, #233, RIC, MORISSETTE, #160, GUILLAUME, GRAVEL, #160, ANNIE, FLAMAND, #160 & LOUIS 2011. *L'herpesvirus humain de type 6 et l'intégration chromosomique: conséquences biologiques et médicales associées*, Montrouge, FRANCE, John Libbey Eurotext.
- TROY S. B., BLACKBURN B. G., YEOM K., CAULFIELD A. K., BHANGOO M. S. & MONTOYA J. G. 2008. Severe encephalomyelitis in an immunocompetent adult with chromosomally integrated human herpesvirus 6 and clinical response to treatment with foscarnet plus ganciclovir. *Clin Infect Dis*, 47, e93-6.
- TSAO E. H., KELLAM P., SIN C. S., RASAIYAAH J., GRIFFITHS P. D. & CLARK D. A. 2009. Microarray-based determination of the lytic cascade of human herpesvirus 6B. *J Gen Virol*, 90, 2581-91.
- TSUJIMURA H., ISEKI T., DATE Y., WATANABE J., KUMAGAI K., KIKUNO K., YONEMITSU H. & SAISHO H. 1998. Human herpesvirus-6 encephalitis after bone marrow transplantation: magnetic resonance imaging could identify the involved sites of encephalitis. *Eur J Haematol*, 61, 284-5.
- VALENTE G., SECCHIERO P., LUSSO P., ABETE M. C., JEMMA C., REATO G., KERIM S., GALLO R. C. & 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 STEENSEL B., SMOGORZEWSKA A. & DE LANGE T. 1998. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell*, 92, 401-13.

- VERMA S. C., BORAH S. & ROBERTSON E. S. 2004. Latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus up-regulates transcription of human telomerase reverse transcriptase promoter through interaction with transcription factor Sp1. *J Virol*, 78, 10348-59.
- VILBORG A., BERSANI C., WICKSTROM M., SEGERSTROM L., KOGNER P. & WIMAN K. G. 2012. Wig-1, a novel regulator of N-Myc mRNA and N-Myc-driven tumor growth. *Cell Death Dis*, 3, e298.
- VITTORIO C. C. & MUGLIA J. J. 1995. Anticonvulsant hypersensitivity syndrome. *Arch Intern Med*, 155, 2285-90.
- WALCOTT F., RAJARAMAN P., GADALLA S. M., INSKIP P. D., PURDUE M. P., ALBANES D., ORR E., DE VIVO I. & SAVAGE S. A. 2013. Telomere length and risk of glioma. *Cancer Epidemiol*, 37, 935-8.
- WALKER S. L., WONDERLING R. S. & OWENS R. A. 1997a. Mutational analysis of the adeno-associated virus Rep68 protein: identification of critical residues necessary for site-specific endonuclease activity. *J Virol*, 71, 2722-30.
- WALKER S. L., WONDERLING R. S. & OWENS R. A. 1997b. Mutational analysis of the adeno-associated virus type 2 Rep68 protein helicase motifs. *J Virol*, 71, 6996-7004.
- WANG F., PODELL E. R., ZAUG A. J., YANG Y., BACIU P., CECH T. R. & LEI M. 2007. The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature*, 445, 506-10.
- WARD K. N. & 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.
- WARD K. N., LEONG H. N., NACHEVA E. P., HOWARD J., ATKINSON C. E., DAVIES N. W., GRIFFITHS P. D. & CLARK D. A. 2006. Human herpesvirus 6 chromosomal integration in immunocompetent patients results in high levels of viral DNA in blood, sera, and hair follicles. *J Clin Microbiol*, 44, 1571-4.
- WARD K. N., LEONG H. N., THIRUCHELVAM A. D., ATKINSON C. E. & CLARK D. A. 2007. Human herpesvirus 6 DNA levels in cerebrospinal fluid due to primary infection differ from those due to chromosomal viral integration and have implications for diagnosis of encephalitis. *J Clin Microbiol*, 45, 1298-304.
- WATSON J. D. 1972. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol*, 239, 197-201.
- WEINRICH S. L., PRUZAN R., MA L., OUELLETTE M., TESMER V. M., HOLT S. E., BODNAR A. G., LICHTSTEINER S., KIM N. W., TRAGER J. B., TAYLOR R. D., CARLOS R., ANDREWS W. H., WRIGHT W. E., SHAY J. W., HARLEY C. B. & MORIN G. B. 1997. Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTRT. *Nat Genet*, 17, 498-502.
- WILLIAMS-AZIZ S. L., HARTLINE C. B., HARDEN E. A., DAILY S. L., PRICHARD M. N., KUSHNER N. L., BEADLE J. R., WAN W. B., HOSTETLER K. Y. & KERN E. R. 2005. Comparative activities of lipid esters of cidofovir and cyclic cidofovir against replication of herpesviruses in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 3724-33.
- WU X., AMOS C. I., ZHU Y., ZHAO H., GROSSMAN B. H., SHAY J. W., LUO S., HONG W. K. & SPITZ M. R. 2003. Telomere dysfunction: a potential cancer predisposition factor. *J Natl Cancer Inst*, 95, 1211-8.
- WYATT L. S., BALACHANDRAN N. & FRENKEL N. 1990. Variations in the replication and antigenic properties of human herpesvirus 6 strains. *J Infect Dis*, 162, 852-7.
- YAMANISHI K., OKUNO T., SHIRAKI K., TAKAHASHI M., KONDO T., ASANO Y. & KURATA T. 1988. Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet*, 1, 1065-7.
- YAZICIOGLU M., ELMAS R., TURGUT B. & GENCHALLAC T. 2012. The association between DRESS and the diminished numbers of peripheral B lymphocytes and natural killer cells. *Pediatr Allergy Immunol*, 23, 289-96.

- YOSHIDA M., UNO F., BAI Z. L., YAMADA M., NII S., SATA T., KURATA T., YAMANISHI K. & TAKAHASHI M. 1989. Electron microscopic study of a herpes-type virus isolated from an infant with exanthem subitum. *Microbiol Immunol*, 33, 147-54.
- YOSHIDA M., YAMADA M., TSUKAZAKI T., CHATTERJEE S., LAKEMAN F. D., NII S. & WHITLEY R. J. 1998. Comparison of antiviral compounds against human herpesvirus 6 and 7. *Antiviral Res*, 40, 73-84.
- YOSHIKAWA T., ASANO Y., AKIMOTO S., OZAKI T., IWASAKI T., KURATA T., GOSHIMA F. & NISHIYAMA Y. 2002. Latent infection of human herpesvirus 6 in astrocytoma cell line and alteration of cytokine synthesis. *J Med Virol*, 66, 497-505.
- YOSHIKAWA T., ASANO Y., KOBAYASHI I., NAKASHIMA T. & YAZAKI T. 1993. Exacerbation of idiopathic thrombocytopenic purpura by primary human herpesvirus 6 infection. *Pediatr Infect Dis J*, 12, 409-10.
- YOSHIKAWA T., IHIRA M., TAGUCHI H., YOSHIDA S. & ASANO Y. 2005. Analysis of shedding of 3 beta-herpesviruses in saliva from patients with connective tissue diseases. *J Infect Dis*, 192, 1530-6.
- YU G. L., BRADLEY J. D., ATTARDI L. D. & BLACKBURN E. H. 1990. In vivo alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated Tetrahymena telomerase RNAs. *Nature*, 344, 126-32.
- ZERR D. M. 2006. Human herpesvirus 6 and central nervous system disease in hematopoietic cell transplantation. *J Clin Virol*, 37 Suppl 1, S52-6.
- ZHAO L., SAMUELS T., WINCKLER S., KORGAONKAR C., TOMPKINS V., HORNE M. C. & QUELLE D. E. 2003. Cyclin G1 has growth inhibitory activity linked to the ARF-Mdm2-p53 and pRb tumor suppressor pathways. *Mol Cancer Res*, 1, 195-206.
- ZHAO P., LU Y., LIU L. & ZHONG M. 2008. Aberrant expression of ID2 protein and its correlation with EBV-LMP1 and P16(INK4A) in classical Hodgkin lymphoma in China. *BMC Cancer*, 8, 379.
- ZHOU X. Z. & LU K. P. 2001. The Pin2/TRF1-interacting protein PinX1 is a potent telomerase inhibitor. *Cell*, 107, 347-59.
- ZHOU Y., ATTYGALLE A. D., CHUANG S. S., DISS T., YE H., LIU H., HAMOUDI R. A., MUNSON P., BACON C. M., DOGAN A. & DU M. Q. 2007. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma: histological progression associates with EBV and HHV6B viral load. *Br J Haematol*, 138, 44-53.
- ZOU P., ISEGAWA Y., NAKANO K., HAQUE M., HORIGUCHI Y. & YAMANISHI K. 1999. Human herpesvirus 6 open reading frame U83 encodes a functional chemokine. *J Virol*, 73, 5926-33.

Intégration génomique de l'herpèsvirus humain de type 6 (HHV-6) : étude des modifications chromosomiques associées et de l'éventuelle réactivation en présence de drogues

L'herpèsvirus humain de type 6 (HHV-6) est un virus ubiquitaire qui existe sous deux types A et B. Ce virus est capable de s'intégrer dans la région télomérique avec une prévalence de 1% à l'échelle mondiale. Les conséquences de cette intégration demeurent inconnues. Mais, la réactivation de l'HHV-6 a été associée au syndrome d'hypersensibilité médicamenteuse « DRESS ». La détection et le suivi de la réactivation des herpèsvirus chez des patients atteints de DRESS ont été étudiés à l'aide d'une technique de PCR quantitative appliquée sur la salive. L'interprétation des résultats peut être différente selon le virus analysé. Dans le but de savoir si l'HHV-6 peut se réactiver à partir d'un virus intégré et être ainsi à l'origine des manifestations du DRESS, une lignée lymphocytaire B établie à partir d'un patient portant le CIHHV-6 a été traitée par 4 molécules incriminées dans le DRESS. Deux transcrits d'HHV-6 ont été détectés de manière aléatoire et indépendante du traitement. La protéine p41, n'a pas été détectée, montrant que ces molécules n'entraînent pas de réactivation à partir du virus intégré et n'utilisent pas ce mécanisme pour entraîner le DRESS. L'étude d'une large cohorte de 414 patients atteints de pathologies hématologiques ou néphrologiques a révélé une prévalence de 2% de CIHHV-6 (5/249 hématologie ; 0/165 néphrologie). Le chromosome 17 a été la cible d'intégration du HHV6 chez 3 patients. La localisation de l'intégration s'est révélée être en région juxtaposée à celle subtélomérique détectée par FISH, quel que soit le chromosome concerné. Une perte dans la région subtélomérique ainsi qu'une amplification des télomères du chromosome porteur ont été détectées de manière récurrente. Un dysfonctionnement télomérique et une instabilité chromosomique ont été mis en évidence. Nous avons rapporté que deux de nos lignées portant du CIHHV-6 utilisent vraisemblablement les deux voies connues pour maintenir les télomères : l'expression de la télomérase et aussi un profil d'ALT.

Mots clés : *HHV-6, CIHHV-6, DRESS, réactivation, intégration, instabilité génomique.*

Genomic integration of human herpesvirus 6 (HHV-6): chromosomal changes associated and possible reactivation in the presence of drugs

Human herpesvirus type 6 (HHV-6) is a ubiquitous virus that exists as 2 types A and B.

This virus is able to integrate in human chromosome telomeres, with globally 1% of prevalence; the impact of this integration is not yet known. HHV-6 reactivation was associated to the Drug hypersensitivity syndrome or DRESS. We show that detection and monitoring of human herpesvirus reactivation in DRESS patients are possible via quantitative PCR technic applied on saliva. The interpretation of results can be different according to the type of analyzed virus.

With the purpose of knowing if the HHV-6 can be reactivated from an integrated virus and so be the cause of DRESS symptoms, a B cell line, established from a patient who has the CIHHV-6, was treated by four molecules incriminated in the DRESS. Two HHV-6 transcripts were detected randomly and independently of treatment. The protein p41 was not detected, which shows that these molecules do not cause any reactivation since the integrated virus and do not use this mechanism to cause the DRESS.

The study of a wide cohort of 414 patients with hematological and nephrological diseases revealed a prevalence of 2% of CIHHV-6 (5/249 hematology; 0/165 nephrology). 3 patients had the integration into the chromosome 17. The site of integration using a double labeling viral probe/subtelomeric probe was found to be more precisely in subtelomeric region, regardless of the chromosome in question. The effect of the integration of HHV-6 on the cell was studied by FISH technics. We have detected repeatedly a loss in the subtelomeric region and a telomeres amplification in chromosome which carrying the CIHHV-6. A telomeric dysfunction and chromosomal instability have been demonstrated. We reported that two of our lines carrying the CIHHV-6 likely use the two known ways to maintain telomeres: the telomerase expression and a profile of ALT.

Keywords: *HHV-6, CIHHV-6, DRESS, reactivation, integration, genomic instability.*