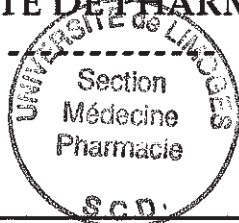


UNIVERSITE DE LIMOGES  
FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 1995



N° 21

RECHERCHE DU GENOME DE L'HERPESVIRUS DE TYPE 6  
AU COURS DE LYMPHOMES HODGKINIENS ET  
NON HODGKINIENS

THESE  
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE  
obtenu après soutenance du

MEMOIRE  
Du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Pharmacie

Présenté et soutenu publiquement  
le 14 Juin 1995 à 10 heures  
par

Francis HAZARD  
né le 07/02/1964 à Bethisy Saint Pierre (Oise)

JURY

Madame le Professeur BOSGIRAUD	Présidente
Madame le Professeur BILLAUDEL	Juge
Monsieur le Professeur DENIS	Juge
<u>Madame le Docteur RANGER-ROGEZ</u>	Juge

-----

## UNIVERSITE DE LIMOGES

## FACULTE DE PHARMACIE

<b><u>DOYEN DE LA FACULTE :</u></b>	Monsieur le Professeur RABY Claude
<b><u>ASSESEURS :</u></b>	Monsieur le Professeur GHESTEM Axel Monsieur DREYFUSS Gilles - Maître de conférences
<b><u>PROFESSEURS :</u></b>	
BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE
BERNARD Michel	PHYSIQUE-BIOPHYSIQUE
BOSGIRAUD Claudine	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
	PARASITOLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE
	CHIMIE THERAPEUTIQUE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
GHESTEM Axel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
HABRIOUX Axel	BIOCHIMIE FONDAMENTALE
LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
LEFORT DES YLOUSES Daniel	PHARMACIE GALENIQUE
MOESCH Christian	HYGIENE
OUDART Nicole	PHARMACODYNAMIE
PENICAUT Bernard	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
RABY Claude	PHARMACIE CHIMIQUE ET CHIMIE ORGANIQUE

**SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES  
ADMINISTRATIFS**

POMMARET Maryse

Je remercie Madame le Professeur Bosgiraud qui me fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur Denis qui m'a accepté au sein du laboratoire hospitalier de Bactériologie-Virologie et dont la rigueur et l'énergie communicatives m'ont aidé dans la réalisation de ce travail.

Je le remercie d'avoir accepté de siéger dans ce jury.

J'exprime ma reconnaissance à Madame le Professeur Billaudel qui me fait l'honneur de siéger dans ce jury.

Je remercie vivement Madame le Docteur Ranger-Rogez qui a encadré ce travail, pour sa gentillesse, ses conseils et son dynamisme qui m'ont soutenu tout au long de cette étude.

Je la remercie pour l'expérience qu'elle m'a permis d'acquérir et pour la confiance qu'elle m'a témoigné.

Je remercie très chaleureusement Magali pour sa gentillesse, Mireille, Nathalie, Christian, Jean-Pierre et Thierry pour leur soutien et leur amitié ainsi que tout le personnel des laboratoires de Virologie et Bactériologie pour leur accueil chaleureux et le laboratoire d'Anatomie-pathologique pour son aimable concours à ce travail.

A la mémoire de mon grand-père, ma grand-mère...

A ma grand-mère...

A mes parents, beaux parents...

A ma soeur, ma nièce Rebecca...

A ma femme Nathalie...

A mes filles, Amandine et Marion,  
qu'elles soient remerciées pour les instants de calme qu'elles ont  
sacrifiés à cette thèse.

## PLAN

### INTRODUCTION

### RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

#### 1 - RAPPELS SUR L'HERPESVIRUS DE TYPE 6 (HHV-6)

1-1- Famille des herpesvirus, classification

1-2- Morphologie et structure d'HHV-6

1-2-1- Morphologie

1-2-2- Génome

1-2-3- Protéines traduites

1-3- Epidémiologie

1-3-1- Répartition et prévalence

1-3-2- Modes de contamination

1-3-3- Cycle réplicatif

1-4- Pouvoir pathogène

1-5- Diagnostic biologique

1-5-1- Méthodes

1-5-2- Intérêt

#### 2 - RAPPELS SUR LES LYMPHOMES

2-1- Généralités

2-2- Lymphomes de Hodgkin, classification

2-3- Les lymphomes non hodgkiniens, classification

### 3 - HHV-6 ET LYMPHOMES

3-1- Arguments en faveur d'un rôle viral dans cette pathologie

3-2- Stratégies utilisables pour rechercher une relation virus-lymphomes

3-3- Résultats récents publiés sur HHV-6 et lymphomes

## MATERIEL ET METHODES

### 4 - MATERIEL

4-1- Les patients

4-1-1- Choix des patients

4-1-2- Classifications utilisées

4-1-3- Répartition

4-1-4- Types de prélèvements

4-2- Les prélèvements : stockage, conservation

4-2-1- Fragments tissulaires, biopsies

4-2-2- Moëlle

4-2-3- Sérums

4-3- Les témoins

4-3-1- Les témoins positifs

4-3-2- Les témoins négatifs

### 5 - METHODES

5-1- Extraction de l'ADN à partir des tissus

5-1-1- Préparation des échantillons tissulaires

5-1-2- Lyse cellulaire

5-1-3- Extraction organique

- 5-1-4- Concentration des acides nucléiques par précipitation à l'éthanol
- 5-1-5- Lyse cellulaire sans extraction
- 5-2- Extraction d'ADN dans les échantillons sériques
- 5-3- Dosage des ADN extraits
- 5-4- Réactions de polymérisation en chaîne
  - 5-4-1- Généralités
  - 5-4-2- Amorces utilisées
  - 5-4-3- Conditions réactionnelles
  - 5-4-4- Cas particulier de la PCR nichée
- 5-5- Electrophorèse des produits amplifiés
- 5-6- Transfert sur membrane de nylon
- 5-7- Hybridations
  - 5-7-1- Les sondes utilisées
  - 5-7-2- Marquage des sondes à la digoxigénine
  - 5-7-3- Réactions de préhybridation et d'hybridation
  - 5-7-4- Lavages
  - 5-7-5- Révélation par chimiluminescence
- 5-8- Typage des souches par analyse de restriction

## 6 - RESULTATS

- 6-1- Concernant les échantillons tissulaires
  - 6-1-1- Comparaison extraction/lyse, amplification du locus dQA1 du système HLA
  - 6-1-2- Résultats : technique de Collandre
  - 6-1-3- Résultats : technique de Cone modifiée
  - 6-1-4- Résultats obtenus par PCR nichée
  - 6-1-5- Typages
  - 6-1-6- Problème des inhibiteurs



6-2- Résultats concernant les sérums

6-2-1- Résultats : technique empruntée à H. Collandre

6-2-2- Résultats : technique de Cone modifiée

6-3- Résultats concernant les moëlle

6-4- Résultats : système MIE4/MIE5

7 - DISCUSSION

7-1- Détection du génome d'HHV-6 dans les biopsies tissulaires  
par amplification génique

7-1-1- Généralités

7-1-2- Echantillonnage

7-1-3- Traitement des prélèvements

7-1-4- Qualité des ADN extraits

7-1-5- Choix des systèmes d'amplification

7-1-6- Discussion des résultats de PCR

7-1-7- Typage des souches virales

7-2- Discussion des résultats des sérums

7-3- Discussion des résultats des moëlle

7-4- Discussion sur les discordances entre la technique de Cone modifiée  
et la technique empruntée à Collandre

7-5- Que penser de la présence du génome d'HHV-6 dans les lymphomes  
hodgkiniens et non hodginiens ?

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

## LISTE DES ABREVIATIONS

A	:	Adénine
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
BSA	:	Sérum albumine bovine
C	:	Cytosine
CMVH	:	Cytomégalovirus humain
dATP	:	Désoxyadénosine triphosphate
dNTP	:	Désoxynucléotide triphosphate
DO	:	Densité optique
dUTP	:	Desoxyuridine triphosphate
EDTA	:	Ethylène diamine tétracétique acide
EBV	:	Epstein-Barr Virus
G	:	Guanine
HHV-6	:	Human Herpès Virus-6
HLA	:	Human Leucocyte Antigens
HSV	:	Herpès Simplex Virus
kb	:	Kilobase
LMNH	:	Lymphomes malins non hodgkiniens
pb	:	Paire de base
PCR	:	Réaction de polymérisation en chaine
rpm	:	Rotations par minute
SDS	:	Sodium dodécyl sulfate
SIDA	:	Syndrome d'Immunodéficience acquise
T	:	Thymine
UV	:	Ultraviolet
VIH (HIV)	:	Virus de l'immunodéficience humaine
VZV	:	Varicelle-Zona Virus

## INTRODUCTION

En 1986, Salahuddin étudiant des cultures de lymphocytes du sang périphérique de patients atteints de syndromes lymphoprolifératifs isolat un nouveau virus. Ce virus initialement dénommé HBLV pour "Human B Lymphotropic Virus" par analogie au HTLV ("Human T Lymphotropic Virus") fut rapidement rattaché à la famille des herpesviridae de par sa structure et ses propriétés antigéniques et génomiques. Son tropisme cellulaire T fut ensuite rapidement reconnu.

Jusqu'en 1988, il ne fut pas connu de pathologie associée à HHV-6 et c'est Yamanishi qui, à cette date a démontré que la primo-infection à HHV-6 entraînait chez le jeune enfant une maladie infantile bien connue des pédiatres : l'exanthème subit. La recherche de l'étendue du pouvoir pathogène de HHV-6 a suscité depuis lors de nombreux travaux. Le virus étant capable de se maintenir à l'état latent dans les lymphocytes et étant doué d'un pouvoir transformant in vitro, il apparaît légitime de rechercher le rôle de celui-ci dans les lymphoproliférations.

Dans cette optique, la recherche du génome d'HHV-6 a été menée par PCR sur un large échantillonnage de lymphomes afin d'évaluer une possible implication du virus dans ces pathologies.

## RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

### 1 - RAPPELS SUR L'HERPESVIRUS DE TYPE 6 (HHV-6)

Au cours des quatre vingt dernières années, sept virus ont été isolés chez l'homme, constituant une famille très impliquée en pathologie humaine.

La famille des Herpesvirus humains, dont cinq membres étaient déjà bien connus, les virus Herpès simplex de types 1 et 2 (HSV1 et HSV2), le virus de la varicelle et du zona (VZV), le cytomégalovirus (CMV) et le virus d'Epstein-Barr (EBV), s'est enrichie récemment de deux nouveaux membres, par la découverte de l'herpèsvirus humain de type 6 (HVH-6) en 1986 et de l'herpèsvirus humain de type 7 (HVH-7) en 1990, des travaux très récents (17) ont conduits à identifier des séquences génomiques dans des sarcomes de Kaposi qui définiraient un huitième herpesvirus.

Le sixième herpèsvirus humain a été découvert en 1986 dans le laboratoire de Gallo par Salahuddin (70) à l'occasion de cultures de lymphocytes du sang périphérique, pratiquées dans l'intention d'isoler des rétrovirus. Les premiers isolats venaient de six malades atteints de divers syndromes lymphoprolifératifs dont deux étaient, par ailleurs, porteurs du virus de l'immunodéficience humaine de type 1. La multiplication de ce nouveau virus se manifestait par un effet cytopathogène sur les lymphocytes en culture, non évocateur d'un rétrovirus. De plus, aucune activité de transcription inverse n'était détectable.

Ce virus fut décrit comme infectant de manière privilégiée les lymphocytes B et donc dénommé : "Human B-cell Lymphotropic Virus" (HBLV) par analogie au virus HTLV (Human T-cell Lymphotropic Virus) précédemment découvert.

En fait, des études ultérieures montrèrent une prédominance d'antigènes viraux associés aux cellules T (28, 52).

L'utilisation de la microscopie électronique sur des préparations de cellules infectées (9) mit en évidence des particules virales ayant la morphologie de virus de

la famille des Herpesviridae. Des essais de caractérisation du virus grâce à des anticorps de référence et des études génomiques à l'aide de sondes moléculaires (41) conduisirent à la conclusion qu'il s'agissait d'un nouvel herpèsvirus humain différent des cinq autres déjà connus et celui-ci fut dénommé HHV-6.

### 1-1- FAMILLE DES HERPESVIRUS, CLASSIFICATION

Les Herpesviridae constituent une importante famille virale dont on retrouve des représentants chez des espèces très diverses allant des mollusques jusqu'à l'homme, les herpesvirus humains actuellement connus sont au nombre de huit.

Ces virus ont en commun des caractères structuraux. Ils possèdent un ADN bicaténaire linéaire de grande taille renfermé dans une nucléocapside icosaédrique entourée elle-même d'une enveloppe dérivant de la membrane nucléaire de la cellule hôte. Celle-ci leur confère une sensibilité à l'éther et aux solvants des lipides.

Ils ont en outre, en commun (64), à des degrés divers, des caractères généraux de réplication et de maturation :

- les génomes sont formés dans le noyau à partir d'intermédiaires concatamériques par des clivages spécifiques et des recombinaisons,
- ils ont tous la possibilité d'établir des infections latentes ou persistantes, dans lesquelles l'expression du génome viral peut être hautement restreinte,
- leur cycle productif est identique.

La famille des Herpesviridae est divisée en trois sous-familles (alpha, beta, et gamma herpesvirinae) en fonction principalement de leurs caractères de croissance in vitro et de leurs sites de latence in vivo (tableau 1).

L'Herpèsvirus-6 avait d'abord été classé en raison de son lymphotropisme, dans les alpha-herpèsvirinae aux côtés de l'EBV mais des études antigéniques et des similitudes génétiques (44, 55) ont conduit à placer HHV-6 avec le CMV, dans la sous-famille des beta-herpèsvirinae.

Sous-famille	Représentant chez l'homme	Culture in vitro	Durée du cycle de reproduction	Site de latence	Taille du génome	G+C
alpha herpèsvirus	HSV-1 (Herpès-1) HSV-2 (Herpès-2) VZV (Herpès-3)	Nombreux systèmes cellulaires Fibroblastes humains	8 - 14 heures 24 - 36 heures	Ganglions sensitifs Ganglions sensitifs Ganglions sensitifs	152 kb 152 kb 125 kb	67 % 69 % 46 %
beta herpèsvirus	CMVH (Herpès-5)	Fibroblastes humains	48 - 96 heures	Lymphocytes, cellules de l'épithélium des vaisseaux et des glandes salivaires	229 kb	57 %
	HHV-6 (Herpès-6)	Lymphoblastes et lymphocytes humains	5 jours	Lymphocytes, cellules épithéliales des glandes salivaires	170kb	42 %
	HHV-7 (Herpès-7)	Lymphoblastes et lymphocytes humains	5 jours	Glandes salivaires ?	145 kb	?
gamma-herpèsvirus	EBV (Herpès-4)	Cellules lymphoblastoïdes humaines	36 - 60 heures	Lymphocytes B Glandes salivaires	172 kb	60 %

TABLEAU 1: PRINCIPAUX CRITERES DE CLASSIFICATION DES HERPESVIRUS HUMAINS

## 1-2- MORPHOLOGIE ET STRUCTURE D'HHV-6

### 1-2-1- MORPHOLOGIE

L'HHV-6 comme les autres herpèsvirus est un virus enveloppé de grande taille, de 160 à 210 nm de diamètre, grossièrement sphérique. L'enveloppe contient une nucléocapside protéique isocaédrique, de 95 à 100 nm de diamètre, composée de 162 capsomères visibles par coloration négative. L'espace entre la nucléocapside et l'enveloppe est occupé par une substance amorphe, le tégument, qui peut être réparti de façon asymétrique. L'enveloppe est surmontée de spicules glycoprotéiques.

Le génome viral, contenu dans la nucléocapside, est un acide désoxyribonucléique (ADN) bicaténaire linéaire, long de 170 kilobases, associé à une structure en forme de tore.

### 1-2-2- GENOME

L'analyse génétique du virus a tout d'abord fait appel à la digestion du génome viral par des enzymes de restriction et les fragments obtenus ont été clonés dans différents vecteurs avant d'être utilisés pour des épreuves d'hybridation en Southern blot. Les résultats de ces études ont fourni les premières cartes de restriction du génome viral, les fragments clonés étant par la suite, utilisés dans des réactions de séquençage.

Le génome viral n'est toutefois encore que partiellement séquencé.

Il s'agit d'un ADN bicaténaire, linéaire, dont la longueur est estimée de 162 à 170 kb selon les isolats. Il possède une composition en base G+C de 43 %, chiffre le plus faible observé chez les herpèsvirus humains connus. Une longue séquence unique de 141 kb est flanquée à chacune de ses extrémités d'unités directement répétées de même orientation, nommées DRL ("Direct Repeat" de gauche) et DRR ("Direct Repeat" de droite) (figure 1), d'une longueur comprise entre 10,1 et 13,2 kb

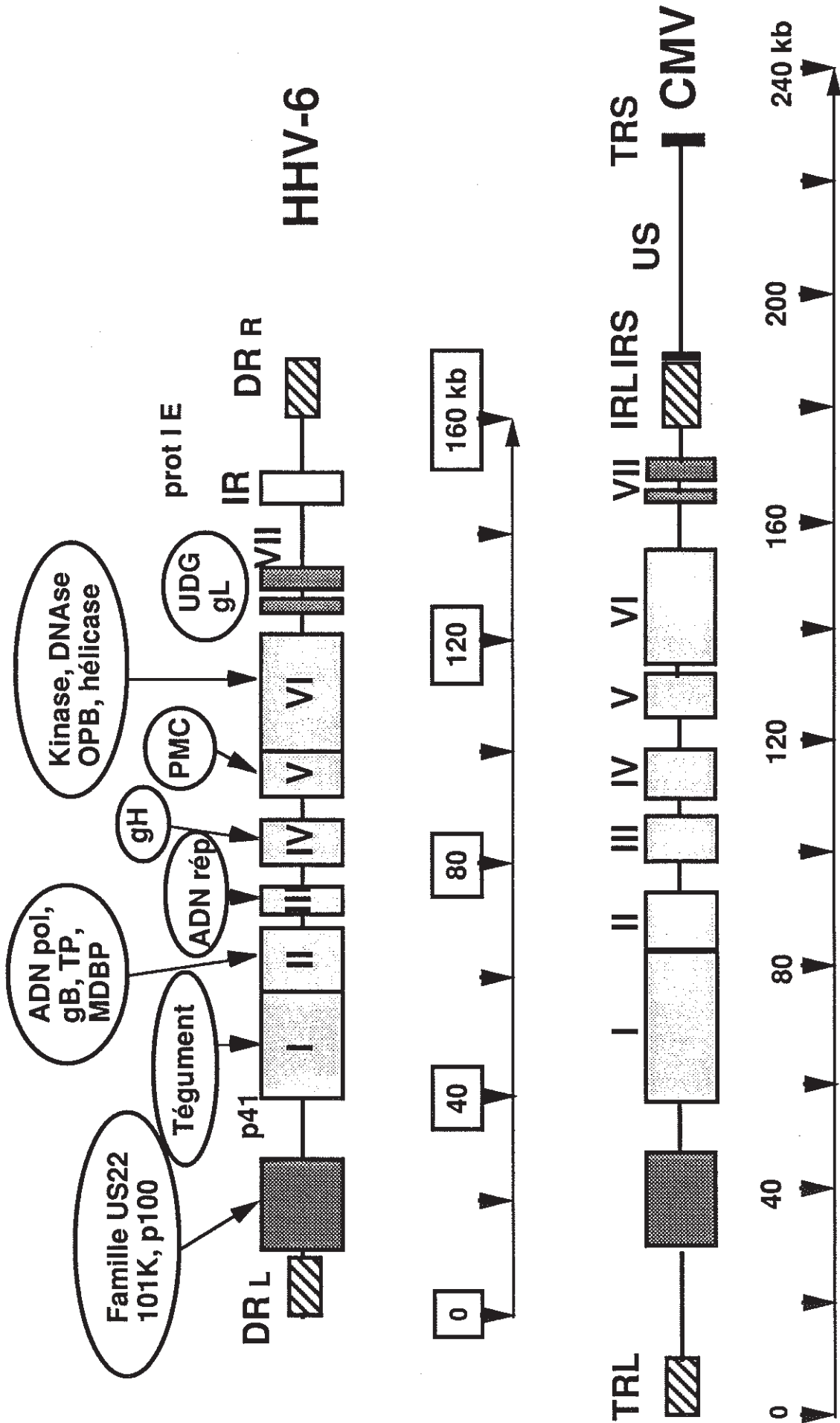


Figure 1 : Schéma du génome d'HHV-6



riches en G+C (47, 53). Ces éléments DR ont été en partie séquencés (33, 44, 53), un élément répété, GGG TTA y a été identifié. Cet élément GGG TTA est répété en tandem 15 à 60 fois dans la partie droite des séquences DR et de façon imparfaite, interrompue par l'interposition de deux hexomères dans la partie gauche. Ces répétitions sont semblables aux répétitions télomériques humaines et sont également retrouvées dans le génome du virus de Marek.

Des travaux menés sur des oligonucléotides (36) pourvus de séquences télomériques ayant montré la possibilité que ces constructions soient reconnues par la télomérase a conduit certains auteurs (33) à envisager la persistance possible du génome d'HHV-6 à l'état de minichromosome se répliquant au rythme de l'ADN cellulaire. D'autres auteurs (38b) au contraire, proposent une possible intégration par ce biais.

Immédiatement en aval de ces régions, chaque unité DR est terminée par deux sites, homologues aux séquences de clivage et d'empaquetage des virus HSV-1 et CMV ; dans la partie gauche un site pac-1 et dans la partie droite un site pac-2.

Entre ces unités DR, la séquence unique d'HHV-6 de grande taille est interrompue par une séquence répétée interne (IR : "Internal Repeat") constituée de 25 copies d'un motif de 105 à 110 pb selon l'isolat, qui aurait une fonction stimulatrice de la transcription.

Pour l'essentiel, la séquence unique est colinéaire avec la région unique du CMVH. La comparaison des séquences complètes, des génomes de HSV-1, VZV, EBV et CVMH a dégagé la notion d'une région très conservée appelée core central, comprenant les principaux gènes structuraux et gouvernant la réplication. Environ quarante gènes sont ainsi conservés et regroupés en sept blocs dont l'organisation sur le génome est fonction de la sous famille et en relation avec les propriétés biologiques, les membres d'une même sous-famille possèdent, en outre, quelques gènes qui leurs sont propres. Ces blocs de gènes chez HHV-6 sont colinéaires avec ceux du CMVH.

A l'heure actuelle, un certain nombre de gènes est identifié grâce à des homologies de structure et certains sont séquencés. On connaît par exemple les positions occupées par les gènes codant pour la grosse protéine de tégument, l'ADN polymérase, la glycoprotéine B (gB), l'ADN répliqueuse, la glycoprotéine H (gH), la protéine majeure de capsid, "l'origin binding protein" (homologue d'une protéine des alphaherpesvirus, n'existant pas chez CMVH), l'uracyl glycosylase... (38, 40, 48, 72).

S'il existe une très grande homologie des séquences nucléotidiques entre tous les isolats d'HHV-6, une analyse plus fine a cependant démontré leur hétérogénéité génétique confirmée par des études fondées sur la PCR (6, 18, 84), mais aussi par des propriétés phénotypiques telles que la possibilité de multiplication dans certaines lignées cellulaires ou par des profils de réactivité différents vis-à-vis d'anticorps monoclonaux.

Deux grands types de profils se sont ainsi dégagés : HHV-6A et HHV-6B.

Le type A est rencontré moins fréquemment que le type B (un isolat sur trois en moyenne), le prototype en est la souche GS, isolat initial de Salahuddin à rapprocher de la souche U1102 très utilisée pour les études de séquence et des souches SIE et TAN. Ces isolats possèdent des exigences de culture moindre pouvant être adaptées sur lignées cellulaires alors que le type B comprend des souches exigeant pour leur culture in vitro des lymphocytes très stimulés : souches Z29, HST...

### 1-2-3- PROTEINES TRADUITES

Les premiers ARN transcrits correspondent aux gènes "très précoces" (ou IE pour "Immediate-early") (56), les protéines traduites agiraient en tant que facteurs transrégulateurs de la transcription des gènes viraux "précoces retardés". Ces gènes transcrits avant la répliqueuse de l'ADN viral et avant les gènes "tardifs", coderaient pour des protéines pouvant se lier à l'ADN, tel le gène de la phosphoprotéine 41,

homologue du gène UL44 du CMVH (2) qui coderait pour une protéine stimulant l'activité ADN polymérase.

Les gènes tardifs codent principalement pour des protéines et glycoprotéines structurales et pour des enzymes. Parmi ces protéines, citons :

a) Les glycoprotéines d'enveloppe : trois sont conservées entre CMVH et HHV-6. Leurs fonctions sont multiples, elles jouent un rôle dans l'adsorption du virus à la surface de la cellule, dans la fusion entre l'enveloppe et la membrane cellulaire de l'hôte. En outre, elles sont à l'origine de l'élaboration d'anticorps neutralisants.

La glycoprotéine B (gB), protéine majeure d'enveloppe, est une protéine transmembranaire de 112 kDa (30).

La glycoprotéine H (gH) est une protéine de 102 kDa jouant un rôle dans l'infectivité (59) mais faiblement immunogène.

La glycoprotéine L (gL), est une protéine de 40 kDa capable de s'associer à la gH pour former un complexe. La gL hors de ce complexe n'est pas immunogène (49).

b) Les protéines du tégument : la mieux connue est la pp239 ou grosse protéine de tégument (40). Elle présente une faible homologie avec les séquences des protéines de tégument de CMVH.

c) Les protéines majeures de capsid : la p135 d'HHV-6 présenterait une homologie de séquence importante avec celle des autres herpèsvirus (48). Une autre protéine d'environ 100 kDa serait plus spécifique (83).

d) Les enzymes : un certain nombre de gènes codant pour les enzymes responsables du métabolisme ont été identifiés. La séquence de ceux-ci est très conservée entre les différents herpès ce qui peut s'expliquer par leurs fonctions mêmes.

### 1-3- EPIDEMIOLOGIE

#### 1-3-1- REPARTITION ET PREVALENCE

Les études sérologiques ont montré que l'infection à HHV-6 est largement répandue dans le monde entier et la majorité de la population adulte, hormis quelques particularités locales, possède des anticorps contre ce virus.

Les discordances entre les résultats rapportés ont tendance à s'estomper avec l'emploi des techniques d'immunofluorescence indirecte (IF) ou anticomplément (ACIF) pour donner des chiffres compris entre 60 et 80 % de séroprévalence (3, 57, 63).

L'infection strictement humaine est acquise tôt dans l'enfance, les anticorps maternels transmis passivement décroissent pour atteindre un minimum à 4-5 mois puis augmentent rapidement (86), les nourrissons contractant le virus entre 6 mois et un an et présentant alors une séroprévalence et des titres moyens avoisinant les taux rencontrés chez les adultes (Figure 2).

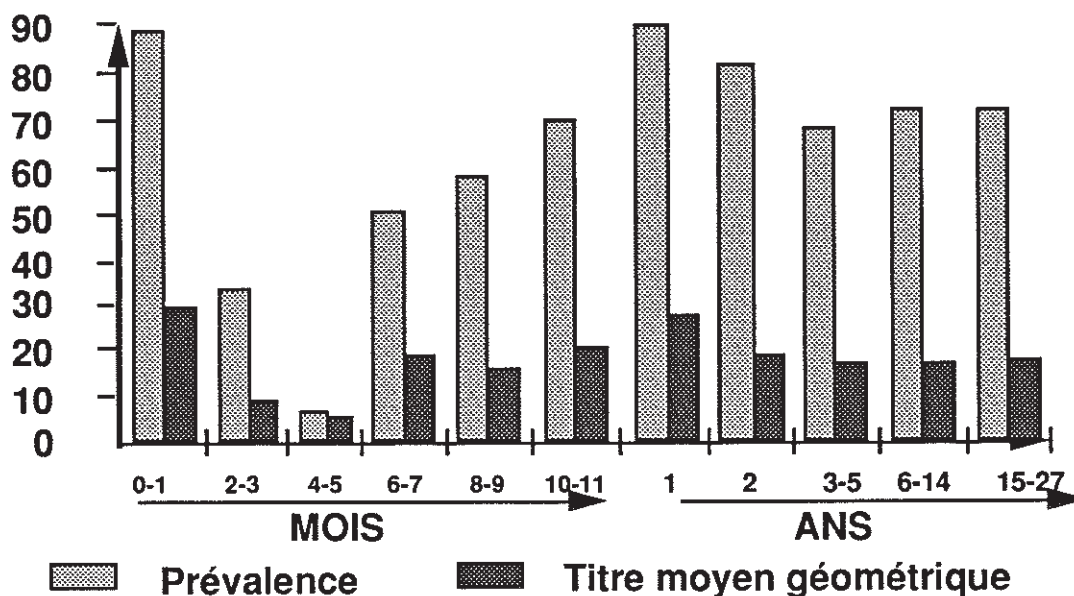


Figure 2 : Prévalence et titre moyen géométrique des anticorps anti-HHV-6 en fonction de l'âge chez les sujets sains (d'après Yoshikawa)

### 1-3-2- MODES DE CONTAMINATION

Les contaminations in utero sont exceptionnelles (quelques cas décrits avec présence d'IgM dans le sang du cordon) (29) mais elles peuvent conduire à une mort foetale.

L'absence de virus dans le lait maternel, mais sa mise en évidence par culture et PCR dans la salive (22, 35) rend probable un mode de transmission de la mère ou de l'entourage à l'enfant par des gouttelettes de salive qui contiendraient le virus.

Les sources de virus seraient ainsi les enfants et les adultes de l'entourage immédiat, infectés chroniquement et présentant de temps à autre des réactivations.

Après la primo-infection, le virus reste à l'état latent dans les cellules mononuclées sanguines (lymphocytes T en particulier) et dans les cellules épithéliales en particulier des glandes salivaires. Cette composante lymphocytaire fait que la plupart des organes vasculaires sont potentiellement porteurs du virus et que la transplantation d'organes peut permettre sa transmission (64). La présence occasionnelle du virus dans le sang n'exclut pas la transmission iatrogène par transfusion.

Des résultats récents font enfin état de la présence d'ADN viral dans des sécrétions vaginales (45).

### 1-3-3- CYCLE REPLICATIF

Le cycle productif serait identique à celui des autres membres de la famille (Figure 3). Certaines étapes ont pu être visualisées par microscopie électronique ; des nucléocapsides (vides ou pleines) ont été observées dans le noyau de cellules infectées. Des compartiments intranucléaires dénommés "tégusomes" dérivants d'invaginations cytoplasmiques ont été observés (69). Ces structures comportent deux membranes et contiennent des ribosomes ; les capsides hors de ces tégusomes sont nues alors qu'elles apparaissent diversement tégumentées dans ces structures et

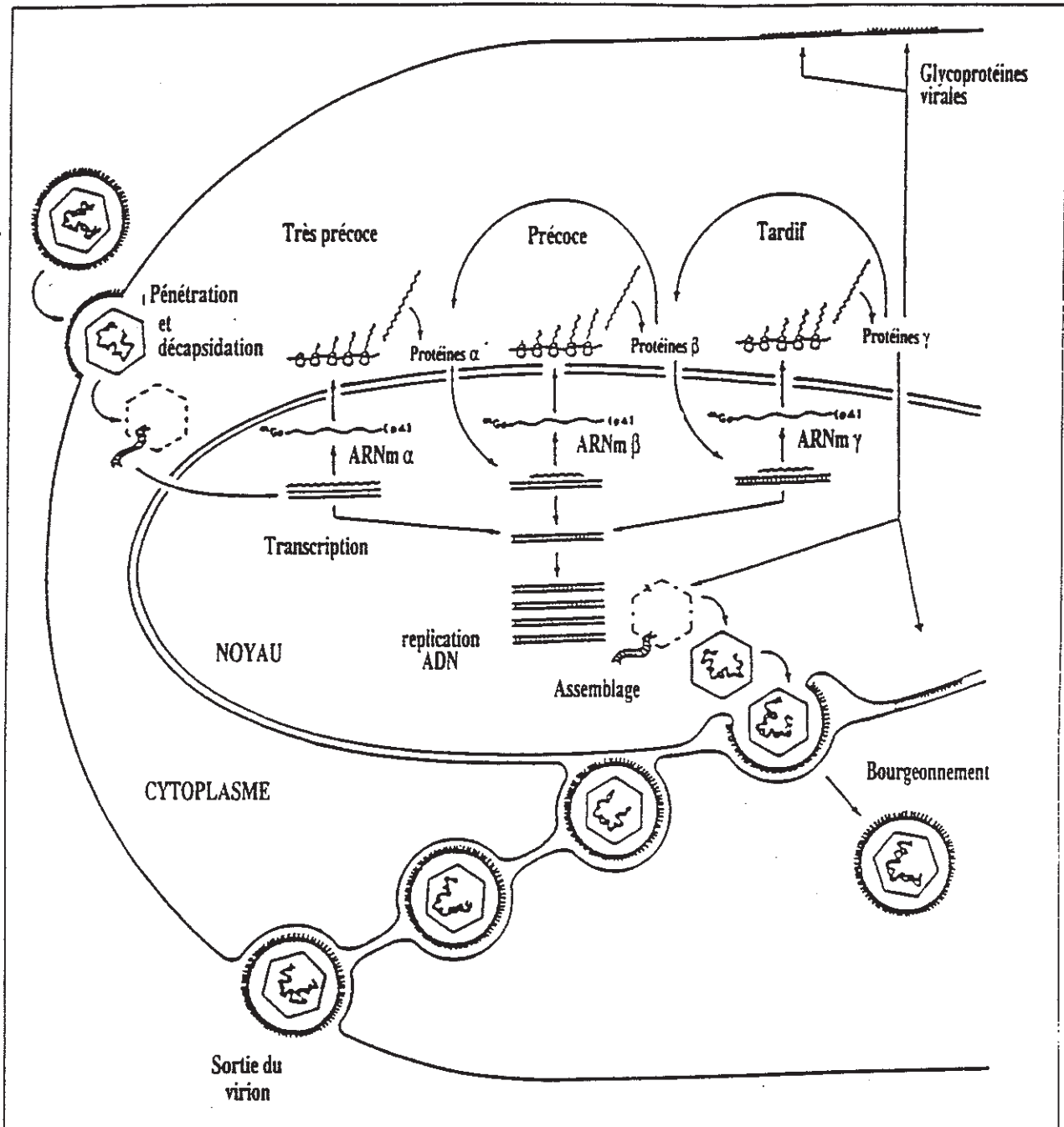


Figure 3 : Cycle productif des herpèsvirus

uniformément tégumentées dans le cytoplasme. L'enveloppement de ces particules se ferait par bourgeonnement dans des inclusions cytoplasmiques qui gagneraient la membrane plasmique.

Le modèle suivant a été proposé pour la production des particules infectieuses (53) :

la synthèse d'ADN viral et l'assemblage des capsides se produisent dans le noyau,

- les nucléocapsides contenant l'ADN viral acquièrent un enveloppement en entrant dans les tégusomes intranucléaires et le tégument se forme progressivement,

- les virions tégumentés sont enveloppés dans des vacuoles cytoplasmiques pour devenir des virions matures,

- les vacuoles fusionnent avec la membrane cellulaire pour relâcher les particules infectieuses,

- la production des particules virales entraîne la lyse de la cellule hôte.

Une étude récente (19) semble toutefois vouloir remettre en question le processus final de relargage des particules virales en mettant en évidence un stade où le virion resterait accroché, juxtaposé à la membrane cellulaire.

#### **1-4- POUVOIR PATHOGENE**

La première pathologie associée à HHV-6 a été démontrée en 1988 : il s'agit d'une maladie infantile, l'exanthème subit ou roséole ayant pu être lié à la primo-infection par le virus (86). cette pathologie serait toujours provoquée par le type B bien qu'il ait été décrit des associations types A et B.

L'expression de la primo-infection à HHV-6 n'est pas constante, mais plus fréquente si le sujet n'est pas un enfant (62). On observe des syndromes mononucléosiques rares mais parfois sévères chez l'adulte. Des hépatites aiguës

voire fulminantes survenant aussi bien chez l'enfant et l'adulte, souvent graves et pouvant engager le pronostic vital.

Des atteintes neurologiques ont été également associées à une primo-infection. Il s'agit de méningites lymphocytaires ou de méningo-encéphalites, spontanément régressives, sans séquelles.

Récemment, des convulsions fébriles survenant chez l'enfant ont été associées à une primo-infection à HHV-6.

Le virus a été soupçonné de jouer un rôle en tant que cofacteur dans la progression des sujets VIH séropositifs vers le SIDA sur les résultats d'études conduites in vitro (64). Cependant, des études séroépidémiologiques ne mettent pas en évidence ce phénomène (65). Il n'y a en effet pas de différence statistiquement significative entre les séoprévalences des anticorps anti-HHV-6 obtenues chez les patients VIH-1 ou VIH-2 séropositifs, et celles des groupes témoins séronégatifs: les titres moyens mesurés fournissent les mêmes résultats.

A l'instar des autres herpèsvirus, HHV-6 est susceptible de réactivations, celles-ci pouvant potentiellement être à l'origine de pathologies. Cette hypothèse semble vraisemblable dans les cas suivants :

- HHV-6 entraîne chez les immunodéprimés des pneumopathies interstitielles sévères voir mortelles en particulier chez les transplantés (21), des rétinites et des infections disséminées chez les patients atteints de SIDA,

- HHV-6 serait impliqué dans le syndrome de fatigue chronique récemment décrit (40) qui associe une asthénie prolongée de plus de six mois avec des adénopathies, hyperthermie, arthralgies, myalgies...

Cependant, la réactivation d'HHV-6 pourrait tout aussi bien être la conséquence de ce syndrome que sa cause.

HHV-6 ayant été retrouvé dans le tractus génital et mis en évidence à posteriori par PCR sur des échantillons provenant de cancers du col utérin, certains auteurs ont estimé qu'il pourrait jouer un rôle de cofacteur aux côtés des papillomavirus dans les processus de cancérogénèse (82).



Le virus restant latent dans les cellules mononuclées sanguines (lymphocytes T en particulier) et étant doué d'un pouvoir transformant expérimental, il est légitime de rechercher son rôle éventuel dans les lymphoproliférations et cet aspect sera plus particulièrement développé dans la suite de ce travail.

## 1-5- DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

### 1-5-1- METHODES

Le diagnostic de l'infection à HHV-6 peut s'envisager de différentes façons :

\* par un diagnostic direct, cherchant à révéler la présence du virus ou de ses constituants dans des échantillons biologiques.

- La recherche du virus peut s'entreprendre sur des lymphocytes sanguins périphériques, des biopsies ou des prélèvements de salive. Une culture primaire peut être tentée sur des cellules permissives en présence de substances activatrices mais une coculture de lymphocytes du patient/lymphocytes de sang de cordon ou de lymphocytes HHV-6 négatifs préactivés par la phytohémagglutinine et l'interleukine-2 est de meilleur rendement. La croissance est révélée par un effet cytopathogène caractéristique qui peut être identifié par immunofluorescence ou amplification génique, ces deux méthodes pouvant permettre le typage d'HHV-6.

- La recherche d'antigènes viraux peut être effectuée sur des coupes tissulaires en utilisant des anticorps monoclonaux,

- Recherche du génome viral : l'hybridation in situ peut être utilisée à l'aide de sondes spécifiques marquées sur des coupes tissulaires. On peut également rechercher le génome viral après amplification génique (PCR) dans la salive, le sérum, les lymphocytes périphériques ou des biopsies tissulaires. De nombreux systèmes d'amplification ont été décrits (20, 34, 75) et les zones amplifiées diffèrent selon les auteurs. La zone des gènes très précoces sujette à une grande variabilité est

généralement évitée. L'identification formelle des produits amplifiés peut faire appel soit à des hybridations par des sondes spécifiques, soit à la réalisation d'une seconde réaction de PCR dite "nichée" (ou nested PCR). Le virus étant présent en général en faible quantité, cette seconde étape assure également une augmentation de la sensibilité des tests. L'amplification d'un fragment de taille relativement importante peut, s'il est convenablement choisi, permettre le typage des deux types de souches A et B ; les séquences complémentaires des oligonucléotides amorces doivent alors être invariantes entre les deux groupes tandis que les séquences interamorces présentent une divergence induisant un polymorphisme de restriction facilement détectable par une simple digestion et une migration sur gel (6).

\* Le diagnostic indirect : il consiste à rechercher la présence d'anticorps anti HHV-6 dans le sérum des patients, plusieurs techniques ont été décrites :

- l'immunofluorescence indirecte est à l'heure actuelle la méthode de choix. Elle est pratiquée sur des lames sensibilisées par des cellules infectées par le virus (en général la souche GS, isolat initial de Salahuddin), une meilleure reproductibilité des résultats est obtenue en utilisant des lignées cellulaires (comme HSB-2, lignée lymphoblastique T) de préférence à des lymphocytes périphériques d'adultes sains ou provenant de sang de cordon (64).

Cette technique peut permettre la détermination et la discrimination des IgG et des IgM, cette dernière recherche étant précédée d'un prétraitement des sérums pour éliminer le facteur rhumatoïde. Dans tous les cas, une étape initiale de saturation des lames est nécessaire afin d'éliminer des résultats faussement positifs engendrés par un accrochage non spécifique des immunoglobulines d'autant plus fréquent que le virus est capable d'induire l'expression de récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines (62).

L'apparition des IgM suit d'environ une semaine la primo-infection, le taux maximum étant atteint vers la troisième semaine pour décroître ensuite et disparaître vers deux mois. Les IgG apparaissent généralement un peu plus tardivement,

augmentent pour atteindre un plateau et décroissent ensuite lentement pour persister ensuite à taux faible dans nos pays. Ce schéma classique est cependant à relativiser et toute interprétation des résultats sérologiques doit tenir compte du fait que les IgM peuvent être retrouvés non seulement au cours des primo-infections mais aussi fréquemment au cours de réactivations. Ce n'est donc que chez le tout jeune enfant que le diagnostic de primo-infection pourra être fait en se basant sur la détection des IgM.

- L'immunofluorescence anticomplément (IFAC) a été parfois utilisée (68), elle serait d'interprétation plus aisée, en raison d'une diminution du bruit de fond, évitant les réactions faussement positives liées à la présence sur les cellules infectées, de récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines, le complément ne se fixant, pour sa part, que sur des complexes antigènes-anticorps.

- Les tests ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ont été souvent utilisés, conçus depuis différentes sources d'antigènes. Ils semblent fournir des résultats dissemblables et seraient moins sensibles que l'immunofluorescence (62). Ils sont réalisés sur lysat viral (73) ou sur protéines purifiées (39), la mise au point de tests utilisant des peptides synthétiques est en cours.

- La technique de neutralisation a été parfois utilisée. Elle permettrait de détecter l'apparition des anticorps au cours de la convalescence.

- Western blot et radioimmunoprécipitation pourraient servir de techniques de référence s'ils n'étaient difficilement réalisables en raison de la faible productivité virale qui ne permet pas l'obtention de protéines purifiées en quantité suffisante (64). Elles ont cependant été utilisées pour caractériser les protéines virales.

### 1-5-2- INTERET

L'isolement du virus après mise en culture est la technique la plus classique. Elle est applicable aux recherches dans les prélèvements les plus variés

(lymphocytes, biopsies, liquides biologiques...) et rend compte du potentiel infectieux réel, mais son rendement global est faible, vraisemblablement à cause d'une charge virale réduite dans les échantillons et d'une optimisation insuffisante des conditions de culture.

Les techniques de détection directe n'utilisant pas la culture, comme la détection des antigènes viraux par des anticorps monoclonaux, sur frottis ou coupes tissulaires qui peuvent être complétées par les techniques d'hybridation moléculaire in situ, permettent d'affirmer la présence du virus et ce, dans tel ou tel type cellulaire, ce qui peut présenter un grand intérêt dans les tentatives de liaison d'une pathologie à la présence du virus. Malheureusement, les résultats sont limités par les faibles concentrations virales dans les produits pathologiques.

La PCR permet, par sa grande sensibilité, la détection d'une très faible charge virale mais la signification des résultats positifs doit être interprétée avec soin. Une détection d'ADN viral ne peut être corrélée seule à une infection primaire ou à une réactivation. Après la primo-infection, de nombreux sujets hébergent le génome viral dans leurs lymphocytes et la détection d'ADN viral par PCR dans le sérum des patients pourrait être interprétée comme un témoin d'infection active, le virus se répliquant lysant les cellules et étant retrouvé à l'état libre dans le sérum.

L'utilisation de protocoles quantitatifs constitue également une solution à ces problèmes d'interprétation.

La sérologie présente l'intérêt d'être accessible à la plupart des laboratoires, mais les techniques ne sont pas encore toutes bien standardisées.

D'une manière générale, la production de protéines recombinantes et l'utilisation d'antigènes définis précoces et tardifs pourraient permettre d'étudier une infection sous un aspect dynamique (replicative ou latente).

L'existence de réactions croisées HHV-6/CMV est sujet de controverses et il est prudent d'interpréter la sérologie HHV-6 en connaissant la sérologie CMV.

## **2 - RAPPELS SUR LES LYMPHOMES**

### **2-1- GENERALITES**

Un lymphome est une tumeur composée de tissu lymphoïde typique développée soit dans les organes contenant déjà ce tissu (ganglions, rate, etc...), soit dans les organes qui en sont dépourvus.

### **2-2- LYMPHOMES DE HODGKIN, CLASSIFICATION**

La maladie de Hodgkin ou lymphogranulomatose maligne est une affection néoplasique du tissu lymphoïde.

Elle est caractérisée par la présence de cellules malignes de grande taille, les cellules de Sternberg généralement majoritaires, au sein d'un environnement lymphocytaire pouvant former un granulome inflammatoire et associé à un degré variable de fibrose (5).

Dans sa forme la plus courante, la maladie de Hodgkin est une macropolyadénopathie, avec des symptômes généraux, dont l'association est évocatrice. Cependant, dans environ 20 % des cas, ce sont ces symptômes seuls qui amènent le malade à consulter.

Le diagnostic de la maladie de Hodgkin repose donc sur l'examen histologique d'un ganglion ; la biopsie ganglionnaire est préférée à la ponction qui ne rend pas compte des modifications de l'architecture normale.

Le diagnostic posé, un bilan d'extension est réalisé. Celui-ci vise à rechercher les localisations des adénopathies, leur date d'apparition, et à déceler d'éventuelles localisations profondes sans manifestations fonctionnelles. Ce sont ces éléments qui permettent d'établir la forme clinique de la maladie et le stade atteint.

Le diagnostic et l'évaluation du pronostic de la maladie sont facilités par le recours à des classifications.

Ainsi, le diagnostic histologique peut s'appuyer sur la classification de Rye, la plus utilisée, qui selon les proportions des différents éléments (lymphocytes, granulomes, sclérose, richesse en cellules malignes) permet de distinguer quatre types histologiques (figure 4). Aucun classement des cellules de Hodgkin/cellules de Sternberg dans le système cellulaire hématopoïétique n'est disponible à partir des caractères phénotypiques.

Depuis le Symposium d'Ann Arbor (Michigan) en 1971, la maladie peut être classée en vue de l'établissement du pronostic et du traitement en quatre stades, selon le nombre des territoires ganglionnaires et des organes non lymphoïdes atteints (notés de I à IV). La présence ou l'absence de certains symptômes (fièvre, amaigrissement, sueurs nocturnes) est notée par l'ajout des lettres A ou B respectivement (figure 5), et une atteinte extra-ganglionnaire par contiguïté est désignée par la lettre E.

### **2-3- LES LYMPHOMES MALINS NON HODGKINIENS**

Les lymphomes malins non hodgkiniens (LMNH) sont définis par une prolifération incontrôlée de cellules lymphoïdes B ou T. Ces cellules présentent un stade de différenciation donné, différent d'un lymphome à l'autre. A la suite d'un blocage, chacune des cellules B ou T du tissu lymphoïde peut donner naissance à un lymphome malin et dans la plupart des cas, les cellules qui prolifèrent gardent les caractères morphologiques et immunologiques (marqueurs de différenciation) des cellules dont elles dérivent.

Les LMNH représentent ainsi un groupe de pathologies du tissu lymphoïde très hétérogène qui se définit en outre, également de façon négative, par l'exclusion des leucémies lymphoïdes aiguës et des proliférations lymphoïdes associées à la sécrétion d'immunoglobulines.

Type	Définition
I	<u>Formes à prédominance lymphocytaire</u> Rares cellules de Reed-Sternberg
II	<u>Formes scléroïnodulaires</u> Présence de bandes de sclérose qui divisent le parenchyme en nodules
III	<u>Formes à cellularité mixte</u> Nombreuses cellules de Reed-Sternberg population cellulaire polymorphe
IV	<u>Forme avec déplétion lymphocytaire</u> Riche en cellules de Reed-Sternberg (très rare, contestée sur des arguments immunohistologiques).

Figure 4 : Classification histologique des lymphomes hodgkiniens

STADE	DEFINITION	SYMPTOMES GENERAUX	
		PRESENCE	ABSENCE
I	Une seule aire ganglionnaire atteinte	I B	I A
II	Plusieurs aires ganglionnaires d'un seul côté du diaphragme	II B	II A
III	Plusieurs aires ganglionnaires de part et d'autre du diaphragme	III B	III A
IV	Viscère(s) non contigu(s) à une aire ganglionnaire atteinte	IV B	IV A

**Figure 5 : Classification clinique des lymphomes hodgkiniens**



Le diagnostic d'un lymphome malin est une démarche complexe (14). Les hyperplasies lymphoïdes bénignes réactionnelles d'origine virale ou inflammatoire par exemple, doivent être différenciées d'une prolifération de nature tumorale. La reconnaissance du caractère malin de la prolifération s'accompagne d'un diagnostic différentiel vis-à-vis des autres types de tumeur (carcinomes, mélanomes, sarcomes...). L'évaluation du grade de malignité devra ensuite être réalisée pour déterminer le choix thérapeutique.

Afin de rendre ce diagnostic plus aisé et d'en harmoniser les conclusions des classifications des lymphomes malins ont été élaborées.

Ces classifications tentent de répondre à deux types d'objectifs principaux :

- définir des entités morphologiques en s'appuyant sur des critères histopathologiques précis (pouvant être reconnus par tous les anatomo-pathologistes) et étayés par une étude de l'immuno-phénotype. Toutes les cellules hématopoïétiques possèdent en effet un ensemble de molécules membranaires ou cytoplasmiques susceptibles d'être identifiées par des anticorps monoclonaux. Ces molécules antigéniques constituent des marqueurs de différenciation et permettent de situer le stade de maturation des cellules ainsi que leur lignée d'origine B ou T,

- définir des entités anatomo-cliniques utilisables par les cliniciens.

Plusieurs classifications ont ainsi été proposées, deux sont plus particulièrement utilisées :

- la classification proposée par Karl Lennert, classification de Kiel réactualisée en 1988-1991 (46). Elle décrit bien les principales entités en séparant les lymphomes malins de faible malignité à prédominance de petites cellules et ceux de forte malignité d'évolution rapide à prédominance de grandes cellules. Cette classification est d'autant plus intéressante que l'on compare les LMNH de type B entre eux et ceux de type T entre eux, les derniers étant le plus souvent de plus mauvais pronostic, à groupe de malignité égale.

- La "formulation de travail pour un usage clinique" ou "Working Formulation" (WF) (76) a été créée en 1982 à la suite d'une étude comparative

internationale. Elle est basée sur des critères histologiques et cliniques. Elle méconnaît un certain nombre d'entités mal définies à l'époque de sa rédaction et seuls les LMNH les plus communs de la classification de Kiel y trouvent leur équivalent, elle nécessiterait de ce fait une réactualisation.

Les tableaux 2 et 3 donnent les équivalences entre les deux classifications.

Les critères de classification des LMNH sont le reflet des connaissances actuelles, la confrontation entre les critères morphologiques bien identifiés et les données fournies par de nouvelles techniques (expressions d'oncogènes, de molécules d'adhésion, etc...) devraient permettre d'affiner la classification des LMNH.

**EQUIVALENCES ENTRE LA CLASSIFICATION DE KIEL REACTUALISEE 1988-1991 ET LA WORKING FORMULATION (WF)(1992)**

<b>Lymphomes malins B Classification de Kiel</b>	<b>Working Formulation</b>
<p><i>Faible malignité</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>* Lymphocytaire               <ul style="list-style-type: none"> <li>Leucémie lymphoïde chronique</li> <li>Leucémie lymphoïde prolymphocytaire</li> <li>Leucémie à tricholeucocytes</li> </ul> </li> <li>* Lymphoplasmocytaire-cytoïde (immunocytome)</li> <li>* Plasmocytaire</li> <li>* Monocytaire (incluant les lymphomes malins de la zone marginale)</li> <li>* Centroblastique-centrocytaire               <ul style="list-style-type: none"> <li>- folliculaire +/- diffus</li> <li>- diffus</li> </ul> </li> </ul>	<p><i>Faible malignité</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>* Lymphomes malins à petits lymphocytes (A)               <ul style="list-style-type: none"> <li>- compatible leucémie lymphoïde chronique</li> </ul> </li> <li>- plasmocytaire</li> <li>* Plasmocytome extramédullaire</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>* Folliculaire               <ul style="list-style-type: none"> <li>- zones diffuses</li> </ul> </li> <li>* Folliculaire, petites cellules clivées prédominantes (B)</li> <li>* Folliculaire mixte, petites cellules clivées et grandes cellules (C)</li> </ul>	<p><i>Malignité intermédiaire</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>* Folliculaire, prédominance de grandes cellules (D)</li> <li>* Diffus à petites cellules clivées (E)</li> <li>* Diffus à grandes cellules non clivées (G)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>* Lymphomes malins des cellules du manteau (centrocytaire)</li> </ul>	
<p><i>Grande malignité</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>* Centroblastique</li> <li>* Immunoblastique</li> <li>* Grandes cellules anaplasiques</li> <li>* de Burkitt</li> <li>* Lymphoblastique B</li> </ul>	<p><i>Grande malignité</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>* Immunoblastique plasmocytaire (H)</li> <li>* Lymphomes malins à petites cellules non clivées (Burkitt)(J)</li> <li>* Lymphoblastique (I)</li> </ul>
Formes rares	Inclassables, composites

**TABLEAU 2 : CLASSIFICATION DES LMNH DE TYPE B**

## CLASSIFICATION DE KIEL ET PRINCIPALES ENTITES UTILES POUR LE CLINICIEN

Classification de Kiel	Principales entités utiles en clinique
<i>Faible malignité</i>	<i>Faible malignité</i>
* Petites cellules cérébriformes (mycosis fongoïde, Syndrome de Sézary)	* Lymphomes malins cutanés épidermotropes - mycosis fongoïde - Syndrome de Sézary
* Lymphocytaire - leucémie lymphoïde chronique	* Leucémie lymphoïde chronique T
- leucémie prolymphocytaire T	<i>Grande malignité</i>
* Lymphoépithélioïde de Lennert	* Leucémie prolymphocytaire T
* Lymphome malin de type lymphadénopathie angio-immunoblastique	* Lymphome malin de Lennert
* Lymphome malin des zones T	* Lymphome malin de type lymphadénopathie angio-immunoblastique
* Pléomorphe à petites cellules	
<i>Grande malignité</i>	
* Pléomorphe à cellules moyennes et grandes	* Pléomorphe
* Immunoblastique T	* Immunoblastique T
* Grandes cellules anaplasiques	* Grandes cellules anaplasiques
* Lymphoblastique T	* Lymphoblastique T
Formes rares	

TABLEAU 3 : CLASSIFICATION DES LMNH DE TYPE T

### 3 - HHV-6 ET LYMPHOMES

#### 3-1- ARGUMENTS EN FAVEUR D'UN ROLE VIRAL DANS CETTE PATHOLOGIE

Le rôle du HHV-6 dans la génèse des lymphomes a été évoqué par plusieurs auteurs et des études tant sérologiques qu'à la recherche du génome viral dans des prélèvements biopsiques, réalisées chez des patients porteurs de lymphomes hodgkiniens et non hodgkiniens, ont fait état d'une implication plus fréquente du virus dans ces pathologies (26, 81). Un certain nombre d'éléments vient en outre à l'appui de cette hypothèse :

- l'HHV-6 fut isolé de lymphocytes du sang périphérique de patients atteints de syndromes lymphoprolifératifs associés ou non au SIDA (70),
- l'HHV-6 est un virus lymphotrope et après la primo-infection, le virus reste à l'état latent en particulier dans les cellules mononuclées sanguines (34),
- le génome d'HHV-6 a été trouvé associé à un état lymphoprolifératif prémalin dénommé "lymphoprolifération atypique polyclonale" (43),
- un potentiel oncogénique de la souche GS d'HHV-6 a été démontré in vitro dans des cellules NIH3T3 qui, transformées, ont, après injection sous-cutanée à des souris nues, conduit rapidement à l'apparition de tumeurs (66). Une expérience similaire menée sur des souris swiss immunocompétentes a donné des résultats identiques (67),
- un gène de l'HHV-6, analogue du gène Rep d'un virus helper associé à l'adénovirus type-2 a été identifié. Ce gène multifonctionnel régulateur pourrait avoir des effets, non seulement sur le cycle de réplication virale, mais aussi sur la cellule hôte (78, 80),
- des homologies partielles de séquence ont été trouvées entre l'HHV-6 et le virus de la maladie de Marek, responsable d'un lymphome à cellules T chez le poulet (42),

- une étude récente (51) a démontré l'intégration du génome viral dans le bras court du chromosome 17 dans des cellules mononucléées provenant de deux patients, l'un atteint de LMNH, l'autre d'une maladie de Hodgkin .

### 3-2- STRATEGIES UTILISABLES POUR RECHERCHER UNE RELATION VIRUS-LYMPHOME

L'HHV-6 est un virus lymphotrope, interagissant fortement avec le système immunitaire. Il est très répandu et son infection persiste dans l'organisme avec des phases de latence et de réactivation.

Ces propriétés rendent extrêmement difficile l'étude de son rôle dans les pathologies associées à des dysfonctionnements du système immunitaire car, dans chaque cas, une question doit être posée : cause, cofacteur ou virus "de passage" (3) ? Un grand nombre de techniques ont été utilisées pour tenter de relier l'HHV-6 à des cas de lymphomes : la détermination de la séroprévalence et du titre des anticorps anti-HHV-6, la recherche directe du génome viral par PCR, hybridation in situ, hybridation associée ou non à l'électrophorèse en champ pulsé, la mise en évidence de divers antigènes viraux in situ par le biais d'anticorps monoclonaux.

En définitive, aucune de ces techniques ne peut réellement à elle seule, fournir une réponse à la question posée, les techniques in situ situant le virus ou son génome dans telle ou telle cellule sont, sans doute, les plus intéressantes puisque pouvant potentiellement permettre d'associer la présence virale au phénotype malin, mais elles peuvent se heurter à des problèmes de sensibilité.

L'approche sérologique, du fait de la forte séroprévalence virale, est délicate. Les réactivations virales sont en effet d'interprétation sérologique difficile et les tests utilisés manquent de standardisation. Le titre des anticorps n'augmente pas de manière constante avec la réactivation virale et d'autre part les modifications de titre

peuvent être en rapport avec les modifications immunologiques observées chez certains des patients et non avec une réponse spécifique.

La recherche du génome sur des échantillons d'ADN extraits des tissus tumoraux, des cellules mononuclées circulantes ou du sérum des patients par PCR permet d'objectiver une présence virale, à condition toutefois d'interpréter les résultats avec précaution, la grande sensibilité de ces techniques pouvant constituer leur principal écueil. En outre, les résultats fournis sont encore rarement quantitatifs et ne permettent pas de situer précisément le type cellulaire infecté ni la localisation des séquences virales (intégrées ou non dans le génome cellulaire).

En définitive, chaque technique apportant des informations particulières, il semble qu'une approche multidisciplinaire soit souhaitable, conjugant une méthode de sélection des patients porteurs du virus au sein des tissus tumoraux ou chez qui une réactivation virale est suspectée, et des techniques plus précises permettant d'associer la présence virale à un type cellulaire particulier dans un premier temps pour rechercher un éventuel processus carcinogène par la suite.

### 3-3-RESULTATS RECENTS PUBLIES SUR HHV-6 ET LYMPHOMES

Plusieurs auteurs ont rapporté des résultats d'études recherchant par PCR le génome d'HHV-6 dans les lymphomes. Ces données sont parfois contradictoires, quelques uns de ces résultats sont rappelés ci dessous pour illustrer cette hétérogénéité.

Torelli (81) sur des biopsies, analysées par PCR provenant de:

41 patients avec LMNH trouve :	0 positifs	soit 0%
25 patients avec lymphome H :	3 positifs	soit 12%

DI luca (26) sur des lymphocytes périphériques de donneurs sains et des biopsies de patients porteurs de lymphomes rapporte:

sur 45 sujets sains:	8 positifs par PCR	soit 17%
sur 35 LMNH:	0 positifs	soit 0%
sur 45 H:	13 positifs	soit 29%

Luppi (51) sur des biopsies et des lymphocytes périphériques:

sur 23 LMNH:	1 positif	soit 4,3%
sur 30 H	1 positif	soit 3,3%

Fillet (32) sur des biopsies provenant de patients porteurs de LMNH ou présentant des hyperplasies non malignes:

sur 20 LMNH:	7 positifs	soit 35%
sur 9 hyperplasies	5 positifs	soit 55%



## MATERIEL ET METHODES

### 4 - MATERIEL

#### 4-1- LES PATIENTS

##### 4-1-1- CHOIX DES PATIENTS

L'étude a porté rétrospectivement sur 87 patients hospitalisés au Centre Hospitalier Régional de Limoges. Tous ces patients avaient subi une biopsie/exérèse dans un but diagnostique, dont l'analyse était confiée au laboratoire d'Anatomie-pathologique de l'hôpital. Ce laboratoire est tenu de conserver des échantillons des prélèvements sur lesquels portent ses diagnostics et c'est dans cette "collection" qu'ont été choisis nos échantillons. Les critères utilisés pour sélectionner ces derniers étaient :

- la séronégativité pour le virus VIH,
- être révélateur d'un lymphome hodgkinien ou d'un lymphome non hodgkinien ou pour un troisième groupe destiné à servir de témoin, ne correspondre à aucune de ces pathologies.

##### 4-1-2- CLASSIFICATIONS UTILISEES

Chaque patient ayant été sélectionné grâce à la collaboration du service d'Anatomie-pathologique, nous disposons des compte-rendus d'analyse établis par les médecins de cette unité. Les diagnostics sont portés par les praticiens en se fondant sur des investigations de deux ordres, une analyse histologique et cytologique et une étude immunohistochimique. Les résultats de ces études permettent le diagnostic d'une éventuelle prolifération maligne et sa classification

Les lymphomes malins non hodgkiniens diagnostiqués sont à la fois classés

selon les critères énoncés dans la classification de Kiel réactualisée et parallèlement situés selon la "Working formulation". Nous avons retenu pour regrouper les différentes pathologies les résultats exprimés selon la classification de Kiel.

Cette classification, fondée essentiellement sur des critères cytologiques, est sans doute la plus à même de définir des entités dont la physiopathologie pourrait être voisine et il nous a paru intéressant, le cas échéant, de pouvoir noter la présence ou l'absence du génome d'HHV-6 non seulement dans les lymphomes non hodgkiniens en général, mais dans tel ou tel type particulier de ces pathologies.

La classification utilisée dans le diagnostic des lymphomes hodgkiniens a été celle de Rye dont les bases sont histologiques, fondées sur les proportions des différents éléments cellulaires présents.

Les quatre types décrits par cette classification ne définissent pas nécessairement des entités indépendantes, des évolutions peuvent exister d'un type à l'autre, en particulier les types 1 à prédominance lymphocytaire pouvant évoluer vers le type 3 à cellularité mixte ou vers le type 4 riche en cellules de Sternberg avec déplétion lymphocytaire. Le type 3 peut évoluer vers le type 4. Par contre, le type 2 scléronodulaire apparaît plus stable (5), de diagnostic biologique plus aisé d'où l'établissement possible d'un groupe bien défini. Pour certains patients, le diagnostic anatomopathologique a conclu à une réaction ganglionnaire de type adénite, sans signe de malignité et pour quelques cas, une étiologie probable a été avancée. Tous ces prélèvements ont été cependant rangés dans la même catégorie dite "adénites" pour constituer un groupe témoin.

#### 4-1-3- REPARTITION

Les patients ont été répartis en trois groupes principaux :

- lymphomes non hodgkiniens : 52
- lymphomes hodgkiniens : 24
- adénites : 11



A l'intérieur d'un même groupe des entités définies à l'aide des classifications présentées précédemment ont été isolées. L'ensemble est rapporté dans le tableau 4 avec un certain nombre de caractéristiques (âge moyen, rapports homme/femme, âges extrêmes).

#### 4-1-4- TYPES DE PRELEVEMENTS

Trois catégories de prélèvements ont été utilisées :

- pour tous les patients, des échantillons provenant d'une biopsie exérèse (le plus souvent ganglionnaire ou dans quelques cas issus d'une masse extraganglionnaire) ont été étudiés,

- pour quatre patients pour lesquels un résultat positif dans la recherche du génome d'HHV-6 avait été obtenu, le service d'Anatomie-pathologique disposait de biopsies médullaires qui ont été alors également étudiées. Les bilans anatomo-pathologiques de ces prélèvements médullaires ne faisaient état d'aucune prolifération cellulaire anormale.

- Des sérums, prélevés antérieurement aux échantillons biopsiques ont été recherchés dans la sérothèque du laboratoire de Virologie. Pour trente deux patients, des sérums dont l'antériorité n'excédait pas quelques mois, ont pu être trouvés (Figure 6).

#### 4-2- LES PRELEVEMENTS : STOCKAGE, CONSERVATION

##### 4-2-1- FRAGMENTS TISSULAIRES, BIOPSIES

Ces fragments ont été obtenus auprès du service d'Anatomie-pathologique, chaque fraction du prélèvement originel étant conservé dans un conditionnement adapté à sa congélation à -80°C. Après prélèvement d'un aliquot de chaque échantillon, ces biopsies ont été replacées à cette température.

Diagnostic	Nombre de patients	Age moyen (années)	Agés extrêmes en années + jeune/+ âgé	Rapport homme/femme
<b>LMNH</b>				
- lymphocytaire	2	79	79/79	2/0
- lymphoplasmocytaire	5	68	62/74	2/3
- centrocyto-centroblastique	13	59	26/82	9/4
- centrocytique	10	69	37/83	2/8
- centroblastique	12	70	51/84	6/6
- immunoblastique	1	44		1/1
- lymphoblastique T	3	55	14/72	3/0
- T pléomorphe	4	59	20/73	3/1
- autres LMNHT*	2	69	-	1/1
<b>Total LMNH</b>	<b>52</b>	<b>64</b>	<b>14/84</b>	<b>28/24</b>

<b>Lymphomes hodgkiniens</b>				
- scléro-nodulaire	19	42	24/71	12/7
- autres types	5	58	42/73	4/1
<b>Total hodgkiniens</b>	<b>24</b>	<b>45</b>	<b>24/73</b>	<b>16/8</b>

<b>Adénites</b>	<b>11</b>	<b>54</b>	<b>22/86</b>	<b>6/5</b>
-----------------	-----------	-----------	--------------	------------

<b>TOTAL</b>	<b>87</b>	<b>57</b>	<b>50/47</b>	<b>14/86</b>
--------------	-----------	-----------	--------------	--------------

\* 1 Localisation ganglionnaire de Mycosis fungoïde  
1 lymphome lymphoéithéioïde de Lennert

**TABEAU 4 : REPARTITION DES PATIENTS**

Nombre d'échantillons	Pathologie diagnostiquée
8	Lymphome hodgkinien dont 7 H scléro-nodulaire type II 1 H type III
4	LMNH centrocyto-centroblastique
3	LMNH centrocytique
6	LMNH centroblastique
1	LMNH immunoblastique
3	LMNH lymphoblastique
3	LMNH T pléomorphe
4	Adénite

Figure 6 : Répartition des sérums

#### 4-2-2- MOELLE

Les échantillons obtenus auprès du service d'anatomie-pathologique étaient conservés, inclus dans des blocs de paraffine, ces blocs ayant servi à la réalisation de coupes au microtome.

Les prélèvements ont été récupérés par fusion des blocs, puis déparaffinés dans plusieurs bains de toluène avant d'être lavés dans l'alcool à 70 % (vol/vol). Ils ont alors été utilisés comme les échantillons tissulaires.

#### 4-2-3- SERUMS

Les sérums étaient conservés congelés à  $-30^{\circ}\text{C}$ . Ils proviennent d'échantillons sanguins prélevés dans des tubes sous vide d'air, sans anticoagulant.

Les tubes ont été laissés un temps suffisant pour que la coagulation se produise à température ambiante, puis ont été centrifugés à 3000 g 10 min à température ambiante et les sérums ont été décantés puis congelés. Après décongélation, les sérums ont été homogénéisés avant de procéder à l'extraction d'ADN.

### 4-3- LES TEMOINS

#### 4-3-1- TEMOINS POSITIFS

La lignée cellulaire continue de lymphoblastes T, HSB-2 (American Type Collection ou ATCC, CCL 120.1, Rockville, MD, USA) a été infectée par coculture avec des cellules préalablement infectées par la souche GS d'HHV-6 (isolat initial de Salahuddin, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Les cellules ont été cultivées à  $37^{\circ}\text{C}$  sous 10 % de  $\text{CO}_2$  dans un milieu RPMI 1640 (Gibco BRL, Cergy Pontoise, France) supplémenté en glutamine

2 mM (Gibco, BRL), en sérum de veau foetal décomplémenté 12,5 % (Boehringer Mannheim, Meylan, France), en antibiotiques (amikacine et vancomycine, 20 µg/ml) et antifongique (fungizone 2,5 mg/ml), en sérum anti interféron 1 UI/ml (Boehringer) et en polybrène 2,5 µg/ml (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). La multiplication du virus se produit par la présence d'un effet cytopathogène caractérisé par l'accroissement de taille et l'aspect ballonisé des cellules.

La culture virale a été récoltée au cinquième jour lorsque l'effet cytopathogène était maximal. Le culot obtenu par centrifugation a été lavé en tampon phosphate PBS 1x stérile, ajusté à  $5.10^5$  cellules dans 250 µl et l'ADN total riche en séquences génomiques virales a été extrait selon le même protocole que pour les échantillons tissulaires.

Les tubes d'ADN extraits et dosés ont été conservés à + 4°C jusqu'à utilisation.

#### 4-3-2- LES TEMOINS NEGATIFS

Deux types de témoins négatifs ont été utilisés :

- un témoin négatif "extraction" dans lequel l'échantillon de départ est un volume de PBS 1x équivalent à celui utilisé pour reprendre les fragments tissulaires, et qui subit les mêmes étapes que les prélèvements,
- un témoin négatif "réactif PCR", qui correspond à un volume d'eau distillée stérile qui remplace l'échantillon d'ADN lors de la réaction d'amplification.

## **5 - METHODES**

La recherche du génome viral dans chaque échantillon a fait appel à une technique d'amplification génique ou réaction de polymérisation en chaîne.

En générant un grand nombre de copies d'un segment spécifique d'ADN, cette technique permet d'obtenir, à partir d'un prélèvement où la teneur en génome viral est potentiellement très faible, une quantité de matériel suffisante à sa détection.

Les produits d'amplification ont été caractérisés après transfert sur membrane de nylon par hybridation à une sonde spécifique marquée à la digoxigénine et révélation par une réaction de chimiluminescence.

Dans quelques cas, cette caractérisation n'a pas fait appel à l'hybridation d'une sonde mais à une seconde réaction de PCR dirigée sur une cible interne aux produits de première amplification, garantissant ainsi des résultats spécifiques avec une grande sensibilité.

### **5-1- EXTRACTION D'ADN A PARTIR DES TISSUS**

#### **5-1-1- PREPARATION DES ECHANTILLONS TISSULAIRES**

Les échantillons conservés à -80°C ont été sortis du congélateur. Pour diminuer les risques de contamination, ils ont été techniqués sous hotte à flux laminaire et tout le matériel utilisé était stérile.

Chaque fragment a été placé dans le couvercle d'une boîte de Pétri stérile. Un examen macroscopique rapide a cherché à détecter une éventuelle hétérogénéité afin de prendre un échantillon le plus représentatif possible. Celui-ci a alors été recouvert de tampon phosphate PBS 1x stérile pour éviter tout dessèchement tandis que le reste du prélèvement a été replacé à -80°C dans son conditionnement. Seul un petit



nombre d'échantillons a été technique à chaque série pour limiter le plus possible la durée de la décongélation.

Les prélèvements ont été techniques selon la méthode de Rahuel et coll (60).

Chaque fragment a été dilacéré à l'aide d'une lame de scalpel que l'on a pris soin de changer ou de décontaminer dans l'acide sulfurique 1N par immersion entre deux prélèvements.

L'échantillon a ensuite été placé dans un tube à centrifuger cône et recouvert de quelques millilitres de PBS 1x. Les tubes ont été agités pour assurer un bon lavage et centrifugés à 1 000 g pendant 10 minutes à 20°C.

Après décantation, le culot a été repris dans 2 ml de tampon d'homogénéisation (saccharose : 0,25 M, Tris-HCl à pH 7,5 : 25 mM, NaCl : 25 mM, MgCl<sub>2</sub> : 25 mM). Les tubes ont été maintenus une heure à +4°C en les agitant fréquemment, ce qui permet d'obtenir la dissociation tissulaire (60). La suspension cellulaire a été soumise à une nouvelle centrifugation à 1 000 g pendant 10 minutes à 20°C et le culot cellulaire à nouveau lavé en PBS 1x.

#### 5-1-2- LYSE CELLULAIRE

Le culot obtenu à l'étape précédente a été repris dans 3 ml de tampon de lyse (EDTA 10 mM, Tris-HCl 10 mM à pH 8, NaCl : 10 mM) auxquels ont été ajoutés 180 µl d'une solution à 10 mg/ml de protéinase K. Cette enzyme assure une dégradation des protéines par hydrolyse de liaisons esters. Le mélange a été incubé une nuit à 37°C. En cas de digestion imparfaite, il a été chauffé 20 minutes à 60°C, température où l'enzyme est plus active (d'un facteur 10).

Les tubes ont ensuite été portés à ébullition pendant dix minutes afin d'inactiver l'enzyme.

### 5-1-3- EXTRACTION ORGANIQUE

La technique utilisée est une méthode classique décrite par Perbal (58) où l'extraction organique est assurée par le mélange ternaire : phénol pH > 7,6, chloroforme, alcool isoamylique (24 vol/25 vol/1 vol). L'utilisation d'un tel mélange assure, d'une part une meilleure déprotéinisation que le phénol seul, et permet d'autre part d'éviter la solubilisation de certains ARNm.

L'extraction par le mélange phénol, chloroforme, alcool isoamylique a été réalisée à deux reprises. Celui-ci est ajouté dans une proportion de deux pour un au lysat cellulaire et les tubes sont agités doucement par retournements réguliers pendant 10 minutes.

L'émulsion formée a été "cassée" par une centrifugation à 700 g pendant 10 minutes à 20°C et la phase aqueuse supérieure reprise avec précaution à la pipette.

Pendant cette étape, on peut observer la formation d'une zone blanchâtre à l'interface qui correspond aux protéines. Elles peuvent présenter des interactions résiduelles avec les acides nucléiques lors de la première extraction et il peut s'avérer intéressant de les prélever également pour leur faire subir un second traitement où ne sera, cette fois, récupérée que la phase aqueuse. Cette phase a alors été additionnée avec 1 ml du mélange chloroforme/alcool isoamylique (24 vol/1 vol), le chloroforme continue l'extraction et permet d'éliminer toute trace de phénol. Les tubes ont été agités 10 minutes par retournement puis centrifugés à 700 g pendant 10 minutes à 20°C.

### 5-1-4- CONCENTRATION DES ACIDES NUCLEIQUES PAR PRECIPITATION A L'ETHANOL

La phase aqueuse de l'étape précédente a été prélevée délicatement et 1 ml d'alcool éthylique glacial et 50 µl d'une solution d'acétate de sodium 3M lui ont été ajoutés. Les tubes ont été mélangés par retournement et placés au congélateur à

-80°C pour au moins une demi-heure. L'ADN précipité est obtenu sous forme d'un culot blanchâtre après une centrifugation de 30 minutes à 4500 g à 0°C. Le surnageant a été éliminé et le culot remis en suspension dans 1 ml d'éthanol à 70 % (glacial) pour assurer un lavage. Les tubes ont été centrifugés 10 minutes à 4500 g et 0°C, le surnageant éliminé et les culots séchés à l'aide d'un concentrateur sous vide (Speedvac, Bioblock Scientific, Illkirch, France) avant d'être repris par 100 µl d'eau distillée stérile. La dissolution des échantillons est améliorée par passage de 20 minutes au bain marie à 60°C. L'ADN a ensuite été stocké à 4°C pendant au moins une semaine avant son utilisation.

#### 5-1-5- LYSE CELLULAIRE SANS EXTRACTION

Les prélèvements ont été découpés en fines lamelles puis lavés en PBS 1x comme précédemment.

Après centrifugation, le culot tissulaire a été repris dans 125 µl de tampon de lyse (EDTA 10 mM, Tris-HCl 10 mM à pH 8, NaCl 10 mM) et 10 µl de solution de protéinase K (10 mg/ml) ont été ajoutés. Ce mélange a été incubé une heure à 55°C puis porté à ébullition pendant 10 minutes. Après refroidissement, les échantillons ont été stockés à +4°C jusqu'à leur utilisation.

#### 5-2- EXTRACTION D'ADN DANS LES ECHANTILLONS SERIQUES

Nous avons utilisé une technique d'extraction rapide (12) qui utilise le thiocyanate de guanidium pour son potentiel de lyse cellulaire et d'inactivation des nucléases et une suspension de particules de silice calibrées pour leur capacité de fixation des acides nucléiques, ce qui permet une purification rapide et de bonne qualité.

Dans un tube Eppendorff stérile de 1,5 ml ont été distribués 40 µl d'une suspension de billes de silice (Sigma S 5631) préalablement vortexées, 900 µl de

tampon de lyse (tampon L1) et 50 µl de sérum échantillon (ou d'eau pour le témoin négatif).

Les tubes ont ensuite été agités au vortex 5 secondes et laissés au minimum 10 minutes à température ambiante, puis de nouveau agités et centrifugés 15 secondes à l'aide d'une microcentrifugeuse.

Le surnageant a été éliminé à la pipette, en prenant soin de le rejeter dans une solution à pH alcalin (eau de javel...) le thiocyanate de guanidium étant susceptible de produire un gaz toxique (l'acide cyanhydrique) à pH acide. Il a été ajouté 1 ml de solution de lavage (solution L2) et les tubes ont été agités au vortex jusqu'à remise en suspension complète du culot. Après 15 secondes de centrifugation, le surnageant a été éliminé et l'opération a été répétée une fois. Deux lavages à l'alcool à 70 % (vol/vol dans H<sub>2</sub>O) ont été réalisés de la même manière puis un lavage à l'acétone. Les tubes ont alors été séchés à l'aide d'un concentrateur sous vide et le culot a été repris par 50 µl d'eau distillée stérile. L'élution des acides nucléiques a été obtenue par un passage d'une heure à 37°C puis les tubes ont été stockés à +4°C au moins une nuit avant utilisation, vortexés et centrifugés juste avant l'emploi.

### 5-3- DOSAGE DES ADN EXTRAITS

Les dosages ont été effectués par spectrophotométrie à deux longueurs d'onde 260 et 280 nm contre un blanc constitué d'eau distillée stérile. Sachant qu'une unité de densité optique (DO) mesurée à 260 nm équivaut à l'absorbance d'une solution d'ADN double brin à 50 µg/ml, il est possible de calculer la teneur en ADN de chaque échantillon. Un coefficient de pureté vis-à-vis des protéines a été obtenu par le rapport des densités optiques mesurées à 260 et 280 nm, le résultat étant considéré comme satisfaisant s'il est compris entre 1,7 et 2.

Chaque échantillon extrait a été dosé par cette méthode afin de déterminer le volume à prélever pour disposer d'une quantité d'1 µg d'ADN, quantité utilisée dans les réactions de polymérisation en chaîne.

## 5-4- REACTIONS DE POLYMERISATION EN CHAINE

### 5-4-1- GENERALITES

Plusieurs systèmes d'amplification ont été utilisés répondant aux objectifs d'augmenter la sensibilité et de disposer de différents contrôles pour pouvoir écarter d'éventuelles réactions faussement positives ou négatives.

Les risques de contamination inhérents à la technique utilisée, ont été minimisés par une stricte compartimentation des manipulations d'extraction, de préamplification et de postamplification. Les locaux pour la conservation des réactifs et la préparation des mélanges réactionnels étaient distincts et très éloignés de ceux où ont été pratiquées les extractions ainsi que de ceux où les opérations d'analyse des produits amplifiés ont été effectuées. De plus, toutes les manipulations ont été réalisées sous hotte à flux laminaire vertical en utilisant un matériel préalablement stérilisé par autoclavage ou irradiation, et deux types de jeu de pipettes ont été utilisés : pour les grands volumes ( $> 20 \mu\text{l}$ ) des pipettes avec des embouts stériles munis de filtres antiaérosols, pour les faibles volumes ( $< 20 \mu\text{l}$ ) des pipettes réglables à déplacement positif d'un piston à l'intérieur d'un capillaire (à usage unique), chaque pipette étant réservée à un usage précis, le matériel utilisé pour distribuer l'ADN échantillon étant en particulier totalement distinct et identifiable. Un certain nombre de précautions supplémentaires ont été prises comme la décontamination systématique du matériel et de la zone de travail par exposition aux ultraviolets ou à une solution d'HCl 0,25 N (en particulier pour les portoirs à microtubes PCR).

Au niveau manipulateur, le port de gants à usage unique, renouvelés en cas de contact avec un objet extérieur à l'enceinte ou potentiellement souillé, l'utilisation d'une blouse ou d'une surblouse à usage unique remise dans la salle de manipulations et une standardisation des gestes la plus poussée possible ont été observés.

#### 5-4-2- AMORCES UTILISEES

Plusieurs systèmes d'amorces oligonucléotidiques ont été utilisés, leurs séquences sont rapportées dans la figure 7.

a) Pour vérifier si les ADN extraits des échantillons tissulaires par les méthodes d'extraction organique ou obtenus après simple lyse cellulaire étaient de qualité suffisante pour être amplifiables, nous avons amplifié le locus DQA1 (du gène DQ  $\alpha$ ) appartenant au système HLA de classe II, présent dans toutes les cellules humaines, à l'aide d'un couple d'amorces GH26 et GH27 décrites dans la littérature (37).

Les échantillons positifs dans ce système ont été retenus pour les essais d'amplification de séquences du génome viral.

Les échantillons négatifs ont subi une série de dilutions en eau distillée stérile (1/5, 1/10, 1/50, 1/100ème) puis ont été réamplifiés avec, pour objectif, la diminution de l'effet d'éventuels inhibiteurs de la réaction présents dans l'échantillon. En cas de positivité, la plus faible dilution permettant un niveau correct d'amplification a été retenue.

b) Deux autres systèmes d'amorces décrits dans la littérature ont été utilisés. Ils sont rapportés comme spécifiques d'HHV-6, aucune amplification n'ayant été obtenue par les auteurs sur un grand nombre de souches des autres membres de la famille des Herpesviridae humains : HSV, VZV, CMV, EBV, HHV-7.

Les oligonucléotides A, B et C (figure 7) ont été décrits par Collandre et Aubin (20). Ces auteurs les ont déterminés après clonage et séquençage d'un fragment de restriction généré par action de l'enzyme Bam HI à partir du génome d'une souche d'HHV-6, souche SIE provenant d'un patient de Côte d'Ivoire (4).

Amorces	Séquences nucléotidiques	Régions ciblées
GH26 GH27	5'- GTG CTG CAG GTG TAA ACTT GTA CCA R -3' 5'- CAC GGA TCC GTA GCA GCG GTA GAG TT-3'	locus DQ A1 du système HLA de classe II
A B C	5'-GAT CCG ACG CCT ACA AAC AC-3' 5'-TAC CGA CAT CCT TGA CAT ATT AC-3' 5'-CGG TGT CAC ACA GCA TGA ACT CTC-3'	large protéine de
A1 C2 A2	5'-GTG GAT CCG ACG TCC TAC AAA CAC-3' 5'-CTC GGA CTC ATA GAT CTC ATA CTG-3' 5'- GGA GAA TCT TGT AAG TAT ATG GTC -3'	tégument d'HHV-6
H6.6 H6.7	5' -AAG CTT GCA CAA TGC CAA AAA ACA G -3' 5' -CTC GAG TAT GCC GAG ACC CCT AAT C -3'	ORF13 d'une région de 21858 bp de la souche U1102 d'HHV-6
MIE4 MIE5	5' -CCA AGC GGC CTC TGA TAA CCA AGC C -3' 5' -CAG CAC CAT CCT CCT CTT CCT CTG G -3'	Antigène majeur précoce du CMVH

#### TAILLE DES PRODUITS D'AMPLIFICATION

Couples d'amorces	Taille du fragment amplifié
GH26/GH27	242 pb
A/B	249 pb
A/C	830 pb
A1/C	834 pb
A2/C2	658 pb
H6.6/H6.7	223 pb
MIE4/MIE5	435 pb

Figure 7 : Séquence des amorces utilisées

Ce fragment, inséré dans un plasmide, était capable d'hybrider avec la souche originale décrite par Salahuddin (70) ainsi qu'avec d'autres isolats d'origines diverses et a été retenu car laissant présager une conservation de séquences entre les souches d'HHV-6.

Ces amorces permettent d'amplifier une séquence cible située dans une région bien conservée d'HHV-6 et connue pour coder pour la grosse protéine du tégument (40, ).

De plus, la séquence amplifiée par le couple A/C correspond à une région d'HHV-6 où existe un polymorphisme de restriction, facilement détectable par des réactions enzymatiques couplées à une migration électrophorétique conduisant à la distinction des souches virales en deux types A et B (6).

Les oligonucléotides H6.6 et H6.7 (figure 4) ont été décrits par Gopal (34). Ils ont été déduits d'un fragment de séquence publiée par Lawrence (44) d'une souche ougandaise d'HHV-6 (souche U1102) isolée par Downing (28).

La séquence définie par ces amorces représente une fraction d'un cadre ouvert de lecture (nommé 13R par Lawrence, qui n'a pas encore été associé à une fonction spécifique).

Les oligonucléotides MIE4 et MIE5 (figure 4) ont été décrits par Demmler (24). Ils ont été déduits de séquences de la souche Towne du cytomégalovirus humain. Ils définissent une zone de 435 pb dans l'exon 4 du gène codant pour l'antigène majeur très précoce du CMVH. Nous les avons utilisés pour vérifier l'absence d'amplification des échantillons trouvés positifs avec les systèmes HHV-6.

Le choix des amorces a été arrêté après avoir tenu compte, outre de leur spécificité, du nombre de nucléotides, et de leur composition en bases (G+C) et vérifié l'absence de complémentarité intrachaine et interamorce.

Les amorces H6.6/H6.7 ont été élaborées par Nauplius.



Toutes les autres amorces, ainsi que le couple GH26/GH27 précédemment décrit, ont été synthétisées par la méthode des phosphoramidites (synthétiseur automatique, L Applied Biosystems 380 B) par O. Helynck, unité de chimie organique, Institut Pasteur, Paris, France, elles ont ensuite été purifiées par HPLC et contrôlées par séquençage, lyophilisées et conservées à -30°C.

Après reconstitution avec de l'eau distillée stérile, elles ont été dosées en spectrophotométrie et stockées à une concentration de 20 µM à -30°C.

#### 5-4-3- CONDITIONS REACTIONNELLES

L'ensemble des conditions utilisées pour les différents systèmes est rapporté pour plus de commodité dans les tableaux 5 et 6.

L'optimisation des réactions a, dans la majorité des cas, été obtenue lors de travaux précédents menés par S. Ranger-Rogez (61).

Toutes les réactions ont été conduites dans un thermocycleur (Perkin Elmer Cetus 9600 Amplisystem).

Le produit des amplifications a été conservé à +4°C jusqu'à analyse. Chaque série d'amplifications a comporté deux témoins négatifs (un témoin "réactif" où l'échantillon d'ADN est remplacé par de l'eau distillée stérile, un témoin "extraction" où l'échantillon originel a été remplacé par un volume de PBS 1x stérile, avant toutes les étapes d'extraction et de purification), et un témoin positif (ADN extrait de cellules HSB-2 infectées par HHV-6, souche GS).

La validité des témoins trouve son origine dans la réalisation d'un même mélange global contenant tous les réactifs, qui est distribué secondairement dans chaque tube réactionnel.

REACTIFS	COUPLES D'AMORCES							
	A/B	A/C	A1/C	A2/C2	H6.6/H6.7	GH26/GH27	MIE4/MIE5	
Amorce 1	0,1 µM	0,1 µM	0,1 µM	0,1 µM	0,1 µM	0,2 µM	2,5 µM	
Amorce 2	0,1 µM	0,1 µM	0,1 µM	0,1 µM	0,1 µM	0,2 µM	2,5 µM	
DNTP	0,2 mM	0,3 mM	0,3 mM	0,3 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM	
Tris-HCL (PH = 8,4)	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM	
KCL	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	
MgCl2	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM	4 mM	
Détergent 1 %	0,05 %	0,05 %	0,05 %	0,05 %	0,05 %	0,05 %	0,05 %	
Taq DNA polymérase	0,5 U	1 U	1 U	1 U	0,2 U	0,5 U	0,5 U	
ADN	1 µg	1 µg	1 µg	1 µl*	1 µg	1 µg	1 µg	

\* 1 µl de produit d'amplification A/C ou A1/C

TABLEAU 5: COMPOSITION DES DIFFERENTS MILIEUX D'AMPLIFICATION

Couples d'oligonucléotides amorces				
A/B, A/C A1/B1, A2/B2	H6.6/H6.7	GH26/GH27	MIE4/MIE5	
94°C 4 min	94°C 6 min	94°C 4 min	94°C 6 min	
94°C 1 min	55°C 45 sec	94°C 1 min	94°C 1 min	
55°C 1 min 30 cycles	72 °C 45 sec 30 cycles	55°C 1 min 35 cycles	60°C 1 min 30 cycles	
72 °C	94 °C 45 sec	72°C 1 min	72°C 1 min	
72°C 7 min	72°C 10 min	4°C	72 °C 6 min	
4°C	4°C		4°C	

TABLEAU 6 : CYCLES DE TEMPERATURES UTILISES

#### 5-4-4- CAS PARTICULIER DE LA PCR "NICHEE"

La PCR interne ou PCR nichée a pour principe la réalisation de deux réactions successives de PCR destinées à amplifier spécifiquement une séquence d'ADN choisie. Un couple d'amorces dites "externes" donne, après PCR, un produit dont un fragment est réamplifié au cours d'une seconde réaction utilisant un couple d'amorces "internes", capables de s'apparier à des séquences localisées à l'intérieur de la zone amplifiée dans la première étape. Cette technique spécifique et sensible a été utilisée comme alternative à l'hybridation sur quelques-uns de nos échantillons. Les couples d'amorces externes ont été A et C et A1 et C, un seul couple d'amorces internes (A2/C2) a été utilisé pour les deux types de produits.

Nous avons utilisé, pour la réalisation de la réaction, un protocole classique, à deux étapes séparées ce qui entraîne un risque élevé de contamination de type "amplitransfert" puisque les tubes de post-PCR et pré-PCR sont obligatoirement traités dans la même pièce.

Etant donné le faible nombre d'échantillons soumis à cette technique, nous avons tenté de minimiser au maximum le facteur contamination par des manipulations très rigoureuses. Une attention toute particulière a été apportée à la centrifugation des tubes renfermant les produits de la première réaction, ceux-ci ont été ouverts à distance des tubes contenant le mélange réactionnel le plus délicatement possible et sous hotte à flux laminaire. Un aliquot a été prélevé en évitant tout contact avec les parois et surtout avec le bord des tubes et déposé avec précautions suivant les mêmes principes dans le tube correspondant de la deuxième réaction. Ces derniers ont été disposés au préalable sur leur portoir de façon à pouvoir les boucher sans risquer d'entrer en contact avec les bords ou l'intérieur des tubes. L'amplification s'est ensuite déroulée suivant une procédure normale.

## 5-5- ELECTROPHORESE DES PRODUITS AMPLIFIES

a) Les produits d'amplification du locus DQA1 conservés à +4°C ont été centrifugés, prélevés à la pipette automatique avec des cones antiaérosols à raison de 10 µl et mélangés avec 2 µl de solution témoin de migration (bleu de bromophénol : 0,25 %, sucrose : 40 %, H<sub>2</sub>O) avant d'être déposés dans les puits d'un gel d'agarose à 1,4 % en tampon TAE 1X (Tris-base 0,04 M, Acide acétique glacial : 1,14 ml, EDTA 0,001, H<sub>2</sub>O qsp 1 l) contenant du bromure d'éthidium (0,7 µg/ml) et de taille : 10,7 X 5 X 0,5 mm.

L'électrophorèse a été réalisée sur support horizontal dans un système de migration pour minigels avec alimentation MP-1 (Eurogentec SA), en tampon TAE 1x, sous un voltage de 100 V pendant 20 minutes.

Les bandes obtenues ont été visualisées par transillumination en lumière UV et comparées aux bandes d'un marqueur de poids moléculaire (GIBCO BRL échelle de 123 pb, 34 fragments multiples de 123 pb). La présence d'une bande de taille attendue (242 pb) était jugée suffisante pour identifier l'amplification du locus HLA.

Une photographie de chaque gel a été prise pendant l'exposition aux UV (film Polaroid 667, 3000 ISO).

b) Les produits d'amplification des séquences d'HHV-6 conservés à +4°C ont été centrifugés et prélevés dans les mêmes conditions que précédemment, mélangés à raison de 12 µl avec 2 µl de solution de dépôt (Bleu de bromophénol : 0,25 %, sucrose : 40 %, H<sub>2</sub>O) puis déposés dans les puits d'un gel d'agarose à 1,4 % en tampon TBE 0,5 X (Tris-base 44,5 mM, acide borique 44,5 mM, EDTA 1,25 mM), de taille 14,0 X 11,0 X 0,8 cm contenant 0,7 µg/ml de bromure d'éthidium. L'électrophorèse a été réalisée sur support horizontal (Horizon TM 11-14 Gibco BRL) en tampon TBE 0,5 X, sous un voltage constant de 90 volts (LKB 2197 Power Supply). Les bandes obtenues ont été visualisées par transillumination en lumière UV et comparées à un témoin de poids moléculaire marqué à la digoxigénine (DNA

Molecular Weight marker VI digoxigenin-labelé (1218611)). Une photographie de chaque gel exposé aux UV a été prise.

## 5-6- TRANSFERT SUR MEMBRANE DE NYLON

Après migration et photographie, les gels contenant les produits d'amplification de séquences d'HHV-6 ont plongés dans une solution dénaturante (NaOH : 0,5 M, NaCl : 1,5 M) pendant 45 minutes à température ambiante, et sous agitation lente, ce qui permet une dénaturation de l'ADN. Le gel a ensuite été placé dans une solution de neutralisation (Tris-HCl : 1 M, pH : 7,4, NaCl : 1,5 M), 30 minutes à température ambiante sous agitation lente, puis un deuxième bain en tampon de neutralisation a été effectué dans les mêmes conditions. Le gel a été alors déposé sur une membrane de nylon (Nytran-plus Schleicher et Schuell) découpée aux dimensions adéquates et préalablement plongée dans l'eau distillée stérile puis dans une solution de 10 X SSC (NaCl : 1,5 M, citrate de sodium à pH 7: 0,15 M) dans un système de transfert sous vide (Vacuum blotter BioRad SA, Ivry/Seine France). Le transfert a été réalisé sous vide à pression constante de 6 mm de mercure en tampon 10 X SSC pendant 90 minutes. A l'issue de cette période, le gel a été placé sur le transilluminateur UV pour vérifier que le transfert s'est bien effectué. L'ADN qui s'est déposé à la surface de la membrane de nylon est fixé par une exposition aux UV pendant 3 minutes. Les membranes de nylon peuvent être conservées sèches à l'abri des poussières et à température ambiante avant hybridation ou utilisées directement.

## 5-7- HYBRIDATIONS

### 5-7-1-LES SONDÉS UTILISÉS

Deux zones distinctes du génome d'HHV-6 ont été amplifiées.

Afin de caractériser les éventuels produits d'amplification et d'augmenter la sensibilité du test, des réactions d'hybridation avec des sondes spécifiques simple brin ont été réalisées.

Deux systèmes ont été utilisés :

- le système décrit par Collandre et Aubin (20) : il utilise une sonde S oligonucléotidique comportant 23 bases, complémentaire du fragment de HHV-6 amplifié par les couples A/B aussi bien que A/C et de séquence : 5' -GGC TGA TTA GGA TTA ATA GGA GA- 3'. Comme les oligonucléotides, elle a été synthétisée dans l'unité de chimie organique de l'Institut Pasteur de Paris par O. Helynck, purifiée par HPLC et contrôlée par séquençage avant d'être lyophilisée. Après reconstitution, elle a été ramenée à une concentration de 20 pmol/ $\mu$ l et stockée à -30°C,

- le système décrit par Cone (22) , utilise une sonde 5R oligonucléotidique comportant 30 bases, complémentaire du fragment de HHV-6 amplifié par le couple H6.6/H6.7 et de séquence R : 5' -CCG TCT TAC TGT ATC CGA AAC AAC TGT CTG -3. Cette sonde a été déterminée par l'auteur et ses collaborateurs en utilisant la séquence d'HHV-6 publiée par Lawrence (44). Elle a été obtenue auprès de Nauplius. Après reconstitution, la concentration de la sonde a été ajustée à 20 pmol/ $\mu$ l.

#### 5-7-2- MARQUAGE DES SONDES A LA DIGOXIGENINE

Les sondes ont été marquées à leur extrémité 3' par incorporation enzymatique de DIG-dUTP (desoxy-uridine triphosphate liée à la digoxigénine) grâce à la transférase terminale (Boehringer-Mannheim, 1417231).

10 pmol d'oligonucléotide ont été mis en présence de :

- DIG-dUTP 50 mM
- terminale transférase 50 unités,
- CoCl<sub>2</sub> : 5 mM,
- dATP : 500 mM

en tampon pH : 6,6 (cacodylate de potassium : 0,2 M, Tris-HCl : 25 mM, BSA : 0,25 mg/ml). Le tout a été placé à 37°C durant 15 minutes puis immédiatement mis dans la glace, la réaction a été stoppée par addition d'une solution de glycogène à 9 µg/ml en EDTA : 0,2 M à pH : 8.

La sonde marquée a ensuite été précipitée à l'aide d'une solution de LiCl 0,1 M et d'éthanol absolu glacial. Le mélange a été agité et maintenu 2 heures à -20°C ou 30 minutes à -70°C.

Après centrifugation à 4 500 g et élimination du surnageant, le culot obtenu a été lavé par 50 µl d'éthanol à 70 % (vol/vol dans H<sub>2</sub>O) glacial, de nouveau récupéré par centrifugation et séché sous vide avant d'être repris dans 40 µl d'eau distillée stérile. Les sondes marquées ainsi obtenues ont été conservées à -20°C.

### 5-7-3- REACTIONS DE PREHYBRIDATION ET D'HYBRIDATION

Les membranes de nylon ayant servi de support aux transferts, convenablement identifiées (dates et nature des échantillons rapportés au stylo dans chaque coin supérieur gauche), ont été passées brièvement dans un bain d'eau distillée stérile puis de 2 X SSC. La même chose a été réalisée avec des coupons de gaze de taille minimale égale à celle des membranes.

Chaque membrane a été disposée sur un de ces coupons, la face portant les ADN vers le haut.

L'ensemble a été roulé et introduit dans un tube pour hybridation. Plusieurs membranes peuvent être placées dans un même tube à condition qu'elles soient toujours séparées par de la gaze, dont le rôle est d'éviter une "adhérence" entre deux membranes ou d'une membrane sur elle-même ce qui aurait pour effet de faire obstacle à la diffusion des solutions. La solution de préhybridation est constituée, pour une membrane de 11 X 14 cm de :

- ficoll 400 : 0,1 % (poids/volume),



- albumine sérique bovine (BSA) 0,1 % (poids/volume),
- polyvinylpyrrolidone (PVP) : 0,1 % (poids/volume),
- SDS : 0,5 % (poids/volume),
- NaCl : 0,9 M,
- Citrate de sodium : 90 mM à pH = 7

pour un volume final de 12,5 ml préparé extemporanément en utilisant des solutions mères concentrées (SDS 10 %),(poids/volume en H<sub>2</sub>O) réactif de Denhardt 10 X, SSC 20 X dont les compositions sont rapportées en annexe.

L'ADN de sperme de saumon (Sigma Chemical CO D1626) dénaturé par chauffage à 100 °C 10 minutes a été ajouté au dernier moment au mélange à raison de 30 µg/ml.

La solution ainsi constituée a été versée dans le tube qui a été fermé, agité délicatement pour positionner la membrane (et au besoin la décoller) et placé dans un four à hybridation (Micro-4 Hybaid Limited) sous rotation lente. La préhybridation a alors été conduite à la température adéquate pendant une durée de trois heures. L'expérience nous a conduit à prendre soin de réaliser un préchauffage du four et des tubes ainsi que des solutions utilisées à la température choisie.

Après la préhybridation, le tube a été ouvert et le liquide éliminé pour être remplacé par la solution d'hybridation constituée de :

- SDS : 18,3 mM,
- NaCl : 0,95 M,
- Citrate de sodium : 95 mM à pH = 7,

pour un volume final de 11,9 ml.

On a ajouté à cette solution 15 pmol de la sonde marquée appropriée et l'hybridation est conduite sous rotation lente pendant 18 heures à la température adéquate.

Les températures utilisées pour chaque système ont été déterminées sur la base des températures de fusion des sondes calculées par une formule dérivée de celle de Mc Conaugly (8) minorées de 8°C.

$T_m : 81,5^{\circ}\text{C} - 16,6 (\log 10 \text{ de la concentration en sodium}) + 0,41$

$(\% \text{ G+C}) - (600/n)$  où "n" est le nombre de bases de l'oligonucléotide considéré.

Chaque système a été optimisé en fonction des résultats obtenus.

Les températures retenues étant :

-  $62^{\circ}\text{C}$  pour le "système de Collandre",

-  $68^{\circ}\text{C}$  pour le "système de Cone".

celles-ci ont été utilisées à la fois pour la préhybridation et l'hybridation des membranes.

#### 5-7-4- LAVAGES

Les conditions de lavage ont été déterminées expérimentalement.

Après l'hybridation, la solution a été retirée et récupérée dans un tube en polypropylène Falcon en vue de sa conservation à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour réutilisation ultérieure (celle-ci a été réutilisée jusqu'à un maximum de 5 fois).

Un premier lavage en SSC 0,1x SDS 1 % (poids/volume en  $\text{H}_2\text{O}$ ) a été réalisé à température décroissante depuis la température d'hybridation, pendant 30 minutes sous rotation lente. Un second lavage a été réalisé avec une solution identique, 30 minutes à température ambiante.

#### 5-7-5- REVELATION PAR CHIMILUMINESCENCE

La solution précédente a été éliminée et remplacée par un tampon de lavage (acide maléique : 0,1 M, NaCl : 0,15 M, Tween 20 : 0,3 %, pH : 7,5) laissé 4 minutes sous agitation lente. Il est alors procédé à une étape de saturation des sites non spécifiques pendant 30 minutes avec une solution "bloquante" (acide maléique : 0,1M, NaCl 0,15 M, agent bloquant à 1 % (poids/volume), pH = 7,5), (DIG luminescent detection kit, Boehringer-Mannheim Biochemica 1363514). Les membranes ont alors été mises au contact de 30 ml d'une solution renfermant un

anticorps anti-digoxigénine (fragments Fab) couplé à une phosphatase alcaline, dilué au 1/10 000 en solution bloquante. Cette étape a été suivie de deux lavages de 15 minutes chacun dans le tampon de lavage déjà utilisé et d'une étape de 3 minutes en tampon basique (Tris-HCl : 0,1 M, pH = 9,5, NaCl : 0,1 M, MgCl<sub>2</sub> : 50 mM) afin d'amener les membranes au pH alcalin favorable à l'activité de la phosphatase.

Les membranes ont ensuite été mises 5 minutes au contact d'une solution de substrat enzymatique (CSPD ou 3-(4-méthoxyspiro (1,2-dioxétane -3,2'-(5'-chloro)tricyclo 3.3.1.1 decan) -4-yl)phenyl phosphate disodique au 1/100 en tampon basique à raison de 15 ml par membrane (Boehringer-Mannheim 1655884). Le CSPD est un substrat chimiluminescent dont la déphosphorylation par la phosphatase alcaline conduit à un anion phénolate métastable qui se décompose avec émission de lumière de longueur d'onde maximale 477 nm, la demi-vie de l'espèce métastable étant suffisante pour assurer une détection pendant une période de plusieurs heures. Toutes ces manipulations ont été réalisées à température ambiante.

Au bout des 5 minutes de contact, le liquide a été récupéré pour réutilisation ultérieure (5 fois au plus sur une courte période), les membranes ont été sorties des tubes et égouttées sur papier absorbant avant d'être scellées dans un sac plastique et placées 15 minutes à 37°C à l'obscurité. Pendant toutes ces manipulations, la solution substrat est exposée le moins possible à la lumière, elle sera conservée à +4°C dans un tube à l'abri de la lumière.

Au bout de 15 minutes, les membranes ont été sorties de l'étuve et mises au contact d'un film Kodak X-OMAT AR (Sigma) dans une cassette pour radiographies. Après 25 minutes d'exposition, les films ont été développés et peuvent être interprétés.

## 5-8- TYPAGE DES SOUCHES PAR ANALYSE DE RESTRICTION

Une technique de typage des échantillons positifs pour le génome d'HHV-6 par PCR, dérivée de celle décrite par Aubin (6b) a été utilisée. Un fragment de 830 pb du génome d'HHV-6 est généré par le couple d'amorces A/C puis 1 µl des produits ainsi obtenus est utilisé comme matrice dans une réaction de PCR nichée A2/C2. Le produit obtenu renferme une concentration élevée d'un fragment de 658 pb. Un aliquot de 8 µl de chaque amplifiat est digéré par 10 unités d'enzyme de restriction Hind III (Boehringer Mannheim) en présence de Tris-HCl 1 mM, NaCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,1 mM, 2-mercaptoéthanol 0,1 mM, pH 8,0 à 37°C pendant une heure. Le résultat de l'incubation est analysé par électrophorèse, dans un gel d'agarose à 1,5 % en tampon TBE 0,5x, de taille 14,0 X 11,0 X 0,8 cm, contenant 0,7 µg/ml de bromure d'éthidium. L'électrophorèse a été réalisée sur support horizontal (Horizon TM 11.14 Gibco BRL) en tampon TBE 0,5x, sous un voltage constant de 50 volts (LKB 2197 power supply). Les bandes obtenues ont été visualisées par transillumination aux UV et comparées à un témoin de poids moléculaire (Gibco BRL, échelle de 123 pb).

Le typage est basé sur l'existence d'un site reconnu par Hind III dans les amplifiats de souches de type B et non dans les amplifiats de souches de type A. Les fragments amplifiés à partir d'HHV-6 type A restent inchangés alors que l'amplification à partir du type B aboutit après restriction enzymatique à deux fragments, respectivement de 477 et 181 pb directement visualisables.

L'ADN extrait d'une souche de type B connue a été utilisé comme témoin positif et traité comme les autres échantillons.

## 6 - RESULTATS

### 6-1- CONCERNANT LES ECHANTILLONS TISSULAIRES

#### 6-1-1- COMPARAISON EXTRACTION/LYSE, AMPLIFICATION DU LOCUS DQA1 DU SYSTEME HLA

Dix échantillons ont été étudiés. Après extraction phénol.chloroforme classique ou simple lyse cellulaire, ils ont été soumis à une réaction d'amplification pour la recherche du gène dQA1.

- Une bande de taille attendue (242 pb) a été observée pour les dix échantillons ayant subi l'extraction. Un d'entre eux présentait une amplification faible.

- Seuls deux échantillons ont été amplifiés après simple lyse cellulaire.

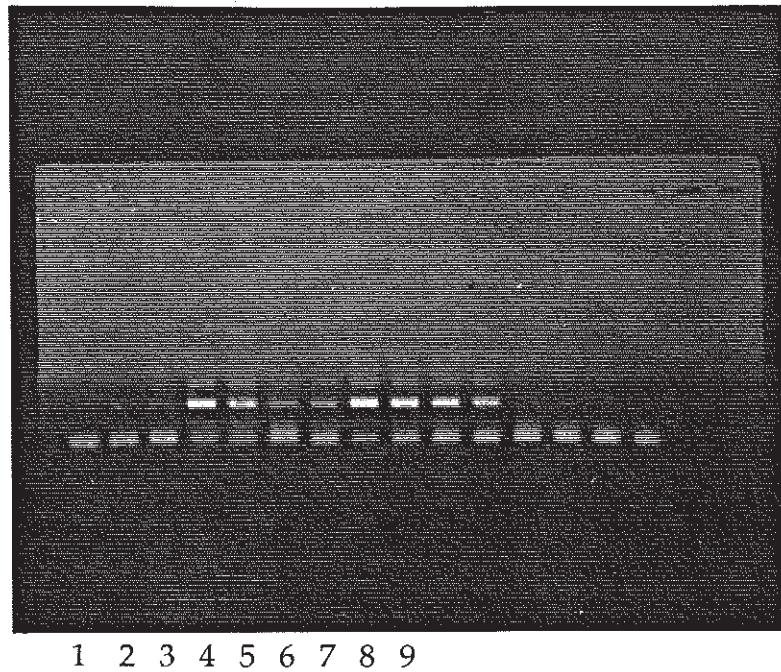
- Tous les autres échantillons tissulaires ont par la suite été extraits uniquement par la technique classique au phénol/chloroforme, et amplifiés avec les amorces GH26 et GH27 pour la recherche du gène dQA1.

Au total, sur les quatre vingt sept échantillons étudiés, soixante dix huit (dont les neuf prélèvements pré-cités) ont donné une réaction positive de forte intensité à la lecture en transillumination UV, trois une réponse positive faible et cinq une réponse négative.

Les neuf échantillons ayant été faiblement ou pas du tout amplifiés (ou de façon non détectable) ont été soumis à des dilutions en eau distillée stérile au cinquième, dixième, cinquantième et centième, et la réaction d'amplification a été réeffectuée.

Pour sept échantillons, les résultats deviennent nettement positifs à partir d'une dilution au cinquième, un échantillon nécessite une dilution au cinquantième,

un seul n'a pas pu être amplifié dans aucune de ces conditions et a été exclu de l'étude. La figure 8 illustre ces résultats.



De gauche à droite :

1 : témoin négatif

2 N°1 : 1/10

3 N°1 : 1/50

4 N°1 : 1/50

5 N°1 : 1/100

6 N°2 : 1/5

7 N°2 : 1/10

8 N°2 : 1/50

9 N°2 : 1/100

**Figure 8 : Réactions d'amplification après dilutions des inhibiteurs**

### 6-1-2- RESULTATS : TECHNIQUE DE COLLANDRE

Sur les quatre vingt six échantillons extraits donnant une réaction positive pour la recherche du gène dQA1 et donc considérés comme de qualité suffisante pour être amplifiables, un seul échantillon a donné un résultat positif pour l'amplification virale à l'aide des amorces A et B , après visualisation en transillumination UV. L'hybridation à l'aide de la sonde S spécifique marquée à la digoxigénine suivie d'une révélation par chimiluminescence a permis de confirmer la spécificité du produit amplifié et n'a pas révélé d'autre échantillon positif malgré l'augmentation théorique du seuil de sensibilité.

L'échantillon positif provient d'un patient masculin de 72 ans pour lequel un LMNH lymphoblastique B de haut grade de malignité a été diagnostiqué.

L'amplification de cet échantillon a été répétée ainsi que le transfert sur membrane de nylon suivie d'hybridation. Les mêmes résultats ont été trouvés chaque fois.

Tous les témoins utilisés au cours de ces réactions ont été conformes aux résultats attendus et en particulier aucune contamination n'a été à déplorer.

### 6-1-3- RESULTATS : TECHNIQUE DE CONE MODIFIEE

Les mêmes échantillons ont été amplifiés avec le système d'amorces décrit par Gopal (34) et hybridés à l'aide d'une sonde spécifique proposée par Cone (22). Sur les quatre vingt six prélèvements :

- trois ont montré une amplification détectable à la lecture par transillumination lumière UV,
- six ont été trouvés positifs à l'hybridation (dont les trois échantillons décelés en UV).

Les six échantillons positifs provenaient respectivement :

- de deux cas de lymphome de Hodgkin classés de type 2, scléronodulaires et de sous-type 3, les patients étant un homme de 45 ans et une femme de 71 ans,
- d'un patient masculin de 81 ans porteur d'un LMNH centroblastique polymorphe trouvé positif aux UV et en hybridation,
- du patient masculin de 72 ans, atteint d'un LMNH lymphoblastique B de haut grade de malignité, trouvé positif dans le système précédent et détecté également aux UV,
- d'un cas de LMNH à cellules pléomorphes de type T diagnostiqué chez un homme de 73 ans, détectable en UV,
- d'une patiente âgée de 23 ans porteuse d'adénite conduisant à une suspicion de sarcoïdose.

Ces six échantillons ont été amplifiés à nouveau, les produits obtenus après migration sur gel ont été révélés par transillumination en lumière UV, transférés et hybridés.

Afin de tenter d'améliorer le rendement de la détection par les UV, les quantités déposées dans le gel ont été augmentées de 50% et les puits utilisés ont été choisis plus fins pour favoriser une concentration des produits. Tous les échantillons ont été détectés par transillumination dans ces conditions, quoique d'intensité parfois très faible. Les hybridations ont confirmé les résultats déjà obtenus.

L'examen de tous les témoins utilisés dans ces réactions n'a pas révélé d'anomalie, les témoins positifs étant amplifiés de façon constante et reproductible, les témoins négatifs n'ayant fait l'objet d'aucune amplification.

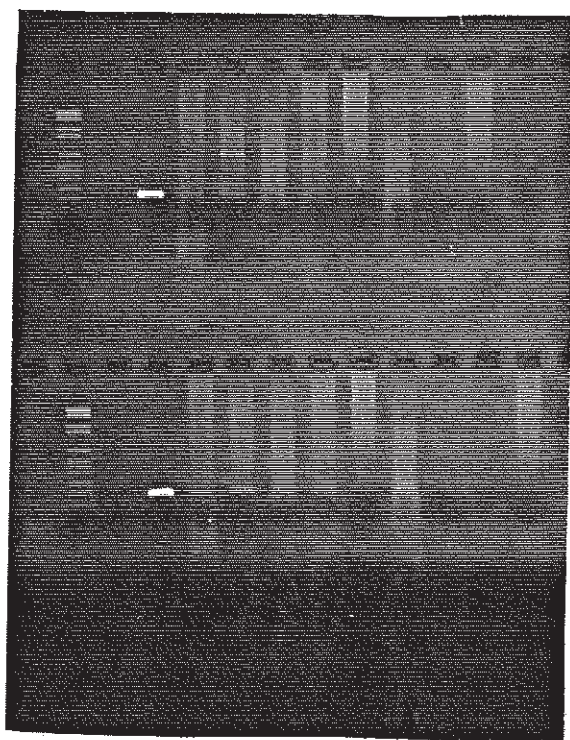
A la suite de ces conclusions, les échantillons présentant des résultats discordants entre les techniques d'amplification ont été réamplifiés en utilisant le système emprunté à H. Collandre (20) et l'amélioration du rendement de la détection a été également recherché suivant les mêmes modalités que précédemment.



Des produits de taille appropriée mais en quantité très faible et dont les amplifications semblaient de qualité médiocre par lecture en transillumination en lumière UV n'ont pas pu être détectés par hybridation.

Les résultats de ces manipulations sont présentés dans les figures 9 et 10.

1 2 3 4 5 6 7 8 9



Système de  
Collandre

Système de  
Cone

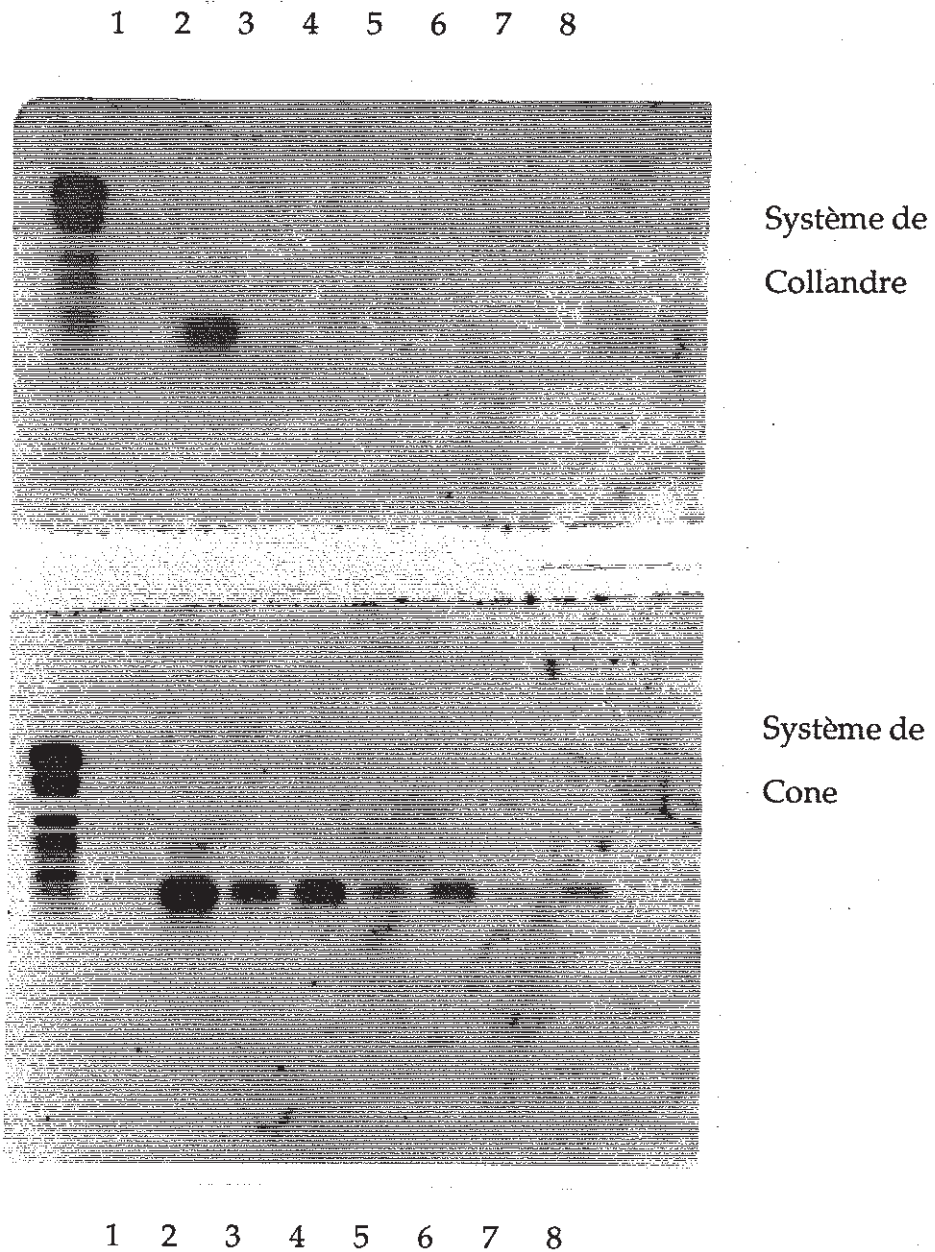
1 2 3 4 5 6 7 8 9

1 : témoin négatif

2 : témoin positif

3 à 8 : échantillons

**Figure 9 : Electrophorèse sur gel d'agarose et visualisation en lumière UV  
des échantillons discordants**



De gauche à droite :

- témoin de poids moléculaire
- 1 - témoin négatif
- 2 - témoin positif
- 3 à 8 échantillons

Figure 10 : Hybridation des échantillons discordants

#### 6-1-4- RESULTATS OBTENUS PAR PCR NICHEE

Les échantillons détectés de façon discordante par les techniques précédentes ont été amplifiés suivant un protocole emprunté à Secchiero (75). Celui-ci présentait l'avantage de rechercher l'amplification de la même séquence que celle choisie par H. Collandre. En fait, la technique de Secchiero fait appel à deux couples d'amorces, le premier externe (A1/C1) est emprunté à H. Collandre mais une modification est introduite dans l'amorce A (figure 7), le second interne (A2, C2) est défini par cet auteur et permet la réalisation de la PCR "nichée".

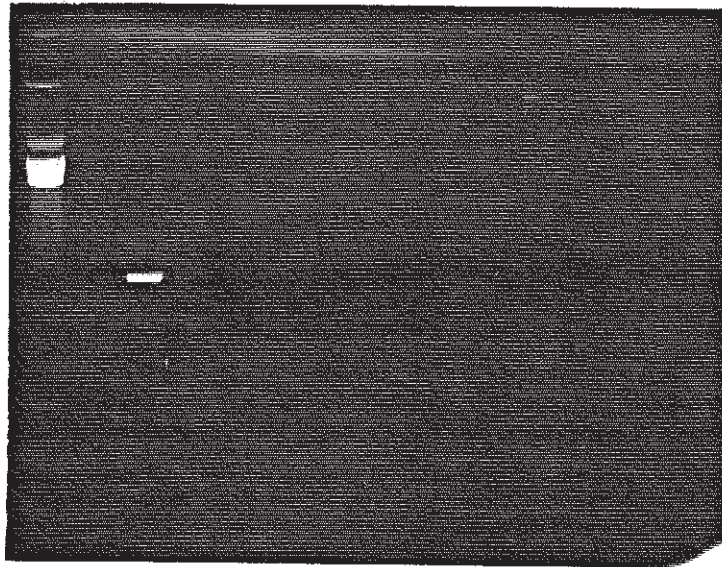
Sur les six échantillons trouvés positifs par le système de cone modifié, aucun n'est trouvé positif par transillumination en lumière UV après l'amplification par A1/C1, par contre l'amplification du fragment interne par A2/C2 permet de détecter cinq positifs de forte intensité dans les mêmes conditions et un positif très faible.

Ces échantillons étaient respectivement les cinq échantillons discordants entre les techniques de Cone et Collandre et l'échantillon trouvé positif dans les deux méthodes.

Suite à ces résultats, les six échantillons précédents ont été réamplifiés suivant un protocole semblable mais en utilisant les couples d'amorces A/C définis par Collandre et dans un deuxième temps A2/C2 proposé par Secchiero, ceci afin de vérifier si l'utilisation de l'amorce modifiée A1 pouvait être à l'origine de la faible détection de l'échantillon pourtant trouvé nettement positif jusqu'ici.

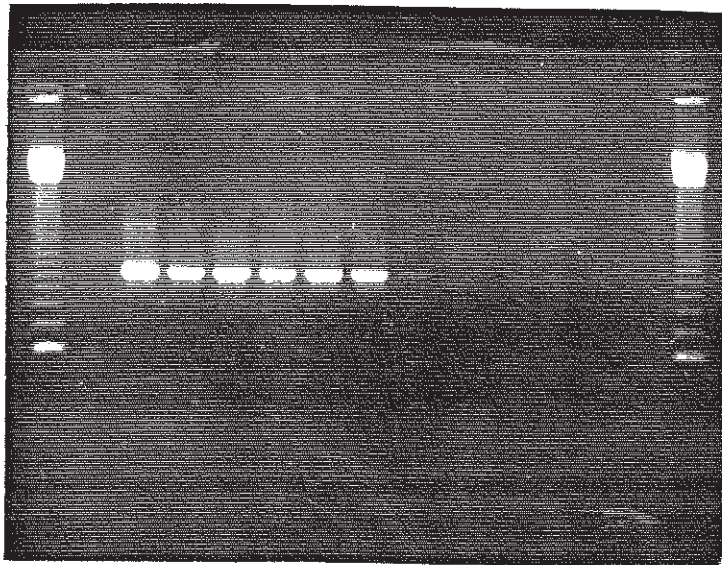
Sur les six échantillons, aucune amplification n'était détectable à l'examen par les UV après la première étape A/C, par contre cinq échantillons ont montré une bande de taille attendue à l'issue de la seconde PCR interne (A2/C2).

L'échantillon correspondant au patient atteint d'un LMNH lymphoblastique n'a pas non plus été détecté par cette réaction (figure 11). Le tableau 7 récapitule pour plus de commodité tous ces résultats.



PCR  
A/C

PM 1 2 3 4 5 6 7 8



PCR  
A2/C2

PM 1 2 3 4 5 6 7 8

PM : échelle de 123 pb  
1 : témoin négatif  
2 : témoin positif

3 à 7 : échantillons discordants  
8 : échantillon positif pour Cone  
et Collandre

### 6-1-5- TYPAGES

Cinq échantillons ont pu être typés, tous présentent comme la souche témoin B un clivage en deux fragments dont les tailles correspondent à ce qui était attendu, une bande surnuméraire de taille supérieure est sans doute le signe d'une digestion partielle du fragment initial. La souche GS qui a servi de témoin d'amplification n'est pas clivée, étant de type A (Figure 12).

### 6-1-6- PROBLEME DES INHIBITEURS

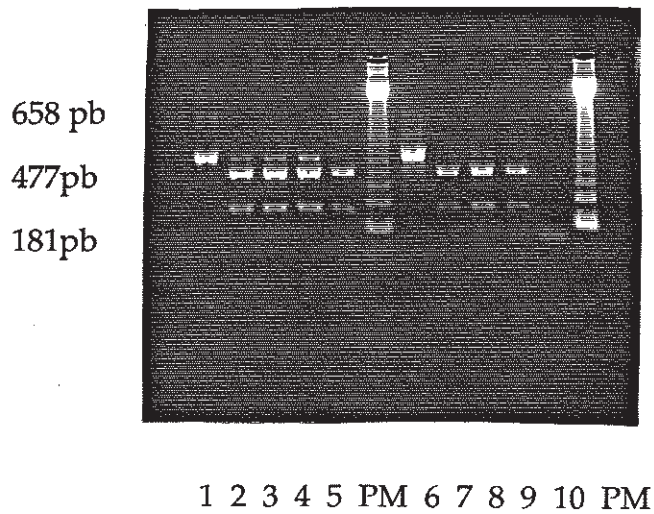
Dix des échantillons testés contenaient certainement des inhibiteurs de la réaction de polymérisation. Les mauvais résultats obtenus pour ces échantillons d'ADN extraits lors de l'amplification pour le locus dQA1 ont déjà été décrits dans le paragraphe 6-1-1. Les dilutions réalisées ont eu pour objectif de diminuer la proportion d'éventuels inhibiteurs de la réaction par rapport aux concentrations d'enzymes et de réactifs employés.

Sur quatre échantillons faiblement amplifiés, la réalisation de dilutions au cinquième, dixième, cinquantième et centième de l'ADN matrice en eau distillée stérile a permis d'obtenir, dans trois cas, un meilleur rendement de la réaction dès la dilution au cinquième. Pour un prélèvement cependant on a noté une disparition totale de l'amplification et l'échantillon a été considéré non amplifiable.

Sur cinq échantillons non amplifiés purs, la même démarche a permis d'obtenir quatre réactions positives dès la dilution au cinquième et une à partir de celle au dixième.

Au total, huit des neuf échantillons ont pu être amplifiés ainsi pour le système GH26/GH27 avec une intensité suffisante.

Pour chaque échantillon, la plus faible dilution donnant une amplification de bonne qualité a été retenue et utilisée pour les réactions suivantes.



1 : témoin souche GS

2 : échantillon 1

3 : échantillon 2

4 : échantillon 3

5 : témoin souche B

PM : échelle de 123 pb

6 : témoin souche GS

7 : échantillon 4

8 : échantillon 5

9 : témoin souche B

10 : témoin négatif

**Figure 12 : Electrophorèse sur gel d'agarose  
et visualisation en lumière UV des produits de la PCR nichée  
soumis à restriction enzymatique par Hind III**

## 6-2- RESULTATS CONCERNANT LES SERUMS

### 6-2-1- RESULTATS : TECHNIQUE EMPRUNTEE A H. COLLANDRE

Sur les 32 sérums extraits et testés, un seul des échantillons a présenté une amplification avec les amorces A/B détectable par transillumination en lumière UV et le fragment présente la taille requise. Ce sérum a été prélevé chez un patient atteint de LMNH lymphoblastique et pour ce même patient, le génome viral avait été détecté dans l'échantillon ganglionnaire.

### 6-2-2- RESULTATS : TECHNIQUE DE CONE MODIFIEE

Les mêmes échantillons ont été amplifiés par cette technique. Un seul a pu être considéré comme positif après transillumination en lumière UV, il s'agissait du même que précédemment.

## 6-3- RESULTATS CONCERNANT LES MOELLES

Quatre biopsies ostéo-médullaires effectuées pour des patients chez qui a été détecté le génome d'HHV-6 par les techniques précédentes, ont pu être obtenues auprès du service d'anatomie-pathologique.

Après extraction, les ADN de ces biopsies ont été amplifiés selon les techniques de Collandre, Cone et de la PCR nichée selon Secchiero. Ces résultats ont été les suivants :

- aucune positivité par la technique de Collandre que ce soit en lumière UV ou par hybridation,
- pas d'échantillon positif en transillumination en lumière UV mais trois positifs à l'hybridation par la technique de Cone,

- pas d'échantillon positif après la PCR nichée.

Sur quatre prélèvements étudiés, trois ont été trouvés positifs pour le génome d'HHV-6 par la technique de Cone après l'étape d'hybridation. Aucun positif n'a été trouvé par la technique empruntée à Collandre.

Ces quatre prélèvements ont également été testés dans une réaction de PCR nichée A/C/A2/C2, aucun positif n'a été détecté. Ces échantillons correspondaient à quatre des six patients trouvés positifs pour le génome à partir de biopsies ganglionnaires.

Tous les prélèvements avaient été trouvés positifs pour le fragment du gène dQA1 du système HLA.

#### **6-4- RESULTATS : SYSTEME MIE4/MIE5**

Les échantillons trouvés positifs pour HHV-6 ont été amplifiés avec les amorces MIE4/MIE5 destinées à la détection du génome du CMV. Aucune amplification n'a pu être détectée dans ces prélèvements.

Tous ces résultats sont présentés dans le Tableau 7.



Patients	Diagnostics	GANGLIONS						SERUMS						MOELLES					
		PCR Collandre		PCR Cone		PCR nichée	PCR Collandre		PCR Cone		PCR Collandre	PCR Cone		PCR nichée					
		UV	H	UV	H		UV	H	UV	H		UV	H						
93 15776 F. JF	Hodgkin scléro- nodulaire type II sous type 3	-	-	+/-	+	UV	H	-	-	UV	H	-	-	UV	H	-	-	UV	H
93 4214 M. M.	Hodgkin scléro- nodulaire type II sous type 3	-	-	+/-	+	UV	H	-	-	UV	H	-	-	UV	H	-	-	UV	H
93 9601 P. L.	LMNH centroblastique polymorphe B	-	-	+	+	UV	H	-	-	UV	H	-	-	UV	H	-	-	UV	H
90 9714 A. J.	LMNH lymphoblastique haut grade malignité B	+	+	+	+	UV	H	+	+	UV	H	+	+	UV	H	-	-	UV	H
93 3852 L. E.	LMNH pléomorphe moyennes et grandes cellules T	-	-	+/-	+	UV	H	-	-	UV	H	-	-	UV	H	-	-	UV	H
93 17302 M. N.	Adénite sarcoïdose ?	-	-	+/-	+	UV	H	-	-	UV	H	-	-	UV	H	-	-	UV	H

TABLEAU 7 : RECAPITULATION DES RESULTATS

## 7 - DISCUSSION

### 7-1- DETECTION DU GENOME D'HHV-6 DANS LES BIOPSIES TISSULAIRES PAR AMPLIFICATION GENIQUE

#### 7-1-1- GENERALITES

La PCR est un outil performant qui peut présenter un intérêt considérable dans les études virologiques. Cette technique très sensible permet d'amplifier spécifiquement une séquence virale puis de la caractériser formellement sans nécessiter l'isolement du virus. Elle n'exige qu'une très faible quantité d'échantillon, celui-ci pouvant être de nature très diverse (cellules mononuclées sanguines, tissus, sérums...) et ne pas avoir été initialement destiné à cet usage (tissus inclus en paraffine, frottis cellulaires, etc...), ce qui permet d'envisager des études rétrospectives sans préjuger pour autant de résultats de moindre qualité, en particulier lorsque l'on s'adresse à l'ADN.

Utilisant ce potentiel, de nombreux auteurs ont appliqué la PCR à la recherche du génome d'HHV-6 dans différents prélèvements et dans des contextes pathologiques variés afin de tenter d'associer la présence virale à la genèse ou l'évolution d'une maladie. Les méthodes utilisées sont multiples (15, 20, 22, 23, 32, 75, 81). Les systèmes d'amorces sont complémentaires de différentes parties du génome dont les séquences ont, de plus, été déterminées sur des fragments donnés à partir de souches virales distinctes. Certains auteurs utilisent l'hybridation pour caractériser les produits amplifiés, tandis que d'autres préfèrent avoir recours à la PCR "nichée" (nested PCR). Les conditions d'extraction d'ADN elles-mêmes sont particulières à chaque groupe. Dans ce contexte, les résultats publiés sont très variables, et ce pour le même type d'échantillonnage et d'objectifs poursuivis. Ainsi, de nombreux travaux recherchant un rôle d'HHV-6 dans le développement des lymphomes

humains n'ont pas fourni d'informations certaines. Des résultats discordants sont rapportés, allant de 86 % (15) à 0 % (81) de détection du génome d'HHV-6 dans les LMNH. La présence d'HHV-6 dans les lymphomes de Hodgkin semble être rapportée de manière plus homogène et se situe entre 12 et 35 % des échantillons testés (26, 81).

### 7-1-2- ECHANTILLONNAGE

L'objet du présent travail a été de voir si nous pouvions arriver à dégager des résultats informatifs à partir d'une série de lymphomes hodgkiniens et non hodgkiniens à laquelle a été adjointe, comme contrôle, une petite population d'adénites d'étiologies diverses.

La sélection des patients, faite a posteriori du diagnostic anatomopathologique, a répondu à des critères ayant pour objectif d'assurer le plus possible d'informations. Ainsi, les lymphomes associés au SIDA n'ont pas été retenus, leur cas est particulier puisque on observe une incidence des LMNH environ soixante fois plus forte chez les HIV positifs que dans la population générale (7). D'autre part, l'échantillonnage s'est voulu le plus large possible en incluant le plus de variété possible de lymphomes.

### 7-1-3- TRAITEMENT DES PRELEVEMENTS

Un des écueils majeur de la PCR est le risque de résultats faussement positifs. Au niveau du traitement des prélèvements, ce risque a été extrêmement minimisé par la manipulation exclusive de très petites séries ce qui représente un travail fastidieux, mais est un des meilleurs gages de non contamination, l'adoption d'un protocole rigoureux utilisant un matériel propre et le plus souvent stérile y a également contribué. L'adjonction de contrôles négatifs à chaque série a permis de montrer qu'il n'existait pas de contamination.

Cette technique ne s'affranchi pas non plus du risque de faux négatifs, et c'est sans doute un des problèmes d'interprétation majeur des résultats. Deux approches ont été utilisées au niveau du traitement des échantillons pour tenter de minimiser ce problème. La PCR, bien que très sensible, nécessite de disposer d'un acide nucléique matrice de qualité suffisante et présent en quantité minimale. Pour atteindre au mieux ces objectifs et sachant que seule une faible charge virale pouvait être attendue dans les échantillons (23, 71), une technique de lyse cellulaire simple (31) a été essayée sur un nombre restreint de prélèvements. Bien qu'évitant la perte de matériel, les résultats ont été très décevants, sans doute dus à une forte proportion d'inhibiteurs dans les échantillons. Cette technique a donc été abandonnée au profit d'un protocole classique assurant une bonne pureté des échantillons mais un rendement certainement plus faible.

#### 7-1-4- QUALITE DES ADN EXTRAITS

Toujours dans le but de s'affranchir des faux négatifs, chaque prélèvement a été amplifié pour le locus dQA1 du système HLA, porté par toutes les cellules humaines différenciées.

L'observation d'une amplification rendait ainsi compte de la présence d'ADN dans les échantillons ainsi que de l'absence d'inhibiteurs. Les quelques cas où cette amplification ne s'est pas effectuée ont été résolus en utilisant la dilution progressive des ADN. L'utilisation d'une quantité de matrice relativement importante au départ (1  $\mu$ g) rend cette approche possible, toutefois la plus faible dilution donnant un résultat satisfaisant a été retenue afin de diluer au minimum d'éventuelles séquences virales déjà rares.

### 7-1-5- CHOIX DES SYSTEMES D'AMPLIFICATION

Deux systèmes principaux ont été choisis dans la littérature. Leur choix a été déterminé en tenant compte de l'intérêt et du sérieux apparent des études menées par les auteurs. Lors du choix de ces systèmes, toutes les données sur les séquences génomiques intéressant les amorces et les sondes décrites n'étaient pas disponibles dans la littérature, certaines séquences n'étant pas publiées et/ou stockées dans des banques génomiques, d'accès mal aisé, puisque soumises à abonnements.

Les zones amplifiées étaient pour la plupart initialement issues de séquences clonées de fonction mal définies et la séquence génomique virale étant seulement partiellement connue, la spécificité des systèmes a été appréciée sur leur capacité à ne pas amplifier les séquences génomiques des virus de filiation voisine.

Ainsi, le système modifié par Cone a été testé sur un grand nombre de souches d'HSV, de CMV, d'EBV, de VZV et d'HHV-7 (22) et différentes souches d'HHV-6 par les auteurs. De même, pour le système décrit par Collandre, et de plus il a été vérifié les scores d'homologie avec des virus voisins par comparaison de séquence dans les banques génomiques (20).

L'examen des oligonucléotides amorces a en outre, confirmé qu'ils ne présentaient pas de complémentarité interamorces et intrachaine. Dans le cas du système de Cone, l'existence d'une séquence publiée (44) a permis, en y confrontant les amorces et la sonde 5R, de vérifier la validité du système et d'écartier d'éventuelles erreurs typographiques toujours possibles, d'autre part l'adoption par Cone d'une sonde différente de celle décrite par Gopal (34) semble, au vu de la séquence, justifiée par les possibles complémentarités intrachaine de cette dernière.

## 7-1-6- DISCUSSION DES RESULTATS DE PCR

L'adoption de deux systèmes d'amorces distincts avait pour objectif principal d'obtenir une détection du génome viral avec une sensibilité maximale, l'un des systèmes pouvant s'avérer plus sensible que l'autre.

D'autre part, la réalisation d'amplification en parallèle sur deux zones distinctes du génome était susceptible d'accroître la spécificité en facilitant la détection d'éventuels faux positifs par amplification de séquences génomiques phylogénétiquement proches, à l'origine d'éventuelles discordances entre les deux systèmes.

La sensibilité de chaque système avait été évaluée par les auteurs en utilisant des dilutions de plasmides porteurs de la séquence d'intérêt, les résultats rapportés étant respectivement de 0,3 fg pour Collandre (20) et pour Cone (22). Ne disposant pas de ce type de matériel, ces déterminations n'ont pas été vérifiées. Seul le système de Collandre a été testé dans un précédent travail (61) et a permis l'amplification de 1 fg d'ADN extrait de cellules en culture infectées par une souche GS.

Les résultats obtenus en utilisant ces deux systèmes ont présenté des discordances. Six positifs pour le génome d'HHV-6 ont été trouvés par le système de Cone modifié (22) et ce, de façon reproductible puisque les amplifications ont été refaites plusieurs fois. D'autre part, le fait que ces échantillons n'aient pas été extraits dans les mêmes séries écarte, a priori, le risque de contaminations à ce stade d'autant que les prélèvements positifs se sont chacun trouvés dans une série d'extraction différente. Un seul échantillon a été trouvé positif par le système A/B emprunté à Collandre ; il avait aussi été trouvé positif par la technique de Cone. Cette discordance était d'autant plus inattendue que le système est présenté dans la littérature comme très sensible (6, 20) et a été utilisé par différents auteurs avec des taux de positivité importants (26). Ne disposant pas des constructions plasmidiques porteuses des fragments ciblés, une comparaison rigoureuse des seuils de sensibilité pour les deux systèmes n'a pu être effectuée. Des auteurs (75) ayant décrit un

système de PCR nichée, utilisant comme oligonucléotides amorces externes un des couples utilisé par Collandre, des essais d'amplification des échantillons discordants et consensus ont été menés dans l'espoir de pallier à un problème de sensibilité de la technique. Le couple d'amorces externes A1/C1 utilisé par Secchiero présentait une amorce A1 équivalente à l'amorce A de Collandre, mais comprenant trois bases additionnelles en 5' et une insertion d'un T, inexplicée par la confrontation avec la séquence publiée par Josephs (40). L'amorce C1 était identique en tout point à C définie par Collandre. La séquence exacte du clone pHc-5 ayant servi à définir les oligonucléotides de ces auteurs n'étant pas publiée à notre connaissance, il a été décidé de tester les deux couples A1/C et A/C, suivis d'une PCR nichée utilisant les amorces A2/C2 internes, définies par Secchiero (75). Les cinq échantillons discordants, trouvés négatifs par la technique classique de Collandre, ont été détectés par la réaction de PCR nichée qui apparaît présenter une grande sensibilité. Toutefois, l'unique prélèvement trouvé positif jusqu'alors par les deux systèmes n'était que très faiblement amplifié et presque indétectable.

Aucune différence flagrante n'a été relevée entre les essais utilisant l'amorce A ou A1. L'une de ces amorces est certainement sujette à un mésappariement mais la PCR externe présente sans doute un rendement suffisant pour que le produit soit détectable par l'amplification d'un segment interne. L'absence d'amplification réitérée de l'échantillon "consensus" pose par contre un certain nombre de problèmes. Une explication vraisemblable est l'existence d'un polymorphisme de séquence entre les souches virales dans la zone considérée et touchant le site reconnu par l'une des amorces utilisées. Un examen attentif de la littérature et des résultats présentés par Aubin (6a) sur l'existence de polymorphismes de séquence touchant cette zone génomique montre, en effet, l'existence de codons variants entre différentes souches d'HHV-6 présentées. Ainsi, les codons 116 et 117 (numérotation selon Josephs) correspondant aux 6 bases en 5' de l'amorce C2 présentent un polymorphisme important, de même pour le codon 335 correspondant au trois dernières bases en 5' de l'amorce A2 (Figures 13 et 14) et le codon 336

## Séquences des codons affectés par des modifications de bases

Souches	116	117	335	336	177
SIE	GTC	GGA	CCT	ATT	GTT
TAN	CTA	GGA	CCT	ATT	GTT
GS	CTC	GGA	CCT	ATT	GTT
U1102	CTC	GGA	CCT	ATT	GTT
HST	TTT	GGC	CCC	ATG	GCT
BOU	TTT	GGC	CCC	ATG	GCT
MAR			CCC	ATG	GCT
BLE			CCC	ATG	GCT
MBE	TTT	GGC	CCC	ATG	GCT
BLA	TTT	GGC	CCC	ATG	GCT

Les séquences des codons rapportées ici sont empruntées à la numérotation utilisée pour la séquence du gène de la grosse protéine du tégument d'une souche GS (Joseph's, 1991)

**Figure 13 : Codons variants dans le gène de la grosse protéine de tégument**



2679

5'...AGATACGGTGTACACAGCATGAACTCTCAGGGCCATTTAACGGAACCCTAGACACACAA*Amorce C*AAAATTGACAATGAGGTATATCTCGGACTCATAGATCTCATACTGTATGGCAAAGCAAGAAT*Amorce C2*

GGTCCTACTTTTTGCAGTCATCACGATCGGCGTGCTATCGCGAGCACTTTTTTTTCTTAACAATACT

CTCTACTTATTCGACTCTCACCTACTGAACGAGAAGCCACGGCAGCCATCTACATCTGTCAAAA

CATTGAAGAAGTTTATGAACTGCTCACCACCCACGGCACCGAAGGCTTCTACTACGACGCCAGC

CTCATTTTTTTCATAGAAACCTCCAATTTGTCCCTCTCTAGTCACGACGCCGAGCTTCTCATCCTA

AAAACCTATAAAGACCCCGACATAGCGATTGCGCTAGATAAATTTTCTTCCACGGAAATCCATG

AGATAAAAAAACAGATGATATCGGATCGCAACAAGACCTCGTTGCGGATAAAACGACAGATC

TAGAACACGCGCCTCATAAAAGAAAGAAAACTCTCATAGTCTAGAACTAGAACTAAATGACA

AAAAGAAAAAAGATACCGCATCCTTGACATATTACCGCAACAGAGTTGACCTCATTCCGAGTTTT*Amorce B* (TACCGACATCCTTGACATATTAC)

TATGAACTACGATCACAATTTCAATCTTTATTTACGATCTCAAATCTTTTCTATAATGAAATCT

AATTTCAACTGGACCATATACTTACAAGATTCTCCTATTAATCCTAATCAGCCCTTCGCAACACC

*Amorce A2* CTGGTATATGAATGTTCTAAGAGGATAATTAGGATTAGTCGG

CTTTCTCTGGAACAGAGTTTTCCACTTATTGTGTCAAATTATCGACGTGTTTGTAGGCGTCGGATC

*Amorce A* CACAAACATCCGCAGCCTAG

CACAAATGACGATTCT...3'

3531

Figure 14 : Localisation des amorces A, B, C, A2, C2 et de la sonde S (caractères soulignés).

immédiatement adjacent à celle-ci. Ces variations de bases, bien que touchant les extrémités 5' des amorces sont de nature à entraîner un mésappariement important qui peut expliquer un rendement médiocre d'amplification pour les souches concernées et peut-être pour notre souche consensus.

#### 7-1-7- TYPAGE DES SOUCHES VIRALES

Le couple d'amorces A/C a été décrit et utilisé fréquemment (6, 26, 75) pour l'amplification et le typage des différentes souches d'HHV-6. La séquence amplifiée renferme un polymorphisme de restriction. Un site Hind III est en effet présent dans un certain nombre de souches virales HHV-6 que l'on classe en groupe B et absent dans les autres souches ou groupe A.

Comme nous l'avons déjà mentionné, la classification en deux groupes des souches d'HHV-6 ne se fonde pas seulement sur des études par PCR d'une portion limitée du génome mais aussi sur des études de profils de restrictions mis en évidence par southern blot (41), des critères de croissance en culture cellulaire, et des études antigéniques à l'aide d'anticorps monoclonaux (1, 6a). La différenciation en deux groupes, le type A dont le prototype est la souche GS ou isolat initial de Salahuddin et le type B, dont le prototype est la souche Z29 (1) est important à considérer dans une étude épidémiologique puisque les pouvoirs pathogènes attribués aux différentes souches sont rapportés divergents (13, 25). Le type A est moins rencontré que le type B (dans la proportion d'un isolat sur trois en moyenne) ; il n'est pas surprenant dans ce contexte, que les cinq échantillons qui ont pu être typés dans ce travail appartiennent au groupe B. Ce fait toutefois est en contradiction apparente avec l'explication avancée au paragraphe précédent pour la non amplification par A/C/A2/C2 d'un des échantillons positifs. En effet, on aurait pu s'attendre à ce que des souches de type B présentant des divergences sur les codons 116, 117 et 335 soient mal ou pas amplifiées par le couple A2/C2 et on aurait pu alors supposer avoir à faire à 5 souches A et une B. Le fait que les divergences n'affectent

que des liaisons en 5' des amorces explique sans doute que la réaction d'amplification puisse tout de même se produire pour les cinq souches typées B. La non amplification d'une des souches reste inexpliquée. Toutefois, l'existence et la détermination dans cette région de polymorphismes n'a été réalisée que sur une dizaine de souches différentes (6a). Il est peut être possible que d'autres codons variants n'aient pas encore été décrits et pourquoi pas affectant l'une ou l'autre des complémentarités en 3' des sondes utilisées. Seule la détermination partielle des séquences en cause sur l'échantillon permettrait de répondre à cette question.

## 7-2- DISCUSSION DES RESULTATS DES SERUMS

Des auteurs ont décrit la présence de l'ADN d'HHV-6 dans le sérum comme un marqueur potentiel d'infection active par le virus (75). Le virus, se répliquant activement, conduit à la lyse cellulaire et serait alors retrouvé dans les liquides biologiques sous forme libre. Cette approche paraît intéressante pour rechercher les effets pathologiques d'HHV-6 car elle permettrait de corréler une réplication active du virus et l'existence concomitante d'une pathologie. Des techniques rapides et performantes d'extraction d'ADN à partir de sérums ont été décrites (12) et utilisées sur d'autres virus (11) et sur HHV-6. Sur les trente deux sérums étudiés, un seul échantillon positif a été trouvé mais celui-ci correspondait à un de nos patients positifs bien que non amplifiable en PCR nichée. La recherche d'ADN viral par PCR sur sérums comme marqueur de replication active est controversée car les risques de contamination cellulaire, et en particulier dans le cas d'un virus lymphotrope latent, sont réels. Il paraît en effet très difficile d'écarter une lyse cellulaire lors des opérations de prélèvement et de décantation des sérums, et encore plus dans le cas de sérums congelés et non destinés à l'origine à une détection PCR. La réalisation d'une amplification HLA pourrait constituer un contrôle en détectant la présence d'ADN cellulaire dans les échantillons. Un autre problème se pose pour cette

technique pour laquelle on ne dispose pas de contrôle de qualité de l'échantillon extrait, pour vérifier l'absence d'inhibiteurs puisqu'en principe la présence d'ADN cellulaire est considérée comme une contamination et donc inexploitable. Seul un apport d'ADN exogène pourrait permettre un tel contrôle. Malgré ces réserves et bien qu'un essai HLA sur l'échantillon trouvé positif pour HHV-6 ait fourni une très faible amplification, ce résultat reste troublant d'autant que le patient en cause présentait une pathologie très agressive. De plus, malgré la fréquence de la persistance du génome d'HHV-6 observée dans les cellules mononuclées du sang périphérique de sujets sains, allant jusqu'à 90 % des cas pour certaines études (22), 93 %, 97 % des échantillons étudiés ici sont trouvés négatifs. Le fait qu'il n'y ait pas plus de sérums positifs pour l'ADN d'HHV-6 semble bien montrer que la positivité est associée à une réplication virale. En effet, les cellules contenant le génome viral à l'état latent ne sont pas assez nombreuses pour positiver les résultats de la PCR sérique.

Cette approche mériterait sans doute une évaluation plus poussée prenant en compte tous ces paramètres. La valeur des résultats trouvés étant fonction du seuil de sensibilité de la technique PCR, une détermination quantitative de ceux-ci permettrait d'obtenir des données exploitables sur l'existence ou non d'une réplication virale active.

### **7-3- DISCUSSION DES RESULTAT DES MOELLES**

Les résultats obtenus sur les moelles présentent des discordances importantes, en particulier entre la technique de Cone et la PCR nichée ; ceci n'avait pas été observé pour les autres types de prélèvements des mêmes patients alors que la technique empruntée à Collandre, encore une fois ne permet pas de détecter de positifs. L'explication la plus probable pourrait être une différence de sensibilité entre les techniques utilisées, la PCR nichée étant alors considérée comme moins

sensible que la simple PCR suivie d'hybridation, bien que certains auteurs aient rapporté un niveau au moins égal de sensibilité et un effet de minimisation de l'impact d'éventuels inhibiteurs (83).

#### **7-4- DISCUSSION SUR LES DISCORDANCES ENTRE LA TECHNIQUE DE CONE MODIFIEE ET LA TECHNIQUE EMPRUNTEE A COLLANDRE**

Outre la possibilité d'une différence notable de sensibilité entre les deux systèmes qu'il reste nécessaire d'évaluer, il était possible de penser, à l'inverse, que la spécificité de la technique de Cone était moins étroite que ce qui avait été décrit. Un certain nombre de positifs pouvaient être dus à des réactions croisées avec le génome d'autres virus, en particulier le CMVH, qui présente le plus d'homologies avec HHV-6. Des essais négatifs d'amplification génique de souches CMVH isolées au laboratoire, testées par les systèmes de Cone et Collandre ainsi que les tentatives infructueuses d'amplification des six échantillons trouvés positifs par un couple d'amorces spécifiques du CMVH semble infirmer cette hypothèse. Cette dernière tentative fournissant comme résultat accessoire, l'absence de détection, du génome de CMVH dans ces six échantillons.

Un article récent (32) faisant état de l'utilisation des amorces et sondes décrites par Collandre et Aubin et coll. (6a, 6b, 20) au sein de nouveaux systèmes de typage des souches par simple PCR peut conduire à une hypothèse probable, bien que "peu satisfaisante". Une des amorces décrite dans cet article (qui fait référence à un article récent de Aubin et coll. (6c)) désignée sous l'appellation 018 s'avère très proche de l'amorce B utilisée dans le présent travail, excepté deux bases ajoutées en 3', et surtout une adenine (A) en moins dans la partie 5'. Après comparaison avec la séquence du clone ZVH14 issu de la souche GS (41), et vérification dans l'article de 1993 de Aubin et coll. (6a) de l'absence de polymorphisme détecté par les auteurs sur les codons correspondants entre les souches GS et SIE, il semble que l'amorce B

décrite préalablement (6a, 6b, 20) soit inappropriée et induise un mésappariement préjudiciable à une hybridation optimale. Le système A/B comportant une erreur de séquence sur une de ses amorces, il est facilement concevable que le rendement d'amplification obtenu soit réduit. Cette mésaventure a l'intérêt de souligner la difficulté de mener une étude par PCR en Virologie lorsque le génome viral est incomplètement décrit, et la nécessité absolue de vérifier sur des séquences validées, toutes les amorces ou sondes décrites dans la littérature.

#### **7-5- QUE PENSER DE LA PRESENCE DU GENOME D'HHV-6 DANS LES LYMPHOME HODGKINIENS ET NON HODGKINIENS ?**

Les techniques PCR employées dans ce travail ont permis la détection d'une présence du génome d'HHV-6 dans des échantillons d'ADN extraits :

- de deux maladies de Hodgkin scléro-nodulaires sous type 3 soit 8,3 % de notre échantillonnage en Hodgkin,
- de trois LMNH toutes pathologies confondues, soit 5,8 % des LMNH étudiés,
- d'une adénite, soit 9,0 % des cas.

Ces résultats, en terme de pourcentage, n'ont pas de signification réelle du fait de la taille trop faible de certains groupes et une analyse statistique serait inappropriée.

Le groupe des témoins en particulier est réduit et l'observation d'un résultat positif surestime certainement la présence génomique dans cet échantillonnage. De plus, chez ce patient positif, une sarcoïdose était suspectée et cette pathologie a été décrite comme pouvant potentiellement être associée à la présence d'HHV-6 (10), par hybridation in situ et étude sérologique. La difficulté réside dans le fait que pour disposer d'un groupe témoin véritablement exploitable, il faudrait pouvoir réaliser

des biopsies chez des individus choisis dans la population générale ce qui est difficilement envisageable.

Les résultats obtenus dans les cas de lymphomes ne permettent pas de préjuger d'un rôle quelconque du virus, dans la génèse de la maladie, mais permettent de constater sa présence et de cerner des sous-groupes de lymphomes où il serait intéressant de procéder à des investigations poussées. Les deux maladies de Hodgkin appartiennent en effet au même sous-groupe et les trois LMNH sont classés parmi des lymphomes de haut grade. L'étude menée en rétrospectif n'a pas permis de disposer de certains prélèvements, comme des lymphocytes périphériques dont l'examen aurait pu apporter des informations utiles pour l'appréciation du risque de positivité des extraits d'ADN de biopsie dû à une infiltration par des cellules de la circulation générale porteuses du virus latent.

La positivité d'un sérum pour HHV-6, potentiellement sous forme libre, et les discordances observées sur les résultats obtenus chez le même patient, pourraient conduire à se poser la question de l'existence éventuelle de souches variantes dans des pathologies très ponctuelles.



## CONCLUSION

Ce travail avait pour but de rechercher une éventuelle présence du génome d'HHV-6 dans des échantillons biopsiques de lymphomes hodgkiniens et non hodgkiniens, au moyen d'une technique PCR. Les résultats publiés dans la littérature et qui s'appuient sur un travail similaire sont variables. Toutefois, il semble s'en dégager la notion d'une implication plus fréquente du virus dans la maladie de Hodgkin que chez les témoins et les résultats de la présente étude n'infirmement pas cette observation. Ces résultats pourraient être considérés comme une étude préliminaire, le génome d'HHV-6 ayant été détecté dans deux cas de Hodgkin scléro-nodulaire du même sous-type, et dans trois lymphomes de forte malignité. Il serait intéressant de pouvoir augmenter l'échantillonnage dans ces pathologies particulières et de réaliser une étude, non plus en rétrospectif, mais en prospectif afin de pouvoir disposer, pour chaque patient, d'un large éventail de prélèvements. La diversité des prélèvements, alliée à l'utilisation conjointe de techniques comme l'hybridation in situ, pourrait alors permettre de mieux déterminer le rôle d'HHV-6 dans ces pathologies



**BIBLIOGRAPHIE**

- 1 - **ABLASHI D.V., BALACHANDRAN N., JOSEPH'S S.F., HUNG C.L., KRUEGER G.R.F., KRAMASKY B., SALAHUDDIN S.Z., GALLO R.C.**  
Genomic polymorphism, growth properties and immunologic variations in human herpesvirus-6 isolates.  
*Virology*, 1991 ; 184 : 545-552.
- 2 - **AGULNICK A.D., THOMPSON J.R., IYENGAR S., PEARSON G., ABLASHI D., RICCIARDI R.**  
Identification of a DNA-binding protein of human herpesvirus-6, a putative DNA polymerase stimulatory factor.  
*Journal of General Virology*, 1993 ; 4 : 1003-1009.
- 3 - **AGUT H., AUBIN J.T.**  
Un nouveau virus : l'herpèsvirus humain-6.  
*La Revue du Praticien*, 1994 ; 44 : 871-874.
- 4 - **AGUT H., GUETARD D., COLLANDRE H., DAUGUET C., MONTAGNIER L., MICLEA J.M., BAURMAN H., GESSAIN A.**  
Concomitant infection by human Herpesvirus-6, HTLV-1 and HIV-2.  
*Lancet*, 1988 ; i : 712.
- 5 - **ANDRIEU J.M., COLONNA P.**  
Maladie de Hodgkin.  
Paris : Estem, Paris, 1991 ; p 1-98.
- 6a- **AUBIN J.T., AGUT H., COLLANDRE H., YAMANASHI K., CHANDRAN B., MONTAGNIER L., HURAUX J.M.,**  
Antigenic and genetic differentiation of the two putative types of human herpesvirus-6.  
*Journal of Virological Methods*, 1993 ; 41 : 223-234.
- 6 b- **AUBIN J.T., COLLANDRE H., CANDOTTI D., INGRAND D., ROUZIOUX C., BURGARD M., RICHARD S., HURAUX J.M., AGUT H.**  
Several groups among human herpesvirus-6 strains can be distinguished by southern blotting and polymerase chain reaction.  
*Journal of Clinical Microbiology*, 1991; 29 : 367-372.

- 6c- **AUBIN J.T., POIREL L., ROBERT C., HURAUX J.M., AGUT H.**  
Identification of human herpesvirus-6 variants A and B by amplimer hybridation and amplification with variant-specific primers.  
*Journal of Clinical Microbiology*, 1994 ; 32 : 2434-2440.
- 7- **BERAL V., TETERMAN T., BERKELMAN R., JAFFE H.**  
AIDS-associated non Hodgkin's lymphoma.  
*Lancet*, 1991 ; 337 : 805-809.
- 8 - **BEROUD C.**  
Le choix des amorces oligonucléotidiques en utilisant les critères thermodynamiques.  
In D.Larzul "La PCR un procédé de répliation in vitro", Ed. Médicales Internationales, Cachan, 1993, p 50-55.
- 9 - **BIBERFELD P., KRAMASKY B., SALAHUDDIN S.Z., GALLO R.C.**  
Ultrastructural characterization of a new human B lymphotropic DNA virus (human herpesvirus-6) isolated from patients with lymphoproliferative disease.  
*Journal National Cancer Institute*, 1987 ; 79 : 933-941.
- 10- **BIBERFELD P., PETREN A.L., EKLUND A., LINDELMALM C., BARKHEM T., EKMAN M., ABLASHI D., SALAHUDDIN Z.**  
Human herpesvirus-6 (HHV-6) in sarcoïdosis and lympho-proliferative disorders.  
*Journal of Virological Methods*, 1988 ; 21 : 49-59.
- 11- **BOOM R., SOL C.J., HEIJTINK R., WERTHEIM VAN DILLEN P.M., VAN DER NOORDA J.**  
Rapid purification of hepatitis B virus DNA from serum.  
*Journal of Clinical Microbiology*, 1991 ; 29 : 1804-1811.
- 12- **BOOM R., SOL C.J., SALIMANS M.M., JANSEN C.I., WERTHEIM-VAN DILLEN P.M., VAN DER NORDAA J.**  
Rapid and simple method for purification of nucleic acids.  
*Journal of Clinical Microbiology*, 1990 ; 28 : 495-503.

- 13- **BOVENZI P., MIRANDOLA P., SECCHIERO P., STRUMIA R., CASSAI E., DI LUCA D.**  
Human herpesvirus-6 (variant A) in Kaposi's sarcoma.  
*Lancet* 1993 ; **341** : 1288-1289.
- 14- **BRYON P.A.**  
Intérêt pratique du diagnostic histopathologique des lymphomes malins.  
*La Revue du Praticien*, 1993 ; **13** : 1617-1623.
- 15- **BUCHBINDER A., JOSEPHS S.F., ABLASHI D., SALAHUDDIN S.Z., KLOTMAN M.E., MANAK M., KRUEGER G.R.F., WONG-STAAAL F., GALLO R.C.**  
Polymerase chain reaction amplification and in situ hybridization for the detection of human B-lymphotropic virus.  
*Journal of Virological Methods*, 1988 ; **21** : 191-197.
- 16- **CARBONE P.P., KAPLAN H.S., MUSHOFF K.**  
Report of the comitee on Hodgkin's disease staging classification.  
*Cancer Research*, 1971 ; **31** : 1860-1861.
- 17- **CHANG Y., CESARMAN E., PESSIN M.S., LEE F., CULPEPPER J., KNOWLES D.M., MOORE P.S.**  
Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma.  
*Science*, 1994 ; **266** : 1865-1869.
- 18- **CHOU S., MAROUSEK G.I.**  
Analysis of interstrain variation in a putative immediate-early region of human herpesvirus-6 DNA and definition of variant-specific sequences.  
*Virology*, 1994 ; **198** : 370-376.
- 19- **CIRONE M., CAMPADELLI-FIUME G., FOA-TOMASI L., TORRISI M.R., FAGGIONI A.**  
Human herpesvirus-6 envelope glycoproteins B and g-L complex are undetectable on the plasma membrane of infected lymphocytes.  
*AIDS Research of Human Retroviruses*, 1994 ; **10** : 175-179.

- 20- **COLLANDRE H., AUBIN J.T., AGUT H., BECHET J.M., MONTAGNIER L.**  
Detection of HHV-6 by the polymerase chain reaction.  
*Journal of Virological Methods*, 1991 ; 31 : 171-180.
- 21- **CONE R.W., HACKMAN R.C., HUANG M.L., BOWDEN R.A., MEYERS J.D., METCALF M., ZEH J., ASHLEY R., COREY L.**  
Human herpesvirus-6 in lung tissue from patients with pneumonitis after bone marrow transplantation.  
*New England Journal of Medicine*, 1993 ; 329 : 156-161.
- 22- **CONE R.W., HUANG M.L., ASHLEY R., COREY L.**  
Human herpesvirus-6 DNA in peripheral blood cells and saliva from immunocompetent individuals.  
*Journal of Clinical Microbiology*, 1993 ; 31 : 1262-1267.
- 23- **CUENDE J.I., RUIZ J., CIVEIRA M.P., PRIETO J.**  
High prevalence of HHV-6 DNA in peripheral blood mononuclear cells of healthy individuals detected by nested-PCR.  
*Journal of Medical Virology*, 1994 ; 43 : 115-118.
- 24- **DEMMLER G.J., BUFFONE G.J., SCHIMBOR C.M., MAY R.A.**  
Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification.  
*The Journal of Infectious Diseases*, 1998 ; 158 : 1177-1184.
- 25- **DEWHURST S., Mc INTYRE K., SCHNABEL K., HALL C.B.**  
Human herpesvirus-6 (HHV-6) variant B accounts for the majority of symptomatic primary HHV-6 infections in a population of US infants.  
*Journal of Clinical Microbiology*, 1993 ; 31 : 416-418.
- 26- **DI LUCA D., DOLCETTI R., MIRANDOLA P., DE RE V., SECCHIERO P., CARBONE A., BOIOCCHI M., CASSAI E.**  
Human herpesvirus-6 : a survey of presence and variant distribution in normal peripheral lymphocytes and lymphoproliferative disorders.  
*The Journal of Infectious Diseases*, 1994 ; 170 : 211-215.

- 27- **DI LUCA D., MIRANDOLA P., SECCHIERO P.**  
Characterization of human herpesvirus-6 strains isolated from patients with exanthem subitum with or without cutaneous rash.  
*The Journal of Infectious Diseases*, 1992 ; 166 : 689.
- 28- **DOWNING R.G., SEWANKAMBO N., SERWADA D., HONESS R., CRAWFORD D., JARRETT R., GRIFFIN B.E.**  
Isolation of human lymphotropic herpesvirus from Uganda.  
*Lancet*, 1987 ; ii : 390.
- 29- **DUNNE W.M., DEMMLER G.J.**  
Serological evidence for congenital transmission of human herpesvirus-6.  
*Lancet*, 1992 ; 84 : 675-677.
- 30- **ELLINGER K., NEIPEL F., FOA-TOMASI L., CAMPADELLI-FIUME G., FLECKENSTEIN B.**  
The glycoprotein B homologue of human herpesvirus-6.  
*Journal of General Virology*, 1994 ; 74 : 495-500.
- 31- **ESPY M.J., PATEL R., PAYA C.V., SMITH T.F.**  
Comparison of three methods for extraction of viral nucleic acids from blood cultures.  
*Journal of Clinical Microbiology*, 1995 ; 33 : 41-44.
- 32- **FILLET A.M., RAPHAEL M., VISSÉ B., AUDOIN J., POIREL L., AGUT H. and the French study group for HIV-Associated tumors.**  
Controlled study of human herpesvirus-6 detection in acquired immunodeficiency syndrome associated non Hodgkin's lymphoma.  
*Journal of Medical Virology*, 1995 ; 45 : 106-112.
- 33- **GOMPELS U.A., MACAULAY H.A.**  
Characterization of human telomeric repeat sequences from human herpesvirus-6 and relationship to replication.  
*Journal of General Virology*, 1995 ; 76 : 451-458.

- 34- **GOPAL M.R., THOMSON B.J., FOX J., TEDDER R.S., HONESS R.W.**  
Detection by PCR of HHV-6 and EBV DNA in blood and oropharynx  
of healthy adults and HIV-seropositives.  
*Lancet*, 1990 ; 335 : 1598-1599.
- 35- **HARNETT G.B., FARR T.J., PIETROBONI G.R., BUCENS M.R.**  
Frequent shedding of human herpesvirus-6 in saliva.  
*Journal of Medical Virology*, 1990 ; 30 : 128-130.
- 36- **HARRINGTON L.A., GREIDER C.W.**  
Telomerase primer specificity and chromosome healing.  
*Nature*, 1991 ; 353 : 451-454.
- 37- **INNIS M.A. , GELFAND D.H., SNISKY J.J.**  
PCR protocols. A guide to methods and applications. 1990.  
San Diego, Academic Press.
- 38a- **INOUE N., DAMBAUGH T.R., RAPP J.C., PELLETT P.E.**  
Alphaherpesvirus origin-binding protein homolog encoded  
by human herpesvirus-6B, a betaherpesvirus, binds to  
nucleotide sequences that are similar to ori regions of  
alphaherpesviruses.  
*Journal of Virology*, 1994 ; 68 : 4126-4136.
- 38b- **INOUE N., DAMBAUGH T.R., PELLETT P.**  
Molecular biology of human herpesviruses-6A and 6B.  
*Infectious Agents and Disease*, 1994 ; 2 : 343-360.
- 39- **IYENGAR S., LEVINE P.H., ABLASHI O., NEEQUAYE J.  
PEARSON G.R.**  
Seroepidemiological investigations on human herpesvirus-6  
(HHV-6) infections using a newly developed early antigen assay.  
*International Journal of Cancer*, 1991 ; 49 : 551-557.
- 40- **JOSEPHS S.F., ABLASHI D.V., SALAHUDDIN S.Z.,  
JAGODZINSKI L.L., WONG-STAAAL F., GALLO R.C.**  
Identification of the human herpesvirus-6 glycoprotein and putative  
large tegument protein genes.  
*Journal of Virology*, 1991 ; 65 : 5597-5604.

- 41- JOSEPHS S.F., SALAHUDDIN S.Z., ABLASHI D.V., SCHACHTER F., WONG-STAAL F., GALLO R.C.  
Genomic analysis of the human B lymphotropic virus (HBLV).  
*Science*, 1986 ; 234 : 601-603.
- 42- KISHI M., HARADA H., TAKAHASHI M., TANAKA A., HAYASHI M., NONOYAMA M., JOSEPHS S.F., BUCHBINDER A., SCHACHTER F., ABLASHI D.V., WONG-STAAL F., SALAHUDDIN S.Z., GALLO R.C.  
A repeat sequence, GGG TTA, is shared by DNA of human herpesvirus-6 and Marek's disease virus.  
*Journal of Virology*, 1988 ; 62 : 4824-4827.
- 43- KRUEGER G.R., ABLASHI D.V., SALAHUDDIN S.Z., JOSEPHS S.F.  
Diagnosis and differential diagnosis of progressive lympho-proliferative and malignant lymphoma in persistent active herpesvirus infection.  
*Journal of Virological Methods*, 1988 ; 21 : 255-264.
- 44- LAWRENCE G.L., CHEE M., CRAXTON M.A., GOMPERS U.A., HONESS R.W., BARRELL B.G.  
Human herpesvirus-6 is closely related to human cytomegalovirus.  
*Journal of Virology*, 1990 ; 64 : 287-299.
- 45- LEACH C.T., NEWTON E.R., Mc PARLIN S., JENSON H.B.  
Human herpesvirus-6 infection of the female genital tract.  
*The Journal of Infectious Diseases*, 1994 ; 169 : 1281-1283.
- 46- LENNERT K., FELLER A.C.  
Histopathologie des lymphomes malins non hodgkiniens selon la classification de Kiel actualisée.  
Paris : Doin Ed., 2ème édition, 1990 : 307 p.
- 47- LINDQUESTER G.J., PELLET P.E.  
Properties of the human herpesvirus-6 strain Z29 genomes : G+C content, length, and presence of variable length directly repeated terminal sequence elements.  
*Virology*, 1991 ; 182 : 102-110.

- 48- **LITTLER E., LAWRENCE G., LIU M.Y., BARRELL B.G., ARRAND J.R.**  
Identification, cloning, and expression of the major capsid protein gene of human herpesvirus-6.  
*Journal of Virology*, 1990 ; 64 : 714-722.
- 49- **LIU D.X., GOMPELS U.A., NICHOLAS J., LELLIOTT C.**  
Identification and expression of the human herpesvirus-6 glycoprotein H and interaction with our accessory 40 K glycoprotein.  
*Journal of General Virology*, 1993 ; 74 : 1847-1857.
- 50- **LUKES R.J., CRAVER L.F., HALL T.C.**  
Report of the nomenclature comitee.  
*Cancer Research*, 1966 ; 26 : 1311-1313.
- 51- **LUPPI M., BAROZZI P., MARASCA R., TORELLI G.**  
Intégration of human herpesvirus-6 (HHV-6) genome in chromosome 17 in two lymphoma patients.  
*Leukemia*, 1994 ; 8 : S41-S45.
- 52- **LUSSO P., SALAHUDDIN S.Z., ABLASHI D.V., GALLO R.C., VERONESE F.D., MARKHAM P.D.**  
Divers tropism of HBLV (human herpesvirus-6).  
*Lancet*, 1987 ; II : 743-744.
- 53- **MARTIN M.E., THOMSON B.J., HONESS R.W., CRAXTON M.A., GOMPELS U.A., LIU M.Y., LITTLER E., ARRAND J.R., TEO I. JONES M.D.**  
The genome of human herpesvirus-6 : maps of unit-length and concatameric genomes for nine restriction endonucleases.  
*Journal of General Virology*, 1991 ; 72 : 157-168.
- 54- **MULLIS K.B., FALOONA F.A.**  
Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction.  
*Methods in Enzymology*, 1987 ; 155 : 335-350.



- 55- **NEIPEL F., ELLINGER K., FLECKENSTEIN B.**  
The unique region of the human herpesvirus-6 genome is essentially collinear with the Ul segment of human cytomegalovirus.  
*Journal of General Virology*, 1991 ; 72 : 2293-2297.
- 56- **NICHOLAS J., MARTIN M.E.**  
Nucleotide sequence analysis of a 38,5-kilobase-pair region of the genome of human herpesvirus-6 encoding human cytomegalovirus immediate-early gene homologs and transactivating functions.  
*Journal of Virology*, 1994 ; 68 : 597-610.
- 57- **OKUNO T., TAKAHASHI K., BALACHANDRA K., SHIRAKI K., YAMANISHI K., TAKAHASHI M., BABA K.**  
Seroepidemiology of human herpesvirus-6 infection in normal children and adults.  
*Journal of Clinical Microbiology*, 1989 ; 27 : 651-653.
- 58- **PERBAL B.**  
Clonage moléculaire.  
Vigot Ed., Paris, 1991.
- 59- **QIAN G., WOOD C., CHANDRAN B.**  
Identification and characterization of glycoprotein gH of human herpesvirus-6.  
*Virology*, 1993 ; 194 : 380-386.
- 60- **RAHUEL C., DANDIEU S., CHAUSSE A.M., MORNET E. ROUGER P., CARTRON J.P., SALMON C., LUCOTTE G.**  
Construction d'une DNAtèque humaine.  
*Revue Française de Transfusion et d'Immunologie-Hématologie*, 1983 ; 26 : 539-552.
- 61- **RANGER-ROGEZ S.**  
Herpèsvirus humain de type 6 et syndrome de Gougerot-Sjögren primitif. : recherche d'un lien étiologique.  
Thèse de l'Université de Poitiers, 1993, N° 643.

- 62- RANGER-ROGEZ S., NICOT T., DENIS F.  
Les nouveaux herpesvirus humains HHV-6 et HHV-7.  
L'Eurobiologiste, 1995 ; 29 : 47-51.
- 63- RANGER S., PATILLAUD S., DENIS F., HIMMICH A., SANGARE A.,  
M'BOUP S., ITOUA-N'GAPORO A., PRINCE-DAVID M.,  
CHOUT R., CEVALLOS R., AGUT H.  
Seroepidemiology of human herpesvirus-6 in pregnant women  
from different parts of the world.  
Journal of Medical Virology, 1991 ; 34 : 194-198.
- 64- RANGER S., VIDAL E., DENIS F.  
Herpesvirus humain-6 : HHV-6.  
L'Eurobiogiste, 1992, 27 : 135-150.
- 65- RANGER-ROGEZ S., VIDAL E., WEINBRECK P., SANGARE A.,  
M'BOUP S., DENIS F.  
No direct relationship between HIV-1/2 infection and HHV-6  
antibody response in large-scale European and African trial.  
Clinical Diagnostic in Virology, 1995 ; 3 : 123-129.
- 66- RAZZAQUE A.  
Oncogenic potential of human herpesvirus-6 DNA.  
Oncogene, 1990 ; 5 : 1365-1370.
- 67- RAZZAQUE A., PURI R.K.  
Human herpesvirus-6 : tumorigenicity and tumor infiltrating  
lymphocytes.  
Cancer Letters, 1992 ; 61 : 111-118.
- 68- ROBERT C., AGUT H., AUBIN J.T., COLLANDRE H.,  
INGRAND D., DEVILLE-CHABROLLE A., LE HOANG P.,  
HURAUX J.M.  
Detection of antibodies to human herpesvirus-6 using  
immunofluorescence assay.  
Research in Virology, 1990 ; 141 : 545-555.

- 69- **ROFFMAN E., ALBERT J.P., GOFF J.P., FRENKEL N.**  
Putative site for the acquisition of human herpesvirus-6 virion tegument.  
*Journal of Virology*, 1990 ; 64 : 6308-6313.
- 70- **SALAHUDDIN S.Z., ABLASHI D.V., MARKHAM P.D., JOSEPHS S.F., STURZENEGGER S., KAPLAN M., HALLIGAN G., BIBERFELD P., WONG-STAAAL F., KRAMARSKI B., GALLO R.C.**  
Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders.  
*Science*, 1986 ; 234 : 596-601.
- 71- **SANDHOFF T., KLEIM J.P., SCHNEWEIS K.E.**  
Latent human herpesvirus-6 DNA is sparsely distributed in peripheral blood lymphocytes of healthy adults and patients with lymphocytic disorders.  
*Medical Microbiology and Immunology*, 1991 ; 180 : 127-134.
- 72- **SATO S., YAMAMOTO T., ISEGAWA Y., YAMANISHI K.**  
Identification of human herpesvirus-6 uracil-DNA glycosylase gene.  
*Journal of General Virology*, 1994 ; 75 : 2349-2354.
- 73- **SAXINGER C., POLESKY H., EBY N., GRUFFERMAN S., MURPHY R., TEGTMEIR G., PAREKH V., MEMON S., HUNG C.**  
Antibody reactivity with HBLV (HHV-6) in U.S. populations.  
*Journal of Virological Methods*, 1988 : 21 : 199-208.
- 74- **SCHIEWE U., NEIPEL F., SCHREINER D., FLECKENSTEIN B.**  
Structure and transcription of an immediate-early region in the human herpesvirus-6 genome.  
*Journal of Virology*, 1994 ; 68 : 2978-2985.
- 75- **SECCHIERO P., CARRIGAN D.R., ASANO Y., BENEDETTI L., CROWLEY R.W., KOMAROFF L., GALLO R.C., LUSSO P.**  
Detection of human herpesvirus-6 in plasma of children with primary infection and immunosuppressed patients by polymerase chain reaction.  
*The Journal of Infectious Diseases*, 1995 ; 171 : 273-280.

- 76- The non-Hodgkin's lymphoma classification project.  
National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas. Summary and description of a working formulation for clinical usage.  
*Cancer*, 1982 ; 49 : 2112-2135.
- 77- THOMSON B.J., DEWHURST S., GRAY D.  
Structure and heterogeneity of the sequences of a human herpesvirus strain variants U1102 and Z29 and identification of human telomeric repeat sequences at the genomic termini.  
*Journal of Virology*, 1994 ; 68 : 3007-3014.
- 78- THOMSON B.J., EFSTATHIOU S., HONESS R.W.  
Acquisition of the human adeno-associated virus type 2 rep gene by human herpesvirus type 6.  
*Nature*, 1991 ; 351 : 78-80.
- 79- THOMSON B.J., MARTIN M.E.D., NICHOLAS J.  
The molecular and cellular biology of human herpesvirus-6  
*Revue of Medical Virology*, 1991 ; 1 : 89-99.
- 80- THOMSON B.J., WEINDLER F.W., GRAY D. SCHWAAB V., HEILBRONN R.  
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 replicatin and regulate gene expression.  
*Virology*, 1994 ; 204 : 304-311.
- 81- TORELLI G., MARASCA R., LUPPI M., SELLERI L., FERRARI S., NARNI F., MARIANO M.T., FEDERICO M., CECCHERINI-NELLI L., BENDINELLI M., MONTAGNANI G., MONTORSI M., ARTUSI T.  
Human herpesvirus-6 in human lymphomas : identification of specific sequences in Hodgkin's lymphomas by polymerase chain reaction.  
*Blood*, 1991 ; 10 : 2251-2258.

- 82- **WANG H., CHEN M., BERNEMAN Z.N., DELGADO G., DIPAULO J.A.**  
Detection of human herpesvirus-6 in paraffin-embedded tissue of cervical cancer by polymerase chain reaction.  
*Journal of Virological Methods*, 1994 ; 47 : 297-305.
- 83- **XU L.Z.**  
La "nested PCR" (nPCR).  
In D. Larzul "La PCR un procédé de réplication in vitro", Ed. Médicales Internationales, Cachan, 1993, p 39-43.
- 84- **YAMAMOTO M., BLACK J.B., STEWART J.A., LOPEZ C., PELLET P.E.**  
Identification of a nucleocapsid protein as a specific serological marker of human herpesvirus-6 infection.  
*Journal of Clinical Microbiology*, 1990 ; 28 : 1957-1962.
- 85- **YAMAMOTO T., MUKAI T., KONDO K., YAMANISHI K.**  
Variation of DNA sequence in immediate-early gene of human herpesvirus-6.  
*Journal of clinical Microbiology*, 1994 ; 32 : 473-476.
- 86- **YAMANISHI K., OKUNO T., SHIRAKI K., TAKAHASHI M., KONDO T., ASANO Y., KURATA T.**  
Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum.  
*Lancet*, 1988 ; i : 1065-1067.
- 87- **YOSHIKAWA T., SUGA S., ASANO Y., YAZAKI T., KODOMA H., OZAKI T.**  
Distribution of antibodies to a causative agent of exanthem subitum (human herpesvirus-6) in healthy individuals.  
*Pediatrics*, 1989 ; 84 : 675-677.

## TABLE DES MATIERES

<b>LISTE DU CORPS ENSEIGNANT DE LA FACULTE</b>	<b>1</b>
<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>9</b>
<b>RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>10</b>
<b>1 - <u>RAPPELS SUR L'HERPESVIRUS DE TYPE 6 (HHV-6)</u></b>	<b>10</b>
1-1- Famille des herpèsvirus, classification	11
1-2- Morphologie et structure d'HHV-6	13
1-2-1- Morphologie	13
1-2-2- Génome	13
1-2-3- Protéines traduites	16
1-3- Epidémiologie	18
1-3-1- Répartition et prévalence	18
1-3-2- Modes de contamination	19
1-3-3- Cycle répliatif	19
1-4- Pouvoir pathogène	21
1-5- Diagnostic biologique	23
1-5-1- Méthodes	23
1-5-2- Intérêt	25
<b>2 - <u>RAPPELS SUR LES LYMPHOMES</u></b>	<b>27</b>
2-1- Généralités	27

2-2- Lymphomes de Hodgkin, classification	27
2-3- Les lymphomes non hodgkiniens, classification	28
3 - <u>HHV-6 ET LYMPHOMES</u>	35
3-1- Arguments en faveur d'un rôle viral dans cette pathologie	35
3-2- Stratégies utilisables pour rechercher une relation virus lymphomes	36
3-3- Résultats récents publiés sur HHV-6 et lymphomes	37
<b>MATERIEL ET METHODES</b>	39
4 - <u>MATERIEL</u>	39
4-1- Les patients	39
4-1-1- Choix des patients	39
4-1-2- Classifications utilisées	39
4-1-3- Répartition	40
4-1-4- Types de prélèvements	41
4-2- Les prélèvements : stockage, conservation	41
4-2-1- Fragments tissulaires, biopsies	41
4-2-2- Moëlle	44
4-2-3- Sérums	44
4-3- Les témoins	44
4-3-1- Les témoins positifs	44
4-3-2- Les témoins négatifs	45
5 - <u>METHODES</u>	46

5-1- Extraction de l'ADN à partir des tissus	46
5-1-1- Préparation des échantillons tissulaires	46
5-1-2- Lyse cellulaire et extraction organique	47
5-1-3- Extraction organique	48
5-1-4- Concentration des acides nucléiques par précipitation à l'éthanol	48
5-1-5- Lyse cellulaire sans extraction	49
5-2- Extraction d'ADN dans les échantillons sériques	49
5-3- Dosage des ADN extraits	50
5-4- Réactions de polymérisation en chaîne	51
5-4-1- Généralités	51
5-4-2- Amorces utilisées	52
5-4-3- Conditions réactionnelles	55
5-4-4- Cas particulier de la PCR nichée	58
5-5- Electrophorèse des produits amplifiés	59
5-6- Transfert sur membrane de nylon	60
5-7- Hybridations	60
5-7-1- Les sondes utilisées	60
5-7-2- Marquage des sondes à la digoxigénine	61
5-7-3- Réactions de préhybridation et d'hybridation	62
5-7-4- Lavages	64
5-7-5- Révélation par chimiluminescence	64
5-8- Typage des souches par analyse de restriction	66
6 - <u>RESULTATS</u>	67
6-1- Concernant les échantillons tissulaires	67
6-1-1- Comparaison extraction/lyse, amplification du locus dQA1 du système HLA	67
6-1-2- Résultats : technique de Collandre	69



6-1-3- Résultats : technique de Cone modifiée	69
6-1-4- Résultats obtenus par PCR nichée	73
6-1-5- Typages	75
6-1-6- Problème des inhibiteurs	75
6-2- Résultats concernant les sérums	77
6-2-1- Résultats : technique empruntée à H. Collandre	77
6-2-2- Résultats : technique de Cone modifiée	77
6-3- Résultats concernant les moëlles	77
6-4- Résultats : système MIE4/MIE5	78
<b>7 - <u>DISCUSSION</u></b>	<b>80</b>
7-1- Détection du génome d'HHV-6 dans les biopsies tissulaires par amplification génique	80
7-1-1- Généralités	80
7-1-2- Echantillonnage	81
7-1-3- Traitement des prélèvements	81
7-1-4- Qualité des ADN extraits	82
7-1-5- Choix des systèmes d'amplification	83
7-1-6- Discussion des résultats de PCR	84
7-1-7- Typage des souches virales	88
7-2- Discussion des résultats des sérums	89
7-3- Discussion des résultats des moëlles	90
7-4- Discussion sur les discordances entre la technique de Cone modifiée et la technique empruntée à Collandre	91
7-5- Que penser de la présence du génome d'HHV-6 dans les lymphomes hodgkiniens et non hodginiens ?	92
<b>CONCLUSION</b>	<b>94</b>

BIBLIOGRAPHIE	95
TABLE DES MATIERES	108
LISTE DES TABLEAUX	112
LISTE DES FIGURES	113
ANNEXES	114

**LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1 : Principaux caractères de classification des herpèsvirus humains.

Tableau 2 : Classification des LMNH de type B.

Tableau 3 : Classification des LMNH de type T.

Tableau 4 : Répartition des patients.

Tableau 5 : Composition des différents milieux d'amplification.

Tableau 6 : Cycles de températures utilisés.

Tableau 7 : Récapitulation des résultats.

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Schéma du génome d'HHV-6.
- Figure 2 : Prévalence et titre moyen géométrique des anticorps anti-HHV-6 en fonction de l'âge chez les sujets sains (d'après Hoshikawa).
- Figure 3 : Cycle productif des herpèsvirus.
- Figure 4 : Classification histologique des lymphomes hodgkiniens.
- Figure 5 : Classification clinique des lymphomes hodgkiniens.
- Figure 6 : Répartition des sérums.
- Figure 7 : Séquence des amorces utilisées.
- Figure 8 : Réactions d'amplification après dilution des inhibiteurs.
- Figure 9 : Electrophorèses sur gel d'agarose et visualisation en lumière UV des échantillons discordants.
- Figure 10 : Hybridation des échantillons discordants.
- Figure 11 : Electrophorèse sur gel d'agarose et visualisation en lumière UV des réactions de PCR nichée.
- Figure 12 : Electrophorèse sur gel d'agarose et visualisation en lumière UV des produits de la PCR nichée soumis à restriction enzymatique par Hind III.
- Figure 13 : Codons variants dans le gène de la grosse protéine de tégument.
- Figure 14 : Localisation des amorces A, B, C, A2, C2 et de la sonde S

COMPOSITION DES TAMPONS  
ET REACTIFS

**Tampon phosphate PBS 1x (BioMérieux Réf. : 7 551 1)**

NaCl	7,650 g	1 flacon à diluer dans 1 l d'H <sub>2</sub> O
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,724 g	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,210 g	
pH 7,2		

**Tampon d'homogénéisation**

D(+)-Saccharose	0,25 M	(Prolabo Réf. : 27 478.296)
Tris-HCl	25,0 mM	(Serva Réf. : 37 192)
MgCl <sub>2</sub>	25,0 mM	(Sigma Réf. : M-8266)
pH 7,5		
H <sub>2</sub> O qsp 1 l (stériliser par filtration)		

**Tampon de lyse**

EDTA tétrasodique	10,0 mM	(Sigma Réf. : ED4SS)
Tris-HCl	10,0 mM	
NaCl	10,0 mM	(Serva Réf. :30183)
SDS	0,5 %	(Serva Réf. : 20760)
pH 8,0		
H <sub>2</sub> O qsp 1 l (stériliser par filtration)		

**Solution de protéinase K**

Protéinase K	100 mg	(Gibco BRL Réf. :25530-015)
Tris base	50 mM	(Serva Réf. :37190)
Acétate de calcium	2,5 mM	(Sigma Réf. : C-1000)
H <sub>2</sub> O qsp 10 ml		

**Tampon borate TBE 1x**

Tris base	89,0 mM	
Acide borique	89,0 mM	(Serva 1Réf. : 5165)
EDTA disodique	2,5 mM	(Sigma Réf. : E 5134)
H <sub>2</sub> O qsp 1 l		

**Tampon acétate TAE 1x**

Tris base	40,0 mM	
Acide acétique	1,14 ml	(Prolabo Réf. : 20 103.295)
EDTA	1,0 mM	
H <sub>2</sub> O qsp 1 l		

**Solution de dépôt des ADN**

Bleu de bromophénol	0,25 % (P/V)
Sucrose	40,0 % (P/V)
H <sub>2</sub> O qsp 1 ml	

**Solution de dénaturation**

NaOH	0,5 M	(Prolabo Réf. : 28246.361)
NaCl	1,5 M	
H <sub>2</sub> O	qsp 1 l	

**Solution neutralisante**

Tris HCl	1,0 M
NaCl	1,2 M
pH 7,4	
H <sub>2</sub> O	qsp 1 l

**Tampon SSC 20x**

NaCl	3,0 M
Citrate de sodium trisodique	0,3 M (Sigma Réf. : S-4641)
pH 7,0	
H <sub>2</sub> O	qsp 1 l

**Solution de Denhardt's 100x**

Ficoll <sup>R</sup> 400	2 % (P/V)	(Pharmacia Réf. : 17.0400.01)
Polyvinyl pyrrolidone	2 % (P/V)	(Sigma Réf. : P-5288)
Sérum albumine bovine	2 % (P/V)	
H <sub>2</sub> O	qsp 100 ml	

**Tampon de lavage**

Acide maléique	0,1 M (Sigma Réf. : M-0375)
NaCl	0,15 M
pH 7,5	
Tween <sup>R</sup> 20	0,3 % (V/V)(Merck-Schluchardt Réf. : 822-184)
H <sub>2</sub> O	qsp 1 l

**Solution "bloquante"**

Acide maléique	0,1 M
NaCl	0,15 M
Agent bloquant	1 % (Boehringer Réf. : 1363 514)
pH 7,5	

**Tampon basique**

Tris-HCl	0,1 M
NaCl	0,1 M
MgCl <sub>2</sub>	50,0 mM
pH 9,5	

**Suspension calibrée de particules de silice**

SiO <sub>2</sub>	60 g (Sigma Réf. : S-5631)
H <sub>2</sub> O	qsp 500 ml

- mélanger et laisser sédimenter 24 heures à température ambiante dans une éprouvette graduée de 500 ml

- éliminer 430 ml par aspiration,
- compléter à 500 ml avec H<sub>2</sub>O, mélanger et laisser sédimenter 5 heures à température ambiante,
- enlever 440 ml par aspiration,
- ajouter 600 µl d'HCl à 37 %
- vérifier le pH (qui doit être voisin de 2),
- stériliser la suspension par passage à l'autoclave à 121 °C pendant 20 minutes.

La suspension se conserve 6 mois à l'obscurité et à température ambiante.

**Solution de lyse L1 (sérums)**

Thiocyanate de guanidium CH <sub>5</sub> N <sub>3</sub> CHNS	120 g (Fluka Réf. : 50990)
Tris HCl 0,1 M, pH 6,4	100 ml
EDTA 0,2 M, pH 8,0	22 ml
Triton x 100 (dissoudre par chauffage à 60°C)	2,6 ml (Sigma Réf. : T 8787)

**Solution de lavage L2**

Thiocyanate de guanidium (CH <sub>5</sub> N <sub>3</sub> CHNS), pH 6,4 (dissoudre par chauffage à 60°C)	120 g 100 ml
---	-----------------

## RESUME :

L'herpesvirus humain de type 6 (HV-6) est un herpesvirus humain ubiquitaire qui persiste sous une forme latente dans les cellules mononuclées du sang périphérique après la primo-infection.

Ces propriétés combinées avec sa capacité à transformer des cellules in vitro ont laissé envisager une possible implication de ce virus dans les lymphomes humains.

Ce travail a étudié les ganglions lymphoïdes de 86 patients : 24 cas de maladie de Hodgkin (H), 52 cas de lymphomes non hodgkiniens (LMNH) et 11 cas de lymphadénites incluant un cas de sarcoïdose. Le génome d'HHV-6 a été amplifié en utilisant deux jeux d'amorces oligonucléotidiques (respectivement dans le gène de la grosse protéine de tégument et dans le gène homologue au gène UL87 du CMVH).

Le génome d'HHV-6 a été trouvé dans 2 H (8,3 %), 3 LMNH (5,8 %) et un cas de sarcoïdose. Les deux cas de Hodgkin positifs pour HHV-6 appartiennent au groupe de type 2 scléronodulaire et les trois LMNH sont des lymphomes de haut grade (2 LMNH à cellules B et 1 T).

Des études plus poussées devront montrer si le HHV-6 est sous forme latente ou non dans les lymphomes et la signification de sa présence dans ces pathologies.

### MOTS CLES:

génome

Herpesvirus type-6

Lymphomes hodgkiniens

Lymphomes non hodgkiniens

Réaction de polymérisation en chaîne

