



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY I

2010

FACULTE DE PHARMACIE

THESE

Mémoire DES de Biologie médicale

Soutenu devant le Jury Interrégional

Le 04 octobre 2010

**pour le DIPLOME D'ETAT
de DOCTEUR en PHARMACIE**

par Matthieu GUERY

né le 17 Novembre 1981 à Nantes (44)

Incidence, facteurs de risque et diagnostic de
l'infection à herpèsvirus humain 6 après allogreffe de
cellules souches hématopoïétiques à l'ère de la
biologie moléculaire

Membres du Jury

Président : Monsieur le Professeur C. GANTZER

Juges : Monsieur le Professeur P. BORDIGONI
Madame le Docteur V. VENARD
Mademoiselle le Docteur H. JEULIN
Mademoiselle le Docteur N. AGRINIER

UNIVERSITÉ Henri Poincaré, NANCY 1
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2009-2010

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Francine KEDZIEREWICZ

Président du Conseil de la Pédagogie

Bertrand RIHN

Commission de la Recherche

Christophe GANTZER

Mobilité ERASMUS et Communication

Francine KEDZIEREWICZ

Hygiène Sécurité

Laurent DIEZ

Responsable de la filière Officine :

Francine PAULUS

Responsables de la filière Industrie :

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable du Collège d'Enseignement :

Jean-Michel SIMON

Pharmaceutique Hospitalier

DOYEN HONORAIRE

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Marie-Madeleine GALTEAU

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMANN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

François MORTIER

Maurice PIERFITTE

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

MAITRES DE CONFERENCES

HONORAIRES

Monique ALBERT

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Andrée IMBS

Marie-Hélène LIVERTOUX

Jean-Louis MONAL

Dominique NOTTER

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ASSISTANT HONORAIRE

Marie-Catherine BERTHE

Annie PAVIS

Section 1.01 ENSEIGNANTS

PROFESSEURS

Gilles AULAGNER	Pharmacie clinique
Alain BAGREL	Biochimie
Jean-Claude BLOCK	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	Pharmacologie cardiovasculaire
Chantal FINANCE	Virologie, Immunologie
Pascale FRIANT-MICHEL.....	Mathématiques, Physique, Audioprothèse
Christophe GANTZER	Microbiologie environnementale
Max HENRY	Botanique, Mycologie
Jean-Yves JOUZEAU	Bioanalyse du médicament
Pierre LABRUDE	Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Isabelle LARTAUD	Pharmacologie cardiovasculaire
Dominique LAURAIN-MATTAR.....	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	Biochimie
Pierre LEROY	Chimie physique générale
Philippe MAINCENT	Pharmacie galénique
Alain MARSURA	Chimie thérapeutique
Patrick MENU	Physiologie
Jean-Louis MERLIN	Biologie cellulaire oncologique
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	Biochimie, Biologie moléculaire
Jean-Michel SIMON	Economie de la santé, législation pharmaceutique

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	Parasitologie
Mariette BEAUD	Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT	Communication et santé
Isabelle BERTRAND	Microbiologie environnementale
Michel BOISBRUN	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER	Chimie Physique
Cédric BOURA	Physiologie
Igor CLAROT	Chimie analytique
Joël COULON.....	Biochimie
Sébastien DADE	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	Chimie analytique
Béatrice DEMORE.....	Pharmacie clinique
Joël DUCOURNEAU	Biophysique, audioprothèse, acoustique
Florence DUMARCAY.....	Chimie thérapeutique
François DUPUIS.....	Pharmacologie
Raphaël DUVAL	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE	Hématologie - Génie Biologique
Adel FAIZ	Biophysique-acoustique

Luc FERRARI	Toxicologie
Stéphane GIBAUD	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	Chimie organique
Frédéric JORAND	Santé et environnement
Olivier JOUBERT	Toxicologie, sécurité sanitaire
Francine KEDZIEREWICZ	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT	Informatique, Biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI.....	Hématologie biologique
Christophe MERLIN	Microbiologie environnementale et moléculaire
Blandine MOREAU	Pharmacognosie
Maxime MOURER	Pharmacochimie supramoléculaire
Francine PAULUS	Informatique
Christine PERDICAKIS	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO	Pharmacologie
Virginie PICHON	Biophysique
Anne SAPIN.....	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	Mycologie, Botanique
Nathalie THILLY	Santé publique
Gabriel TROCKLE	Pharmacologie
Marie-Noëlle VAULTIER	Biodiversité végétale et fongique
Mohamed ZAIOU	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER

Sémiologie

PROFESSEUR AGREGE

Christophe COCHAUD

Anglais

Bibliothèque Universitaire Santé - Lionnois (Pharmacie - Odontologie)

Anne-Pascale PARRET

Directeur

A MONSIEUR LE PROFESSEUR C. GANTZER

Professeur à la faculté de Pharmacie de Nancy

You me faites l'honneur d'accepter la présidence
de ce jury.

Veuillez trouver ici l'expression de ma
gratitude et de mon profond respect.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR P. BORDIGONI

Professeur à la faculté de Médecine de Nancy

You avez accepté de participer à ce travail et d'en juger le contenu.

Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

A MADEMOISELLE LE DOCTEUR N. AGRINIER

Assistante hospitalo-universitaire au CHU de Nancy

Je vous suis reconnaissant de l'intérêt et du soutien que vous avez porté sur ce travail. Vous me faites l'honneur de participer à ce jury.

Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.

A MADEMOISELLE LE DOCTEUR H. JEULIN

Assistante hospitalo-universitaire au CHU de Nancy

J'ai repris une partie du travail que tu avais amorcé.
Tu m'as soutenu par tes connaissances, ton intellect et
ta disponibilité.

Sois assurée de ma sincère reconnaissance.

A MADAME LE DOCTEUR V. VENARD

Maître de conférences à la faculté de Pharmacie de
Nancy

You m'avez accueilli au laboratoire de virologie et
vous avez accepter d'encadrer et de diriger ce
travail.

Trouvez ici l'expression de ma gratitude
et de ma reconnaissance.

A l'ensemble du personnel du laboratoire de virologie

Pour votre accueil et votre soutien technique

A l'ensemble du personnel des laboratoires

Pour votre accueil chaleureux

Pour avoir participer à ma formation

A mes amis

A ma famille

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDERES COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D' exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



SOMMAIRE

SOMMAIRE	15
Liste des abréviations	17
Liste des Figures	18
Liste des tableaux	20
INTRODUCTION	22
GENERALITES	24
I. Description du sixième herpèsvirus humain	24
I.1. Découverte et classification	24
I.2. Fréquence et transmission	25
I.2.1. Incidence et prévalence	25
I.2.2. Transmission.....	26
I.3. Morphologie et structure	27
I.3.1. Le virion.....	27
I.3.2. Le génome	29
I.4. Cycle de réplication virale	31
I.4.1. Adsorption et entrée du virus.....	31
I.4.2. Transcription et réplication de l'ADN	33
I.4.3. Assemblage des virus et excrétion cellulaire	34
I.5. Physiopathologie	37
I.5.1. Tropisme cellulaire.....	37
I.5.2. Effets sur la cellule hôte	37
I.5.3. Latence	38
II. Manifestations cliniques et traitement des infections à HHV-6.....	39
II.1. Manifestations cliniques	39
II.1.1. Au cours de la primo-infection.....	39
II.1.2. Au cours de la réactivation.....	41
II.2. Traitement	43
III. Intégration	46
IV. Diagnostic des infections à HHV-6.....	48
IV.1.1. Diagnostic direct	48
IV.1.2. Diagnostic indirect.....	52

TRAVAIL PERSONNELErreur ! Signet non défini.
I. Problématique53
II. Matériels et méthodes53
II.1. Etude de cohorte54
II.1.1. Population ciblée54
II.1.2. Prophylaxies et traitements.....54
II.1.3. Suivi infectieux.....56
II.1.4. Suivi clinique57
II.1.5. Analyses statistiques58
II.2. Diagnostic et suivi virologique des patients HHV-659
II.2.1. Echantillons.....59
II.2.2. PCR HHV-660
II.2.3. PCR albumine.....64
II.2.4. analyses67
III. Résultats68
III.1. Etude de cohorte68
III.1.1. Description de la cohorte68
III.1.2. Incidence et délai de la réactivation HHV-672
III.1.3. Facteurs associés à la survenue d'une réactivation HHV-672
III.1.4. Co-infections.....75
III.1.5. Manifestations cliniques associées à l'HHV-677
III.1.6. HHV-6 et mortalité80
III.1.7. Efficacité du traitement84
III.1.8. Conclusion.....85
III.2. Diagnostic et suivi virologique des patients HHV-686
III.2.1. Patients ayant présentés une réactivation86
III.2.2. Patients ayant présenté une intégration94
III.2.3. Conclusion.....99
DISCUSSION106
CONCLUSION.....114
BIBLIOGRAPHIE115
ANNEXES127

Liste des abréviations

<u>HHV-6</u>	Herpès Virus Humain 6
<u>CMV</u>	CytoMégalovirus
<u>EBV</u>	Epstein Barr Virus
<u>HSV</u>	Herpès Simplex Virus
<u>VZV</u>	Varicelle Zona Virus
<u>ADN</u>	Acide DésoxyriboNucléique
<u>°C</u>	Degrés Celsius
<u>ADN</u>	Acide DésoxyriboNucléique
<u>LAL</u>	Leucémie Aigue Lymphoblastique
<u>LAM</u>	Leucémie Aigue Myeloblastique
<u>LLC</u>	Leucémie Lymphoïde Chronique
<u>LMC</u>	Leucémie Myéloïde Chronique
<u>LMMC</u>	Leucémie MyéloMonocytaire Chronique
<u>SMD</u>	Syndrome MyéloDisplasique
<u>SMP</u>	Syndrome MyéloProlifératif
<u>CSH</u>	Cellules Souches Hématopoïétiques
<u>CSP</u>	Cellules Souches Périphériques
<u>ICT</u>	Irradiation Corporelle Totale
<u>MTX</u>	Méthotrexate
<u>CsA</u>	Ciclosporine
<u>PCR</u>	Polymérase Chaîne Réaction
<u>FISH</u>	Fluorescente <i>In Situ</i> Hybridation
<u>CHU</u>	Centre Hospitalo-Universitaire
<u>SNC</u>	Système Nerveux Central

Liste des Figures

Figure 1 : Arbre phylogénique des <i>Herpesviridae</i> d'après [Moore et al., 1996]	25
Figure 2 : Photo en microscopie électronique d'une particule d'herpèsvirus	28
Figure 3 : Représentation schématique d'une particule virale d'HHV-6	28
Figure 4 : Organisation génomique de l'HHV-6 [Dominguez et al., 1999]	29
Figure 5: Interactions complexes glycoprotéines virales de l'HHV-6 et récepteurs cellulaires [Mori et al., 2009].....	32
Figure 6: Processus de fusion cellulaire de l'HHV-6 selon [Mori et al., 2009].....	33
Figure 7: Cycle répliquatif de l'HHV-6 [De Bolle et al., 2005b].....	36
Figure 8: Exanthème subit du nourrisson.....	40
Figure 9. Isolement de l'HHV-6 en culture cellulaire [Salahuddin et al., 1986, Taniguchi et al., 2000]	49
Figure 10. HHV-6 en microscopie électronique (Laboratoire de Virologie, Groupe hospitalier de la Pitié-Salpêtrière)	50
Figure 11: Incidence cumulative de l'HHV-6 sur 150 jours post-greffe	72
Figure 12: Incidence de la réactivation HHV-6 en fonction du greffon et du stade de GVHA	75
Figure 13: Survie cumulée en Kaplan Meier en fonction du statut HHV-6	80
Figure 14: Incidence de la réactivation en fonction de la technique PCR.....	87
Figure 15: Délai de la réactivation	88
Figure 16: Réactivation HHV-6 avec encéphalite	92
Figure 17: Réactivation HV-6 asymptomatique.....	93

Figure 18: Profil intégration patient 1.....	95
Figure 19: Profil intégration patient 2.....	96
Figure 20: Profil intégration patient 3.....	98
Figure 21: Charges virales patient ayant présenté une encéphalite à HHV-6 en post-greffe	101
Figure 22: Profil théorique d'une réactivation de l'HHV-6 en post-greffe chez le patient greffé de CSH	103
Figure 23: Profil théorique d'une intégration de l'HHV-6 en post-greffe chez le patient greffé de CSH à partir d'un donneur intégré	103
Figure 24: Profil théorique d'une intégration de l'HHV-6 en pré-greffe chez un patient greffé de CSH	104
Figure 25: Algorithme de prise en charge biologique des infections à HHV-6 en post-allogreffe de CSH.....	105

Liste des tableaux

Tableau 1: Les voies de transmission de l'HHV-6.....	27
Tableau 2: Exemples de fonctions des ORF du segment U de l'HHV-6 [Gompels and Macaulay et al., 1995].....	31
Tableau 3: Efficacité des antiviraux anti-HHV-6 [de Pagter et al., 2008a]	44
Tableau 4: Techniques PCR quantitative HHV-6 en temps réel	51
Tableau 5: Amorces PCR qualitative 1999-2003	61
Tableau 6: Mix PCR qualitative 1999-2003	61
Tableau 7: Amorces et sonde PCR quantitative HHV-6 Gène <i>U65-66</i> [Gautheret-Dejean et al., 2002]	62
Tableau 8: Composition du mix pour la PCR HHV-6 [Gautheret-Dejean et al., 2002]	63
Tableau 9: Amorces et sonde <i>ALB gene</i> pour PCR albumine (Gautheret-Dejean et al., 2002)	65
Tableau 10: Composition du mix de PCR albumine (Laurendeau et al., 1999)	65
Tableau 11: Dilution gamme d'étalonnage PCR albumine.....	66
Tableau 12: Conditionnements et effectifs.....	70
Tableau 13: Caractéristiques des patients de la cohorte	71
Tableau 14: Facteurs associés à la réactivation HHV-6	73
Tableau 15: Co-infections HHV-6 et autres agents infectieux	76
Tableau 16. Manifestations cliniques associées à la réactivation de l'HHV-6	78
Tableau 17: Influence de l'infection à HHV-6 sur la reconstitution hématologique et sur la sévérité de la GVHA.....	79

Tableau 18: Facteurs associés au décès	81
Tableau 19: Causes du décès	83
Tableau 20: Prévalence des traitements antiviraux au sein de la population HHV-6+	84
Tableau 21: Effet du traitement anti-HHV-6 sur la mortalité.....	85
Tableau 22: Intensité de la charge virale au moment de la première détection et au pic .	89
Tableau 23: Pourcentage de patients HHV-6+ ayant une charge virale >2500 copies/mL ..	90
Tableau 26: Association intensité de le charge virale HHV-6 / signes cliniques.....	90

INTRODUCTION

Comme tous les herpèsvirus, l'herpèsvirus humain 6 (HHV-6) reste à l'état latent tout au long de la vie au sein de son hôte infecté. Dans cet état le virus reste inactif et ne se multiplie pas. Cette latence virale peut être entrecoupée d'épisodes de réactivation où le virus devient actif, réplique et au cours desquels des particules virales infectieuses sont alors produites. Si cette réactivation est généralement asymptomatique chez le sujet immunocompétent, elle peut être potentiellement grave, voire fatale chez le sujet immunodéprimé, et particulièrement chez les receveurs de greffes.

La greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est indiquée dans les affections du tissu hématopoïétique ou dans certain cas de tumeurs solides. Elle constitue un terrain favorable aux réactivations virales, de part l'immunodépression qui l'entoure. L'incidence des réactivations de l'HHV-6 dans ce contexte est importante. Bien que le diagnostic de réactivation à HHV-6 soit porté, la responsabilité clinique de l'HHV-6 reste encore rarement évoquée d'emblée comme peut l'être celle du cytomégalovirus (CMV) par exemple, pourtant le risque est réel. En effet le pouvoir pathogène de l'HHV-6 chez le sujet greffé de CSH, longtemps sujet à controverse, est aujourd'hui reconnu dans les retards de sortie d'aplasie et les insuffisances médullaires [Carrigan and Knox et al., 1994, Drobyski et al., 1993], les encéphalites [Drobyski et al., 1994], les réactions du greffon contre l'hôte (GVHD) et les rashes fébriles [Asano et al., 1991, Wilborn et al., 1994, Yoshikawa et al., 1991]. Des études reconnaissent même la réactivation HHV-6 comme un facteur de mortalité dans les greffes de CSH [de Pagter et al., 2008b, Zerr et al., 2005]. Il apparaît donc nécessaire de posséder les moyens de diagnostiquer et de suivre les infections à HHV-6 au sein de ces populations immunodéprimées, afin d'en prévenir les complications par un traitement approprié. Ces moyens de diagnostic et de suivi sont actuellement essentiellement basés sur la biologie moléculaire.

L'objectif de ce travail est d'établir à partir d'arguments clinico-biologiques un algorithme de prise en charge de l'infection à HHV-6 chez les patients allogreffés de CSH. Et pour cela, après de brèves généralités sur le virus de l'HHV-6, nous procéderons à un travail en deux temps. Tout d'abord dans un premier temps, nous apprécierons au sein d'une cohorte de patients allogreffés de CSH, la fréquence des réactivations à HHV-6, les facteurs de risques, les manifestations cliniques et les co-infections associés à ces

réactivations, ainsi que l'efficacité des traitements antiviraux utilisés. Puis dans un deuxième temps, nous étudierons les profils virologiques de patients ciblés au sein de cette cohorte, pour définir des profils virologiques théoriques correspondant aux différentes situations cliniques.

GENERALITES

I. Description du sixième herpèsvirus humain

I.1. Découverte et classification

L'herpèsvirus humain 6 (HHV-6) a été isolé pour la première fois en 1986, à partir de cellules mononucléées du sang périphérique (peripheral blood mono cells, PBMCs) de 6 patients atteints de syndromes lymphoprolifératifs, dont deux porteurs du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) [Salahuddin et al., 1986]. Observé par microscopie électronique, ce nouvel herpèsvirus fut d'abord baptisé « HBLV » (Human B lymphotropic virus) [Josephs et al., 1986] en raison de son tropisme *in vitro* pour des cellules B fraîchement isolées. D'autres travaux postérieurs démontrent un lymphotropisme T [Lusso et al., 1988, Lusso et al., 1987], ce qui valut le changement d'appellation pour HHV-6 [Ablashi et al., 1987].

L'HHV-6 forme avec l'HHV-7 le genre Roseolovirus de la sous famille des *Betaherpesvirinae* [Black and Pellett et al., 1999, Caserta et al., 2001] auquel appartient également le cytomégavirus humain.

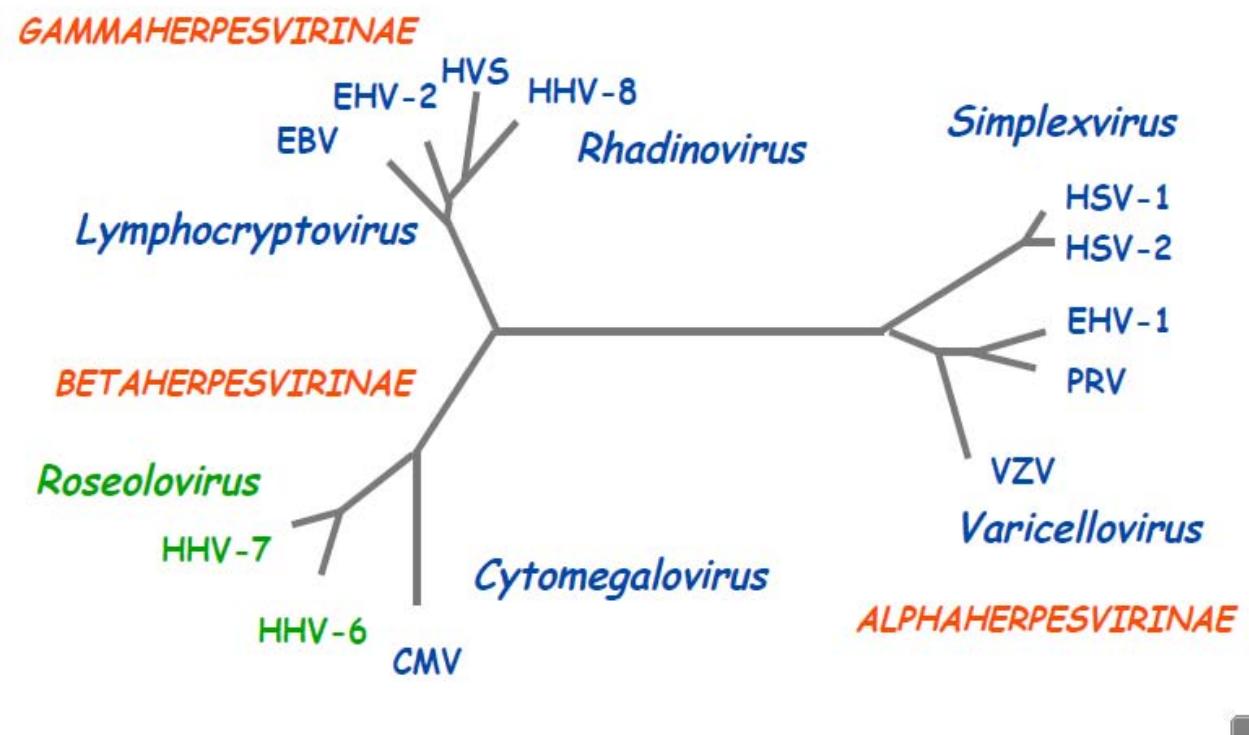


Figure 1 : Arbre phylogénétique des *Herpesviridae* d'après [Moore et al., 1996]

Il existe deux types d'HHV-6, A et B. Ils se différencient sur des critères de croissance virale, d'épidémiologie, de séquences génomiques et de propriétés antigéniques [Ablashi et al., 1991].

I.2. Fréquence et transmission

L'épidémiologie de l'HHV-6 est marquée par son caractère ubiquitaire, non saisonnier et sa séroprévalence élevée chez l'enfant dès le plus jeune âge.

I.2.1. Incidence et prévalence

La répartition géographique mondiale de l'HHV-6 est variable. Les séroprévalences de l'un et/ou l'autre des deux variants atteignent 70 à 100% selon les populations concernées [Bhattarakosol et al., 2001, Ranger et al., 1991, Wu et al., 1997]. Dans les pays développés, plus de 95% de la population est estimée séropositive. Le contact avec le virus se fait

généralement entre l'âge de 6 et 15 mois [Enders et al., 1990, Okuno et al., 1991]. La séroprévalence augmente avec l'âge [Bhattarakosol et al., 2001].

I.2.2. Transmission

La principale voie de transmission est sans aucun doute la salive, l'ADN de l'HHV-6 étant très souvent retrouvé dans la salive et les glandes salivaires, site de latence de l'HHV-6B [Collot et al., 2002, Di Luca et al., 1995, Fox et al., 1990, Zhao et al., 1997]. La transmission est donc principalement horizontale par voie oro-pharyngée et touche de ce fait surtout les personnes vivant en promiscuité : enfants, parents-enfants [Mukai et al., 1994, van Loon et al., 1995]. La transmission se fait majoritairement dans les deux premières années de la vie par voie salivaire pour l'HHV-6B [Levy et al., 1990], pour l'HHV-6A, virus plutôt neurotrophe, l'âge et le mode de contamination restent encore indéterminés (Tableau 1).

D'autres modes de transmission ont été évoqués, tels que les dons de sang ou les transplantations chez les patients séronégatifs [Hudnall et al., 2008, Yoshikawa et al., 1998], la transmission sexuelle et la transmission intra-utérine, suite à la détection d'ADN HHV-6 dans le tractus génital de 20% de femmes enceintes [Maeda et al., 1997, Okuno et al., 1995] et dans des échantillons de sang de cordon de nouveau-nés ainsi que dans des fœtus issus de fausses couches [Adams et al., 1998, Aubin et al., 1992]. La dissémination oro-fécale commune chez les enfants reste trop peu documentée malgré la détection de l'ADN de l'HHV-6 dans des selles [Suga et al., 1998].

Plus récemment, un dernier mode de transmission a été mis en évidence, lorsque dans de rares cas le génome de l'HHV-6 est transmit par voie héréditaire après que celui-ci se soit intégré au sein du génome cellulaire des cellules germinatives d'un ou des parents [Daibata et al., 1999, Hall et al., 2008, Tanaka-Taya et al., 2004]; l'intégration chromosomique du génome de l'HHV-6 sera décrite ultérieurement.

Tableau 1: Les voies de transmission de l'HHV-6

Voies	Fréquence	Références
Oropharyngée salive et sécrétions respiratoires	+++	[Fox et al., 1990] [Di Luca et al., 1995] [Collot et al., 2002]
Don de sang, tissus, organes	+	[Hudnall et al., 2008, Yoshikawa et al., 1998]
Sexuelle, intra-utérine	+	[Aubin et al., 1992]
Orofécale	±	[Suga et al., 1998]
Virus intégré	+	[Daibata et al., 1999, Tanaka-Taya et al., 2004, Hall et al., 2008]

I.3. Morphologie et structure

I.3.1. Le virion

La structure de l'HHV-6 est analogue à celle des autres herpèsvirus (Figure 2), elle est composée de quatre éléments structuraux : un noyau, une nucléocapside, un tégument, une enveloppe. Les virions matures possèdent un diamètre de 160 à 200 nm de diamètre et la nucléocapside mesure 90 à 110 nm [Biberfeld et al., 1987, Yoshida et al., 1989]. La capsid, à symétrie icosaédrique et contenant 162 capsomères, renferme le génome viral sous forme d'un ADN bicaténaire linéaire à l'intérieur d'un corps dense aux électrons. Le tégument, matrice protéique dont l'épaisseur varie entre 20 et 40 nm, occupe l'espace entre la nucléocapside et l'enveloppe. Celle-ci est constituée d'une bicouche lipidique dérivant des membranes de la cellule hôte sur laquelle sont ancrées des glycoprotéines virales.

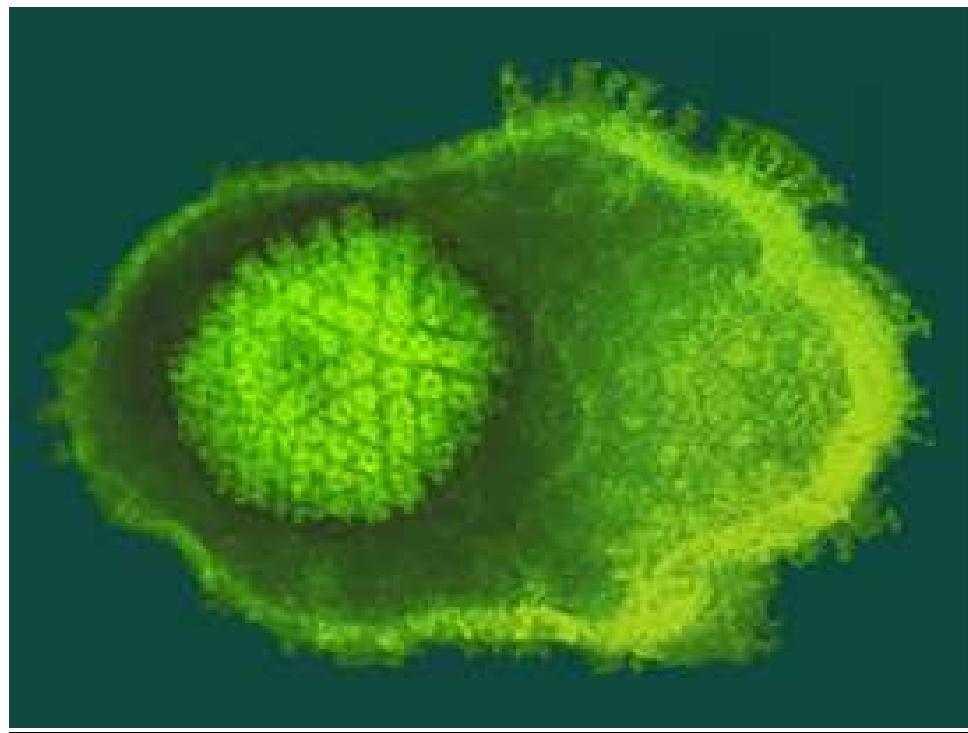


Figure 2 : Photo en microscopie électronique d'une particule d'herpèsvirus

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

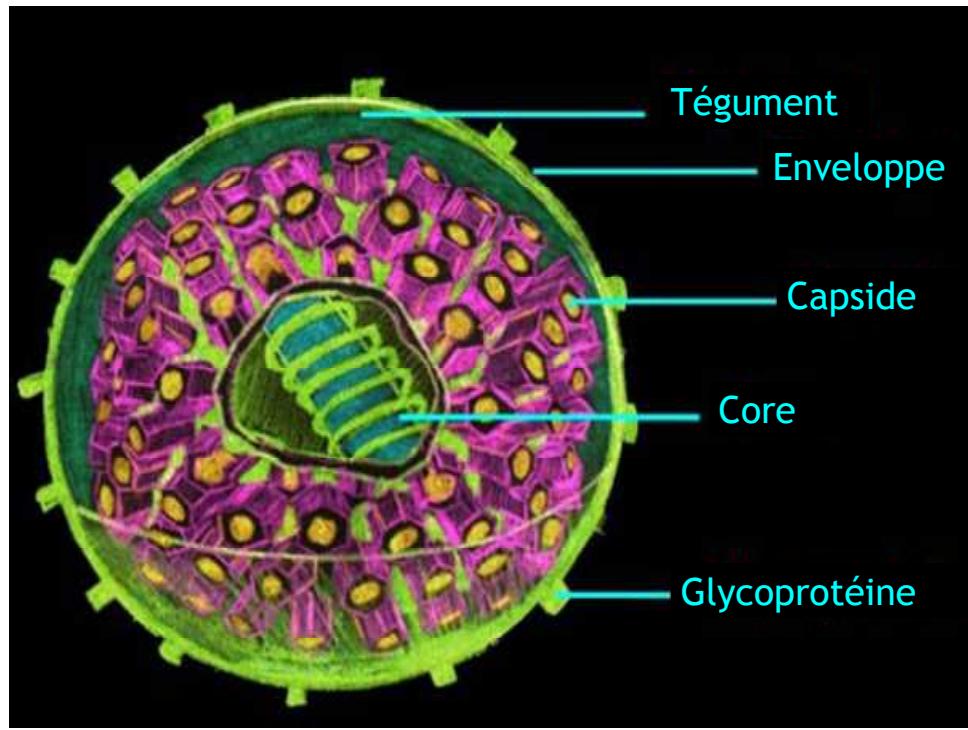


Figure 3 : Représentation schématique d'une particule virale d'HHV-6

I.3.2. Le génome

Le génome de l'HHV-6 est constitué d'une molécule d'ADN bicaténaire linéaire d'environ 160 kb pour le type B et 140 kb pour le type A. Les souches U1102 de l'HHV-6A et Z29 et HST de l'HHV-6B ont entièrement été séquencées [Dominguez et al., 1999, Gompels et al., 1995, Isegawa et al., 1999]. L'architecture génomique de l'HHV-6 (Figure 1) est particulière parmi les herpèsvirus car elle inclut une région unique U de 143-144 kb bordée par des répétitions terminales DR (Direct Repeats) de 8-9 kb.

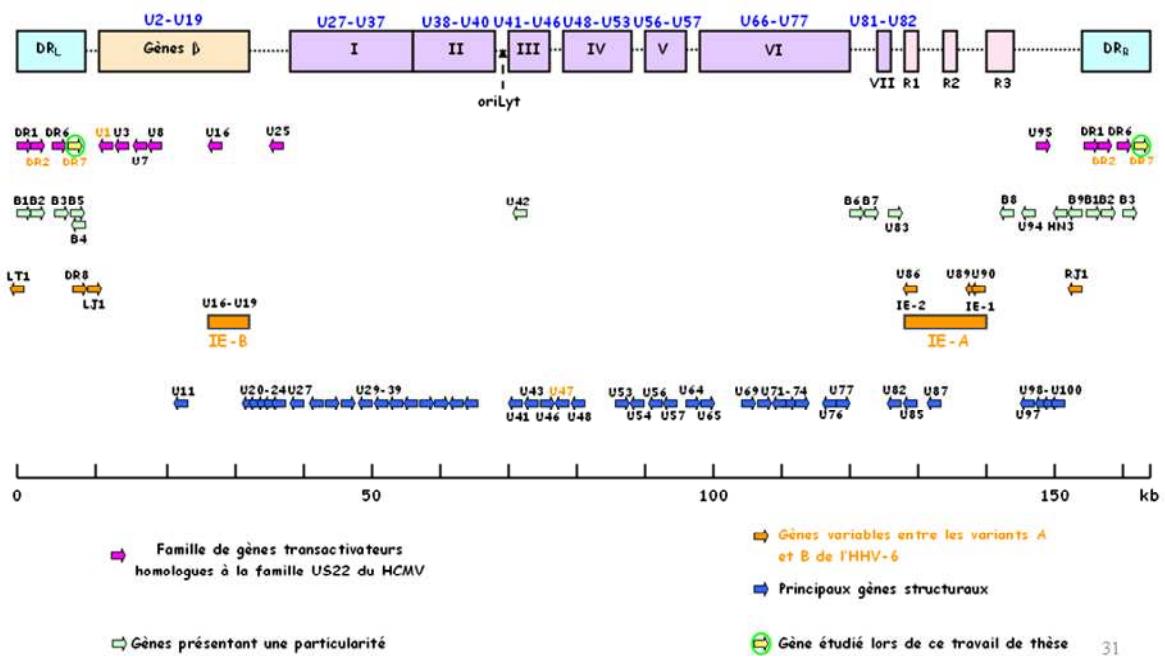


Figure 4 : Organisation génomique de l'HHV-6 [Dominguez et al., 1999]

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

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

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

Les cadres ouverts de lecture (*open reading frame*, ORF) de la région unique sont appelés U1-U100; leurs fonctions sont présentées dans le Tableau 2. Ce segment U contient sept blocs de gènes caractéristiques des *Herpesviridae* codant pour les composants du virion et pour les enzymes nécessaires à la réPLICATION de l'ADN [Campadelli et al., 1999]. Il contient également un bloc commun aux *Betaherpesvirinae* (U2 à U19) et des gènes spécifiques des *Roséolovirus* HHV-6 et 7 (U20-U24, U26, U85 et U100). Au sein des régions terminales les DR contiennent des motifs de clivage et d'empaquetage nommés *pac-1* et *pac-2* ainsi qu'une répétition d'hexanucléotides (GGGTTA)_n [Thomson et al., 1994]. Les régions *pac-1* et *pac-2* sont impliquées dans la réPLICATION et dans la latence du virus [Gompels and Macaulay et al., 1995, Torelli et al., 1995]. Les répétitions d'hexanucléotides, identiques aux hexamères télomériques des vertébrés, pourraient quant à elles être impliquées dans l'intégration du virus au génome cellulaire [Daibata et al., 1999]. D'autres ensembles de réitérations internes existent, ils se situent à l'extrémité droite du segment U et sont dénommés R1, R2 et R3 [Clark et al., 2000].

Séquences et divergences génétiques des génomes de l'HHV-6A et B ont été étudiés par plusieurs équipes [Dominguez et al., 1999, Gompels et al., 1995, Isegawa et al., 1999]. L'homologie globale entre les deux variants est de 90 %; 88 des 97 gènes sont communs, neuf sont spécifiques de chaque variant. Les similarités génétiques se situent dans la partie médiane de la séquence U (U2-U85), les différences se situent surtout dans les gènes U86 à U100.

Tableau 2: Exemples de fonctions des ORF du segment U de l'HHV-6 [Gompels and Macaulay et al., 1995]

Gène	Fonctions
U3	Transactivateur, famille des gènes US22 du CMV
U11	pp100, protéine structurale majeure antigénémique
U12	Récepteur de chimiokines
U16/17	Transactivateur, famille des gènes US22 du CMV
U27	pp41, facteur de processivité de l'ADN pol
U38	Sous unité catalytique de l'ADN polymérase
U39	Glycoprotéine gB
U41	Protéine majeure de liaison à l'ADN
U43-74-77	Complex hélicase/primase
U48	Glycoprotéine gH
U51	Récepteur de chimiokines
U65	Protéine du tégument
U69	Kinase du ganciclovir, phosphotransférase
U73	Protéine de liaison à l'origine
U79/80	Protéine intervenant dans la réPLICATION de l'ADN
U81	Uracil-ADN glycosylase
U82	Glycoprotéine gL
U83	Chimiokine virale
U86/87	Transactivateur, protéine IE2, locus IE-A
U89	Transactivateur, protéine IE1, locus IE-A
U100	Glycoprotéine gQ, complex gp82-105

I.4. Cycle de réPLICATION virale

I.4.1. Adsorption et entrée du virus

- Fixation de la particule virale

La fixation de la particule virale sur la membrane cellulaire se fait sur un récepteur bien identifié : le CD46 [Santoro et al., 1999], récepteur des cellules nucléées impliqué par

ailleurs dans la régulation du complément. Ce récepteur est présent à la surface d'un grand nombre de cellules, or l'HHV-6 ne se fixe pas sur toutes ces cellules, il existe donc probablement d'autres (co)récepteurs non identifiés à ce jour. Le complexe de glycoprotéines gH/gL/gQ1/gQ2 codé respectivement par les gènes U48, 82 et 100 chez l'HHV-6A, sert de ligand viral pour la fixation au CD46 cellulaire [Mori et al., 2003b], ce qui n'est pas le cas pour l'HHV-6B HST [Mori et al., 2004] (Figure 5). D'autres études ont montré que d'autres souches d'HHV-6B PL-1 et Z29 se fixaient sur le CD46 par leur complexe gH/gL/gQ1/gQ2 [Pedersen et al., 2006, Santoro et al., 1999]. Le mécanisme de fixation de l'HHV-6B reste encore interrogatif. Un autre complexe gH/gL/gO codé par le gène U47 est évoqué dans le processus de fixation cellulaire, ce complexe se fixerait sur un autre récepteur que le CD46 [Mori et al., 2003a, Pedersen et al., 2006]. La fixation de l'HHV-6 apparaît donc complexe et varie aussi bien selon les variants A et B, que selon les souches au sein d'un même variant [Pedersen et al., 2006].

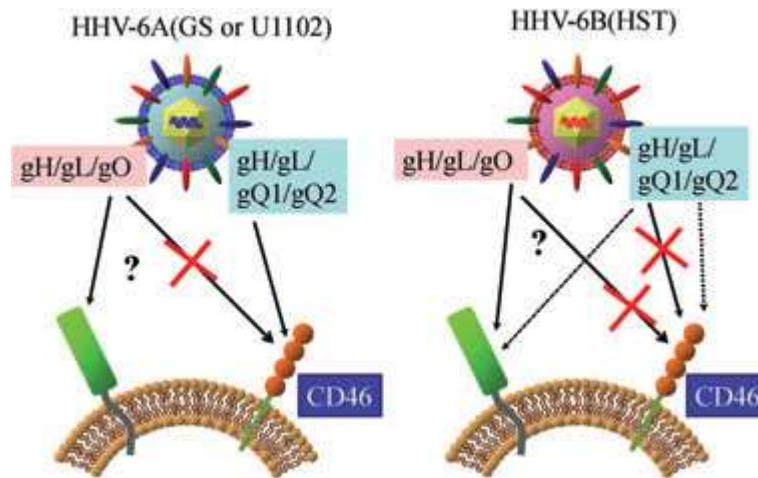


Figure 5: Interactions complexes glycoprotéines virales de l'HHV-6 et récepteurs cellulaires
[Mori et al., 2009]

- Fusion de l'enveloppe virale

La fusion de l'enveloppe virale à la membrane cellulaire est un processus complexe encore mal défini. Il ferait intervenir à l'instar des autres herpèsvirus les complexes gH, gL décrits auparavant et surtout gB codé par le gène U39. Une étude montre que la présence d'anticorps anti-gH et anti-gB inhiberait la fusion cellulaire de l'HHV-6 [Foa-Tomasi et al., 1991, Mori et al., 2002]. Les gH et gL interviendraient avec le gQ dans l'interaction avec le

CD46 comme décrit auparavant, le gB, par fixation sur un récepteur inconnu, entraînerait la fusion cellulaire [Takeda et al., 1996] (Figure 6).

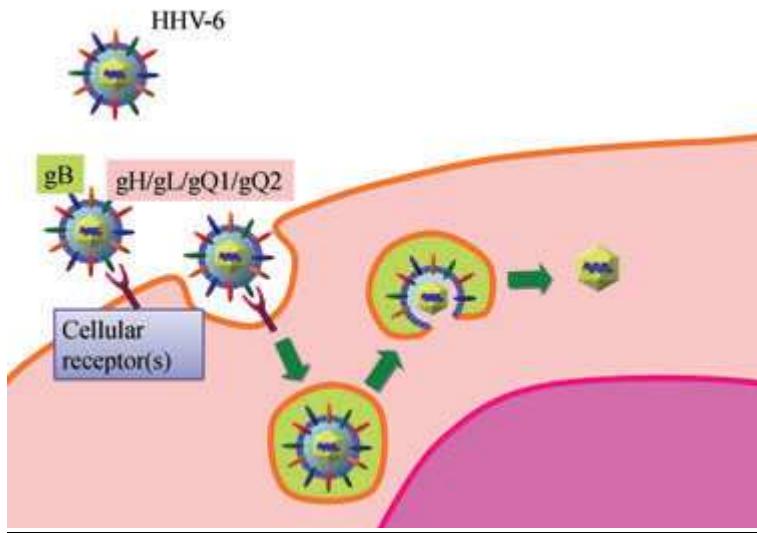


Figure 6: Processus de fusion cellulaire de l'HHV-6 selon [Mori et al., 2009]

1.4.2. Transcription et réPLICATION de l'ADN

- Décapsidation

Après fusion de l'enveloppe virale, la nucléocapside est transportée vers le pore nucléaire via le réseau microtubulaire du cytoplasme. Une fois le pore nucléaire atteint, seul le génome viral est libéré dans le nucléoplasme (figure 7).

- Transcription et réPLICATION de l'ADN viral

A l'instar des autres herpèsvirus, le virus utilise les outils de transcription et de traduction cellulaires pour produire trois classes de protéines virales [Braun et al., 1997b] :

- les protéines IE (Immediate Early), très précoces, synthétisées en quelques heures après l'infection; elles jouent un rôle dans la régulation de l'expression d'autres gènes. Il a été récemment rapporté que deux protéines IE1 et IE2 distinguaient les deux variants HHV-6A et HHV-6B (L.Flamand, abstract 3-2, 6th International Conference on HHV6 & 7, 2008).

- les protéines E (Early), précoces, sont détectées 3 à 8h après l'infection, elles jouent un rôle dans le métabolisme et la réPLICATION de l'ADN ainsi que dans la régulation des gènes tardifs.

- les protéines L (Late), tardives, détectables à partir de 8h après l'infection; elles jouent un rôle dans l'assemblage des particules virales matures

La réPLICATION de l'ADN proprement dite fait, elle, intervenir sept facteurs codés par des gènes viraux. Ainsi la protéine de liaison, codée par le gène U73, se lie à l'origine de réPLICATION lytique (ori-lyt) et dénature une portion du génome viral qui s'est préalablement circularisé par juxtaposition des DRs à son entrée dans le noyau. Cette liaison est maintenue par un complexe hélicase/primase impliquant les produits des gènes U43, U74 et U77. Cette étape fournit des amorces ARN pour la synthèse d'un ADN simple brin. Ce brin d'ADN est stabilisé par la protéine majeure de liaison à l'ADN (codée par le gène U41) dans la fourche de réPLICATION. La synthèse du brin complémentaire est catalysée par l'ADN polymérase (impliquant le gène U38) et dirigée par un facteur de processivité (impliquant le gène U27). Alors que la formation des brins néoformés se poursuit, la structure circulaire de réPLICATION est coupée pour former un cercle roulant intermédiaire.

1.4.3. Assemblage des virus et excrétion cellulaire

- Encapsidation

Les longs brins d'ADN concatémériques sont clivés puis encapsidés grâce à l'intervention de protéines de clivage et d'empaquetage activées par les signaux spécifiques d'empaquetage *pac* présents aux extrémités du génome viral.

- Bourgeonnement

Les nucléocapsides nouvellement formées bourgeonnent à partir de la membrane nucléaire et sortent du noyau avec une membrane intermédiaire dépourvue de glycoprotéines. Une fois dans le cytoplasme, elles acquièrent leur tégument au sein du tégusome puis leur enveloppe et leurs glycoprotéines au niveau du complexe golgien. Les virions formés sont pris en charge par des vésicules de transport vers la surface cellulaire et sont libérés par exocytose ou lyse cellulaire.

La durée totale depuis l'infection jusqu'à la libération de nouveaux virions est approximativement de 72h.

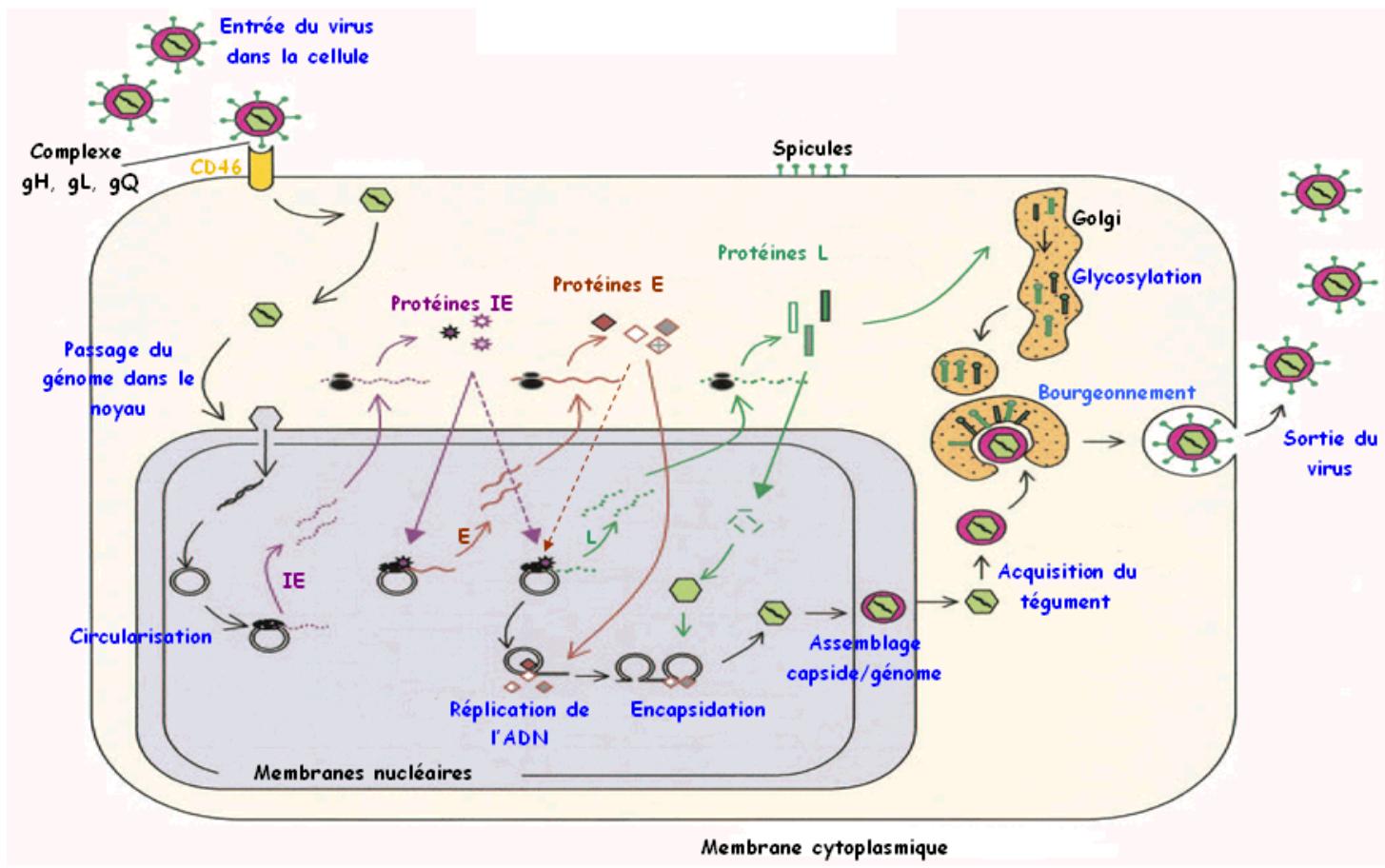


Figure 7: Cycle réplicatif de l'HHV-6 [De Bolle et al., 2005b]

I.5. Physiopathologie

I.5.1. Tropisme cellulaire

Comme nous l'avons évoqué auparavant, l'HHV-6 utilise principalement le récepteur CD46 pour se fixer à la surface cellulaire de ses cellules cibles. Ce récepteur est présent à la surface de toutes les cellules nucléées, et l'HHV-6 ne se fixe pas sur toutes ces cellules, mais ceci peut peut-être déjà expliquer son tropisme étendu.

In vivo, l'HHV-6 a un tropisme préférentiel pour les cellules mononucléées. Ainsi l'HHV-6 peut infecter les lymphocytes CD4+ et CD8+, les cellules NK, les monocytes et macrophages, les cellules dendritiques, les fibroblastes, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales des vaisseaux et les précurseurs de la moelle osseuse [Asada et al., 1999, Luppi et al., 1999, Robert et al., 1996, Simmons et al., 1992]. L'HHV-6A semble avoir un tropisme plus étendu, notamment un neurotropisme marqué [Hall et al., 1998] et il est le seul à infecter les lymphocytes CD8+, les cellules NK et les fibroblastes embryonnaires [Grivel et al., 2003]. Les lymphocytes CD4+ sont la cible optimale pour une réPLICATION complète pour les deux variants [Lusso and Gallo et al., 1995, Lusso et al., 1995, Lusso et al., 1988] [Takahashi et al., 1989].

In vitro, l'HHV-6 peut être différencié en types par sa capacité à infecter des lignées particulières continues de cellules T (Abalshi et al., 1993) mais il est toutefois difficile à cultiver. L'HHV-6A souche GS est le plus souvent cultivé sur la lignée humaine T lymphoblastoïde HSB-2 alors que la souche U1102 peut être propagée au sein de cellules humaines J JHAN. La souche prototype Z29 de l'HHV-6B a été adaptée à la culture sur la lignée lymphocytaire T Molt-3, alors que la souche HST de l'HHV-6B croît préférentiellement au sein de cellules lymphoblastoïdes T humaines MT4 [Braun et al., 1997a, Clark et al., 2000].

I.5.2. Effets sur la cellule hôte

L'HHV-6 induit sur la cellule hôte de profondes modifications, incluant une marginalisation de la chromatine [Nii et al., 1990], un arrêt de la synthèse d'ADN [Di Luca et al., 1990] et une stimulation généralisée de la synthèse protéique au sein de la cellule hôte [Balachandran et al., 1989, Black et al., 1992]. La conséquence de ces modifications

est le développement d'un effet cytopathogène se manifestant par une ballonisation provoquant la formation de cellules géantes multinucléées ou *syncytia* [Salahuddin et al., 1986].

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

I.5.3. Latence

Au même titre que les autres herpèsvirus, l'HHV-6 persiste toute la vie au sein de son organisme hôte. Cette persistance se caractérise soit par un état latent entrecoupé de périodes de réactivation, soit par une réPLICATION chronique avec une production continue plus ou moins importante de particules infectieuses. Pendant l'infection latente, aucun virus infectieux n'est produit, l'intégrité de la cellule hôte est préservée et les antigènes viraux caractéristiques d'une infection productive ne sont pas exprimés, l'HHV-6 est ainsi à l'abri du système immunitaire de l'hôte infecté. Seuls quelques transcrits associés à la latence de l'HHV-6, transcrits du gène U94 et les transcrits associés à la latence, peuvent être détectés. Au plan cellulaire, la latence peut être définie comme une infection au cours de laquelle le génome viral est présent sous forme épisomale non réplicative et à partir de laquelle il peut se réactiver. Au niveau de l'hôte infecté, la latence peut être

définie comme une phase cliniquement muette, pouvant aboutir à une réactivation du virus, c'est-à-dire à la reprise d'un cycle lytique. Cette réactivation de l'HHV-6 peut alors être symptomatique ou non.

Les deux formes de persistance, latence et réPLICATION chronique, peuvent être présentes au sein du même individu bien que les sites anatomiques les portant soient différents. Les glandes salivaires [Krueger et al., 1990] et le tissu cérébral semblent arborer l'infection chronique à HHV-6 alors que les monocytes [Kondo et al., 1991] et les cellules progénitrices de la moelle osseuse [Luppi et al., 1999] sont des sites probables de latence.

Les mécanismes impliqués dans la mise en état de latence restent méconnus dans le détail, mais il semble que le gène U94 joue un rôle important. U94 est un gène IE [Mirandola et al., 1998] exprimé à faible niveau pendant l'infection lytique [Rapp et al., 2000], mais est un transcrit majeur pendant la latence. Il a été le seul détecté dans les PBMCs des personnes saines suggérant le fait qu'il est capable d'établir et/ou de maintenir l'infection latente [Rotola et al., 1998]. La protéine U94 pourrait avoir une fonction dans la régulation de la latence soit en se liant à une séquence spécifique de l'ADN (comme le fait la protéine Rep de l'AAV-2), soit c'est un répresseur des gènes viraux IE (comme les transcrits LAT associés à la latence d'HSV-1) [Rotola et al., 1998]. On parle aussi de son éventuelle implication dans l'intégration de l'HHV-6 au sein du génome cellulaire (cf paragraphe intégration). Les transcrits issus des ORF U90-89 et U90-86/87, appelés LTs (latency-associated transcripts), semblent être associés à la latence [Kondo et al., 2002].

II. Manifestations cliniques et traitement des infections à HHV-6

II.1. Manifestations cliniques

II.1.1. Au cours de la primo-infection

La primo-infection à HHV-6 est, dans la plupart des cas, asymptomatique. La forme cliniquement apparente appelée roséole infantile ou sixième maladie infantile ou encore exanthème subit a été pour la première fois reconnue en 1988 [Yamanishi et al., 1988]

(Figure 8). Elle survient communément vers l'âge de 6 mois [Asano et al., 1994], et est caractérisée par une fièvre intense supérieure à 39 °C de deux à trois jours, puis par un rash cutané caractéristique sur le tronc, le cou et le visage. Les complications les plus courantes sont des crises fébriles, des syndromes mononucléosidiques, des convulsions, des malaises, des otites, des symptômes gastro-intestinaux ou du tractus respiratoire, des méningites [Asano et al., 1994, Barone et al., 1995, Hall et al., 1994, Kondo et al., 1993, Torre et al., 2005, Ward and Gray et al., 1994]. Des complications plus sévères du système nerveux central (SNC), telles que des méningo-encéphalites et des encéphalopathies, existent mais sont rares [Birnbaum et al., 2005, Kato et al., 2003, Yoshikawa and Asano et al., 2000]. L'ADN de l'HHV-6 a été détecté dans les liquides céphalo-rachidiens (LCR) d'enfants ayant présentés des convulsions durant la primo-infection ou la réactivation. Il a également été rapporté des cas d'hépatites fulminantes, des dysfonctionnements hépatiques, des thrombocytopénies et des syndromes d'hémophagocytose [De Bolle et al., 2005a]. Chez l'adulte la primo-infection HHV-6 est plus que rare étant donné la forte séroprévalence chez l'enfant, et est donc mal documentée. Lorsqu'elle est symptomatique, elle se manifeste le plus souvent par un simple syndrome mononucléosique [Akashi et al., 1993, Goedhard et al., 1995, Sumiyoshi et al., 1995], mais des cas d'hépatite fulminante existent [Sobue et al., 1991]. Chez l'immunodéprimé, la primo-infection est bien plus symptomatique et même parfois fatale [Lau et al., 1998, Rossi et al., 2001].

Au niveau des variants, l'HHV-6B est le plus souvent impliqué dans les primo-infections dans les deux premières années de vie. Cela peut s'expliquer par le fait que l'HHV-6B réplique dans les glandes salivaires [Levy et al., 1990] et le mode principal de transmission de l'HHV-6 est comme nous l'avons vu précédemment la salive.



Figure 8: Exanthème subit du nourrisson
[\(http://aapredbook.aappublications.org/week/063_03.jpg\)](http://aapredbook.aappublications.org/week/063_03.jpg)

II.1.2. Au cours de la réactivation

II.1.2.1 Chez l'immunocompétent

Chez l'immunocompétent, l'HHV 6 peut être responsable d'accès inexplicables de fièvre avec polyadénopathies et convulsions, ou d'un syndrome mimant une mononucléose infectieuse. Au vu de la haute séroprévalence dans la population adulte, ces manifestations sont vraisemblablement attribuables à une réactivation virale endogène. Des rares cas d'hépatite fulminante, d'insuffisance hépatique, de thrombocytopénie, de paralysie faciale, et des atteintes neurologiques à type de méningo-encéphalite sont possibles.

Le neurotropisme marqué de l'HHV-6A le rend suspect dans de nombreuses atteintes du système nerveux central. En effet, l'HHV-6 a été trouvé *in situ* dans les oligodendrocytes des plaques de démyélinisation [Challoner et al., 1995]. Des niveaux élevés de récepteur CD46 soluble dans le sérum et le liquide céphalo-rachidien ont été corrélés à la présence d'ADN de l'HHV-6 dans le sérum de patients atteints de SEP [Soldan and Jacobson et al., 2001]. Ces niveaux accrus de CD46 avaient précédemment été décrits dans plusieurs désordres auto-immuns, dont la SEP. Il existe d'autres cas divers d'adultes immunocompétents présentant une maladie aiguë du système nerveux central due à une infection active à HHV-6 [Beovic et al., 2001, Denes et al., 2004, Mackenzie et al., 1995].

D'autre part l'HHV-6 a été, à l'origine, isolé chez des patients présentant des désordres lymphoprolifératifs [Salahuddin et al., 1986]; son rôle possible dans l'oncogenèse a été recherché. En effet, certains gènes d'HHV-6 codent des protéines transactivatrices, dont la pDR7 qui a été décrite comme ayant des propriétés de transformation ([Kashanchi et al., 1997].

II.1.2.2 Chez l'immunodéprimé

• Greffés de CSH

L'incidence des réactivations HHV-6 varie de 30 à 91 %, auto et allo greffes confondues (annexe 1), suivant les études. Si beaucoup sont asymptomatiques, les réactivations symptomatiques apparaissent pratiquement toutes dans les 15 à 100 jours qui suivent la greffe. Ce sont les syndromes fébriles et les rashes cutanés les symptômes les plus couramment rencontrés [Asano et al., 1991, Cone et al., 1993, Wilborn et al., 1994, Yoshikawa et al., 1991]. Des cas d'encéphalites à HHV-6, parfois fatales, sont aussi

avancées [Drobyski et al., 1994], elles sont confirmées par la détection du génome de l'HHV-6 dans le LCR et en l'absence de toute autre étiologie. La réactivation de l'HHV-6 dans les greffes de CSH est également une importante cause d'insuffisance médullaire [Carrigan and Knox et al., 1994, Drobyski et al., 1993], de retard de sortie d'aplasie [Singh and Carrigan et al., 1996], et de thrombopénies prolongées [Zerr et al., 2005]. Les leucopénies sont les plus courantes (83 %), suivis par des thrombopénies (67 %) et des anémies (50 %). L'insuffisance médullaire peut être transitoire ou chronique [Knox and Carrigan et al., 1996]. L'atteinte des lignées myéloïde et plaquettaires est corrélée à l'intensité de la réPLICATION virale [Boutolleau et al., 2003] [Ogata et al., 2006]. L'implication de la réactivation HHV-6 dans les pneumonies interstitielles est elle controversée. D'abord évoquée par Carrigan en 1993 devant un tableau de pneumopathie interstitielle idiopathique avec des biopsies pulmonaires positives en HHV-6 et des charges virales croissantes, elle n'a pas été retrouvée dans une étude japonaise d'une cohorte pédiatrique [Yoshikawa et al., 2002].

D'autre part, un lien semble établi entre la GVHD et l'infection à HHV-6, la fréquence des infections à HHV-6 augmente avec la sévérité de la GVHD [Wilborn et al., 1994], et l'association avec la GVHA est retrouvée significative dans d'autres études [Hentrich et al., 2005, Wang et al., 2008].

- Greffé d'organes solides

Le pourcentage d'infections à HHV-6 en post-greffe d'organes est important, il atteint 30 à 60 % chez les greffés rénaux selon les études [DesJardin et al., 1998], 24 % pour les greffes hépatiques [Dockrell et al., 1997], et est trop peu étudié chez les greffés cardiaques. Bien que la plupart du temps asymptomatique, les symptômes imputés à HHV-6 après élimination des autres étiologies sont par ordre décroissant, les syndromes fébriles et les rashes cutanés [Humar et al., 2002, Jacobs et al., 1994], les myelosuppressions [Morris et al., 1989, Singh et al., 1997, Singh et al., 1995], des hépatites et rejet de greffons [Acott et al., 1996, Hoshino et al., 1995, Humar et al., 2002, Lautenschlager et al., 1998, Okuno et al., 1990], des troubles neurologiques [Rogers et al., 2000] et même des encéphalites [Montejo et al., 2002, Singh and Paterson et al., 2000].

- Chez le sidéen

La réactivation de l'HHV-6 chez les patients atteints du VIH est assez fréquemment détectée mais ses répercussions cliniques sont rares. Dans des cas isolés, la réactivation de l'HHV-6 chez des patients sidéens a été associée à des encéphalites [Knox et al., 1995], des pneumopathies [Nigro et al., 1995] ou des rétinites [Qavi et al., 1995, Reux et al., 1992]. A

l'heure actuelle on ignore si l'HHV-6 agit simplement en tant que pathogène opportuniste ou agit en synergie avec le VIH sur la progression de la maladie.

II.2. Traitement

Chez l'immunocompétent, les infections à HHV-6 sont asymptomatiques ou limitées chez le jeune enfant et ne nécessitent donc normalement pas de traitement. En revanche chez l'immunodéprimé les infections symptomatiques peuvent être graves et nécessitent un traitement. Il n'existe pas de médicament antiviral spécifique de l'HHV-6, l'arsenal thérapeutique proposé est donc celui des antiherpétiques et plus particulièrement ceux utilisés sur un autre membre des *Betaherpesvirinae*, le CMV. Sont potentiellement actifs sur le CMV, les analogues nucléosidiques (Ganciclovir et Valganciclovir, Acyclovir et Valaciclovir), un analogue nucléotidique (Cidofovir) et un analogue de pyrophosphate (Foscarnet). L'efficacité clinique de ces molécules n'a encore jamais été réellement prouvée, on se base actuellement sur les cas de littérature qui décrivent l'efficacité des thérapies antivirales instaurées avec succès chez des patients au contexte clinique très variable.

Tableau 3: Efficacité des antiviraux anti-HHV-6 [de Pagter et al., 2008a]

Antiviral	Type d'antiviral	Efficacité <i>in vitro</i>	EC 50 (μM)*	Efficacité <i>in vivo</i> rapportée	Auteurs
Ganciclovir	Analogue nucléosidique	Bonne	69	Bonne	[Mookerjee and Vogelsang et al., 1997]; [Yoshida et al., 2002]
Aciclovir	Analogue nucléosidique	Faible	185	Inefficace	[Yoshida et al., 1998]
Foscarnet	Analogue pyrophosphate	Excellente	25	Efficace	[Deray et al., 1989]
Cidofovir	Analogue nucléotidique	Excellente	9,8	Efficace	[Denes et al., 2004]
Maribavir	Analogue nucléosidique	Inefficace	>100	Inefficace	[Williams et al., 2003]
Cyclopropavir	Analogue méthylénecyclopropane	Bonne	7,8	En cours d'étude	[Kern et al., 2005]

*EC50: 50% concentration efficace. Toutes les EC50 ont été déterminées sur des cellules MOLT-3-T infectées par de l'HHV-6B de la souche Z-29, sauf pour le cyclopropavir où ce sont des lymphocytes de sang de cordon qui ont été utilisés

- Analogues nucléosidiques

L'Acyclovir (ACV) et le Ganciclovir (GCV) sont des analogues de la désoxyguanosine qui doivent être sous forme triphosphorylée pour être actifs. Dans le cas de l'HHV-6, le premier groupement phosphate, qui convertit l'analogue de nucléosides en son dérivé monophosphate, est ajouté par une phosphotransférase codée par le gène U69. L'expression de cette protéine permet la phosphorylation du GCV [Ansari and Emery et al., 1999]. Les deux autres phosphorylations sont assurées par des kinases cellulaires. Sous leurs formes actives triphosphates, l'ACV et le GCV entrent en compétition avec la dGTP en tant que substrat pour l'ADN polymérase virale. Suite à son insertion dans l'ADN en cours de réPLICATION, la synthèse de l'ADN prend fin. L'activité *in vitro* du GCV contre HHV-6 est très supérieure à celle de l'ACV [Agut et al., 1991, Manichanh et al., 2000]Yoshida et al., 1998). En raison de leurs faibles activités l'ACV et le Val-ACV ne sont donc utilisés ni dans le traitement ni dans la prévention des maladies à HHV-6. A l'inverse, plusieurs cas rapportés montrent l'efficacité clinique du GCV *in vivo* chez des greffés de moelle osseuse ou d'organe solide [Johnston et al., 1999, Mookerjee and Vogelsang et al., 1997, Paterson et al., 1999, Rieux et al., 1998, Yoshida et al., 2002], bien que quelques cas d'infection fulminante à HHV-6 n'aient montré aucune réponse [Rossi et al., 2001]. L'utilisation du GCV en prophylaxie, à l'inverse de l'ACV, s'est montrée efficace en empêchant la réactivation d'HHV-6 chez des receveurs de moelle osseuse et de cellules souches [Rapaport et al., 2002, Tokimasa et al., 2002]. Cependant le GCV est à manier avec précaution car il peut causer d'importants effets secondaires hématotoxiques dose-dépendants [McGavin and Goa et al., 2001].

- Analogues nucléotidiques

Le Cidofovir (CDV) est un analogue des nucléosides phosphonates qui appartient à la famille des dérivés phosphonylméthoxyalkyl des purines et des pyrimidines. Etant donné que sa structure primaire comprend un groupement phosphate, il n'a pas besoin d'être phosphorylé. Les kinases cellulaires le convertissent en sa forme diphosphate qui est alors un inhibiteur compétitif de l'ADN polymérase viral. Sa sélectivité est assurée par la plus grande affinité du CDV diphosphate pour l'ADN polymérase virale que pour les ADN polymérase cellulaires. Le CDV montre une forte activité contre l'HHV-6 *in vitro* [Reymen et al., 1995] et c'est le composé le plus actif sur l'HHV-6 avec le foscarnet. Cependant il présente une néphrotoxicité importante [Denes et al., 2004].

- Analogues de pyrophosphate

Le Foscarnet (PFA) est un analogue des pyrophosphates inorganiques qui ne nécessite pas d'activation préalable par les TK virales ou cellulaires. Le PFA bloque le site de liaison

des pyrophosphates inorganiques sur l'ADN polymérase et empêche ainsi le clivage des NTP et le transfert des pyrophosphates inorganiques sur l'ADN polymérase virale.

Des études ont montré l'utilisation réussie du Foscarnet dans le traitement des encéphalites à HHV-6 chez des receveurs de greffe [Bethge et al., 1999, Zerr et al., 2002], alors que d'autres ont eu un résultat décevant [Rossi et al., 2001, Tiacci et al., 2000].

- Résistance

La première étude de résistance d'HHV-6 aux antiviraux a été menée par Manichanh en 2001 [Manichanh et al., 2001]. Son équipe a isolé un mutant après l'avoir soumis à des concentrations croissantes de GCV les concentrations inhibitrices IC₅₀ du mutant HHV-6 étaient 24, 52 et trois fois plus élevées que les IC₅₀ de la souche sauvage, respectivement pour le GCV, le CDV et le PFA. Deux mutations de substitution ont alors été identifiées : M318V dans la phosphotransférase pU69 (anologue de M460V/I de la pUL97 du CMV [Baldanti et al., 2002], et A961V dans l'ADN polymérase pU38 d'HHV-6. La mutation M318V a également été détectée par PCR sur des PBMC infectées par l'HHV-6. Ces PBMC ont été isolées d'un patient atteint du SIDA longtemps traité par du GCV pour une infection à CMV. Par la suite, la même équipe a développé une PCR quantitative en temps réel permettant de mettre en évidence, lors d'essais anti-viraux, la résistance au GCV due à cette mutation [Mace et al., 2003]. Safronetz [Safronetz et al., 2003] a pu évaluer l'impact d'une série de mutations de la pU69 d'HHV-6. Ces mutations ont été introduites à des positions correspondant aux codons de la pUL97 du CMV conférant la résistance au GCV. Les substitutions M318V, C448G, C463Y de pU69, correspondant respectivement aux mutations M460V, C592G, C607Y de pUL97, altèrent significativement la phosphorylation du GCV par pU69 et confèrent ainsi la résistance d'HHV-6 au GCV.

III. Intégration

Ce phénomène, bien qu'excessivement rare ou sous estimé, a été pour la première fois évoqué par Luppi et al. [Luppi et al., 1993] chez trois patients atteints de lymphomes et de sclérose en plaque par la mise en évidence de sites d'intégration de l'HHV-6 au niveau des extrémités télomériques du chromosome 17 (17p13) par technique FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) au sein des PBMCs de ces patients. Des études britanniques chez des donneurs de sang et japonaises dans une population suspectée infectée par l'HHV-6 évaluent l'incidence de ce phénomène respectivement à 0,8% et 0,21% [Leong et al., 2007,

Tanaka-Taya et al., 2004]. Une étude italienne plus récente chez des greffés de CSH et d'organes solides conclue à une incidence de 0,9% [Potenza et al., 2009]. Le principal élément d'orientation est à la base dans toute ces études la présence d'une charge virale très importante (≥ 1 copie/cellule) et persistante dans les cellules mononucléées du sang périphérique [Clark et al., 1996, Clark et al., 2006, Leong et al., 2007, Ward et al., 2006, Ward et al., 2005], non régressive sous traitement [Hubacek et al., 2007b]. L'intégration de l'HHV-6 au génome cellulaire a été confirmée pour certains par hybridation fluorescente *in situ* [Daibata et al., 1998, Morris et al., 1999] ou par détection de l'HHV-6 dans les follicules capillaires [Ward et al., 2006]. Ward évoque une intégration génomique devant des charges virales dans le sang > 7 log, dans le sérum $> 5,3$ log, et dans les follicules capillaires $> 4,2$ log.

Les mécanismes en jeux dans l'intégration génomique sont encore peu connus et peu étudiés. Elle se ferait *via* les DRs et notamment les séquences répétées terminales (TTAGGG)_n identiques aux hexamères télomériques des chromosomes humains [Morris et al., 1999] et avec lesquelles ils se recombineraient. En revanche, les sites d'intégration diffèrent suivant les études, 17p13 [Morris et al., 1999], 1q44 (Daibata et al., 1998a), 22q13 (Daibata et al., 1998b; Tanaka-Taya et al., 2004), 11p15.5 [Clark et al., 2006] et 9q34, 10q26, 19q13 [Nacheva et al., 2008]. Le phénomène d'intégration se déroulerait pendant la période de latence où la protéine U94, fortement exprimée pendant cette période jouerait un rôle dans l'intégration de l'ADN viral au sein du génome de la cellule hôte. Comme son homologue la protéine rep chez l'AAV-2, qui permet l'intégration de l'AAV-2 en ciblant des séquences d'ADN spécifiques, la protéine U94 qui présente les mêmes propriétés, pourrait agir de la même manière [Rotola et al., 1998]. Les deux variants A et B de l'HHV-6 sont tous les deux impliqués dans ce phénomène [Clark and Ward et al., 2008].

La découverte par une équipe japonaise [Daibata et al., 1999] lors d'une étude familiale par FISH sur des PBMCs, de formes intégrées de l'HHV-6 (CIHHV-6) sur le chromosome 22q13 chez une patiente atteinte d'un lymphome de burkitt, 1q44 chez son mari, et l'association 22q13 et 1q44 chez leur fille, a pour la première fois évoqué la possibilité d'une transmission héréditaire de l'HHV-6 intégré. Cette étude poussée sur trois générations montre la persistance d'une forme intégrée au niveau du site 1q44 sur les trois générations. Une étude plus récente et plus étendue chez des nouveaux nés américains montre que 86% des infections congénitales à HHV-6 sont de forme intégrée [Hall et al., 2008], la forme intégrée étant évoquée sur des critères de charges virales HHV-6 élevée (≥ 1 gec/cellule) et sur la positivité HHV-6 des follicules pileux. La transmission via la greffe de CSH a également été évoqué chez des receveurs présentant des charges virales HHV-6 élevées (≥ 1 gec/cellule) en post-greffe alors qu'elles étaient négatives en pré-greffe [Jeulin et al., 2009b], donneurs et receveurs ayant dans certaines études été testés par

technique FISH montrant une intégration chromosomique au même endroit 17p13.3 [Clark et al., 2006].

Cliniquement, aucune étude ne documente à ce jour, une implication de l'intégration génomique de l'HHV-6.

IV. Diagnostic des infections à HHV-6

Le diagnostic des infections à HHV-6, potentiellement grave, fait appel à plusieurs techniques qui dépendent aujourd'hui, au-delà des considérations économiques, de la sensibilité, de la spécificité et de la rapidité de la technique, mais également de la nature du prélèvement analysé et de l'état immunitaire du patient. Compte tenu de la forte séroprévalence de l'HHV-6 dans la population générale et de son caractère opportuniste chez l'immunodéprimé, la détection du génome de l'HHV-6, technique très sensible, spécifique et rapide, est actuellement la technique de choix.

IV.1.1. Diagnostic direct

IV.1.1.1 La culture cellulaire

La mise en évidence de l'HHV-6 par culture cellulaire date de sa découverte en 1986, en effet le virus a été isolé en cultivant des cellules mononucléées de sang périphérique de patients avec des lymphocytes de donneurs sains préalablement stimulés par de l'interleukine 2 et de la phytohémagglutinine. Des cellules mononucléées de sang de cordon peuvent également être utilisées [Yamanishi et al., 1988]. Il faut 5 à 21 jours de culture pour observer la réplication virale sous forme d'un effet cytopathogène (ECP) caractéristique : cellules ballonisées géantes et réfringentes [Salahuddin et al., 1986, Taniguchi et al., 2000]. L'identification du virus impliqué, et notamment du variant, se fait ensuite par immunofluorescence à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre l'HHV-6 [Singh and Carrigan et al., 1996] ou par PCR.

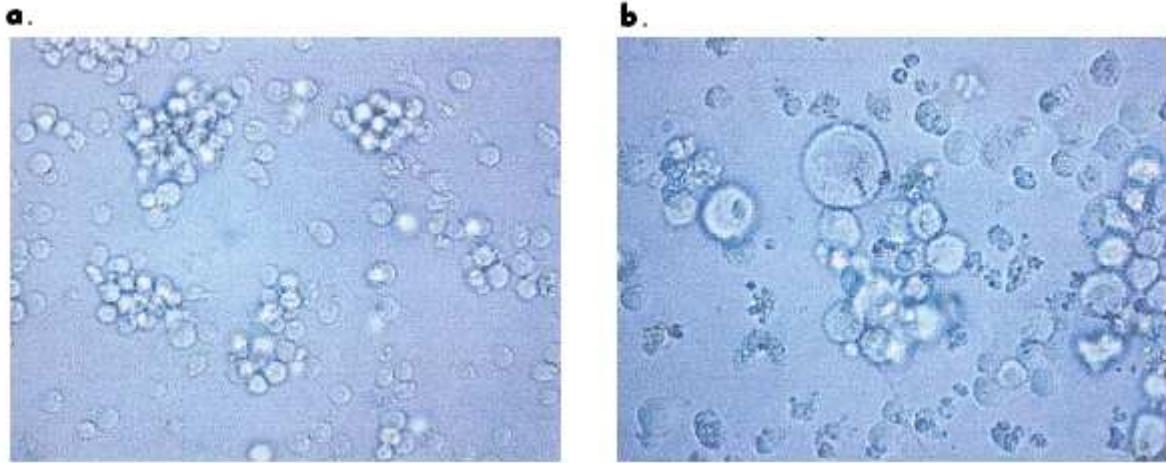


Figure 9. Isolement de l'HHV-6 en culture cellulaire [Salahuddin et al., 1986, Taniguchi et al., 2000]

a) cellules lymphoblastiques saines

b) cellules lymphoblastiques infectées par l'HHV-6 (x200)

C'est la technique de référence, elle met en évidence une infection réplicative et donc active. Cependant certaines souches donnent parfois un ECP invisible ou fugace. La technique est longue, coûteuse et peu sensible en général. Elle dépend de la qualité des lymphocytes du donneur et, pour les cellules en lignée, la sensibilité est très souvent faible.

IV.1.1.2 Microscopie électronique

L'avantage de cette technique est qu'elle met directement en évidence la particule virale. La sensibilité reste néanmoins faible et elle nécessite un équipement délicat et coûteux.

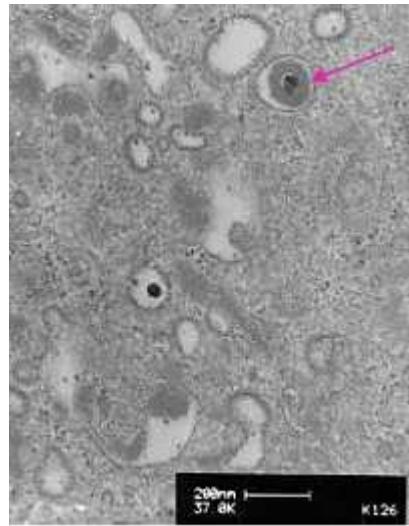


Figure 10. HHV-6 en microscopie électronique (Laboratoire de Virologie, Groupe hospitalier de la Pitié-Salpêtrière)

IV.1.1.3 Détection d'antigènes

La recherche se fait par immunofluorescence ou immunoperoxydase sur cellules ou tissus infectés. Les antigènes sont détectés par des anticorps monoclonaux spécifiques qui sont eux même mis en évidence à l'aide d'un conjugué marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine ou à la peroxydase. Des anticorps réagissent avec des antigènes communs aux deux variants HHV-6 [Okuno et al., 1992], et d'autres sont spécifiques de chaque variant [Foa-Tomasi et al., 1995]. Ces techniques sont utilisées pour les confirmations de culture et également dans la détection d'antigène HHV-6 dans les tissus [Lautenschlager et al., 1998]. La détection d'antigènes directement dans les prélèvements sanguins existe, elle consiste à récupérer les PBMCs par centrifugation sur gradient de Ficoll-Hypaque et à les déposer sur une lame par cytocentrifugation. Des anticorps monoclonaux sont utilisés ensuite pour révéler un antigène commun aux deux variants et la protéine p101 spécifique de l'HHV-6B [Lautenschlager et al., 2000].

Les avantages de ces techniques sont que la présence d'antigène est un signe du caractère répliquatif du virus et que l'on peut différencier les deux variants, mais les anticorps sont parfois de mauvaise qualité et il existe des réactivités croisées avec d'autres herpèsvirus. Les antigènes peuvent être dégradés par les différentes étapes dont la fixation sur lame.

IV.1.1.4 Détection du génome viral

La détection de l'ADN viral par amplification génique (PCR) est la méthode de détection la plus répandue actuellement. Elle est applicable à une grande variété d'échantillons biologiques tels que le sang total, le plasma, le LCR ou les biopsies. La difficulté à distinguer une infection latente d'une infection active, a très vite mis à mal la PCR qualitative. De nombreuses techniques de PCR quantitatives ont alors vu le jour. La première génération de PCR quantitative, compétitive [Clark et al., 1996], plutôt compliquée a laissé la place aux PCR en temps réel. Certains travaux se sont orientés sur des sondes Taqman, d'autres sur des sondes d'hybridation, avec des gènes cibles différents (Tableau 4). Pour la virémie HHV-6, signe d'une réactivation systémique, le dilemme du choix de l'échantillon, plasma ou cellules mononucléées, a été résolu par la possibilité d'utiliser le sang total [Achour et al., 2007, Deback et al., 2008]. Aujourd'hui la technique est commercialisée en kits qui utilisent essentiellement des sondes Taqman. Des Kits permettent de quantifier un gène de contrôle cellulaire afin de rapporter la charge virale HHV-6 par rapport au nombre de cellules sont en cours de validation.

Tableau 4: Techniques PCR quantitative HHV-6 en temps réel

Technique	Prélèvements	Gène étudié	Espèces reconnues	Auteurs
TaqMan	Plasma	U67	Non	[Locatelli et al., 2000]
Hybridation	Sang	U11	Non	[Aritaki et al., 2001]
TaqMan	Plasma, PBL	IE1	Oui	[Nitsche et al., 2001]
TaqMan	Sang, LCR	U65-U66	Non	[Gautheret-Dejean et al., 2002]
TaqMan	Salive, biopsie	U22	Non	[Collot et al., 2002]
TaqMan	Plasma, PBMC	IE1	Oui	[Sashihara et al., 2002]
Hybridation	PBMC	U38	Oui	[Safronet et al., 2003]
TaqMan	plasma	U38	Oui	[Reddy and Manna et al., 2005]

La détection et/ou la quantification des ARN messagers viraux, signe d'une réPLICATION virale, est un complément intéressant mais reste complexe devant la fragilité de ces ARN, et ne semble pas adaptée à une approche systématique. Elle reste réservée au domaine de la recherche [Andre-Garnier et al., 2004, Caserta et al., 2004].

La PCR en temps réel a l'avantage d'être une technique sensible, spécifique et rapide, mais elle présente aussi la meilleure qualité de standardisation et de reproductibilité par rapport aux autres techniques. Cependant, elle présente les défauts communs aux techniques de biologie moléculaire: présence d'inhibiteur de la PCR, rigueur de

manipulation. Autre inconvénient de cette technique et non des moindres, on ne peut pas affirmer l'état dans lequel se trouve le virus, latent, réplicatif, ou intégré, à partir d'une charge virale ne reflétant pas le caractère réplicatif du virus.

IV.1.2. Diagnostic indirect

Les techniques sérologiques utilisent l'immunofluorescence ([Briggs et al., 1988, Krueger et al., 1991], les tests ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) [Nigro et al., 1995, Parker and Weber et al., 1993], ou l'immunoblot [LaCroix et al., 2000]. Compte tenu de la forte séroprévalence de l'HHV-6, le seul intérêt diagnostic de la recherche d'IgG est de prouver la séroconversion [Ueda et al., 1989]. La détection d'IgM, généralement signe d'une primo-infection ou d'une réactivation, n'est pas forcément un bon indicateur dans le cas de ce virus. En effet de nombreux enfants ayant une culture positive pour HHV-6 ne développent pas de réponse IgM détectable et environ 5 % des adultes sains présentent des IgM anti-HHV-6 à n'importe quel moment [Suga et al., 1992].

TRAVAIL PERSONNEL

I. Problématique

Les études menées sur des populations allogreffiées de CSH montrent que l'incidence des réactivations de l'HHV-6 est très variable de 28,0% à 78,0% (Annexe 1). Si les facteurs de risque et les manifestations cliniques associés à cette réactivation restent assez similaires entre ces études, les techniques de diagnostic ont largement évolué. La biologie moléculaire est aujourd'hui incontournable dans le diagnostic des infections à HHV-6 chez le sujet greffé de CSH par rapport aux autres techniques plus contraignantes, moins sensibles et moins spécifiques (isolement viral, antigénémie). L'avènement de la PCR en temps réel a permis de clarifier en partie la confusion entre infection latente et infection active, posée par la PCR qualitative [Boutolleau et al., 2006, Deback et al., 2008, Gautheret-Dejean et al., 2002]. Cependant la découverte récente de l'intégration de l'HHV-6 au génome cellulaire a perturbé le diagnostic moléculaire des infections à HHV-6. La reconnaissance d'une intégration génomique apparaît aujourd'hui nécessaire pour interpréter correctement une charge virale très élevée dans le sang ou dans un organe et éviter un traitement inutile et une fausse orientation vers une réactivation virale. Or, les tests spécifiques de détection des formes intégrées (hybridation *in situ*) sont peu répandus et ne sont actuellement pas utilisables en routine. Il faut donc pouvoir proposer, à partir des moyens de diagnostic moléculaire utilisés en routine et des observations cliniques, des arguments permettant d'orienter la prise en charge des patients atteints d'infections à HHV-6 dans les allogreffes de CSH.

II. Matériels et méthodes

II.1. Etude de cohorte

II.1.1. Population ciblée

Cette étude rétrospective concerne 390 patients, adultes comme enfants, ayant reçu une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques entre le 1er janvier 1999 et le 31 décembre 2008 dans le service de transplantation médullaire du CHU de Nancy. Ont également été inclus les patients ayant reçu plusieurs allogreffes sur cette période. L'ensemble des données a été fourni par le service de transplantation médullaire du CHU de Nancy, le recueil a été fait jusqu'à la date des dernières nouvelles connues pour chaque patient.

II.1.2. Prophylaxies et traitements

II.1.2.1 Conditionnements

Le conditionnement préalable d'allogreffe de CSH a deux objectifs principaux : l'action anti tumorale et l'action immunosuppressive. Différents schémas sont disponibles, ils se différencient surtout en fonction de leurs propriétés myélotoxique et immunomodulatrice. Le choix est fonction de l'hémopathie, du type de greffon et de l'âge. A partir du recueil des données, les conditionnements ont été séparés en deux catégories: les conditionnements myéloablats et les conditionnements atténus.

Les conditionnements myéloablats sont réservés aux patients de moins de 50 ans; les schémas utilisés au sein de cette cohorte ont comporté soit la radiothérapie corporelle totale (ICT), soit le busulfan. L'ICT à la dose de 12 grays a été le plus souvent associée au cyclophosphamide (120 mg/Kg), mais aussi au melphalan (140 mg/m²) et dans des indications particulières à la fludarabine (150-200 mg/m²), à l'étoposide, au thiopeta et à l'aracytine. En ce qui concerne le busulfan (14-20 mg/Kg) il a lui aussi été le plus souvent associé au cyclophosphamide (120-200 mg/Kg) mais également au melphalan (140 mg/m²) et la fludarabine (150-180 mg/m²), voir au thiopeta.

Pour les plus jeunes greffés, la radiothérapie a été évitée et remplacée par l'usage du busulfan en raison des séquelles cognitives et hormonales chez le jeune enfant.

Les conditionnements « atténus » présentent une composante plus immunosuppressive que myélotoxique, ce qui permet l'accès de l'allogreffe à des patients

d'âge plus avancé présentant des facteurs de comorbidité contre-indiquant les conditionnements myéloablatifs. La plupart de ces conditionnements ont eu pour base la fludarabine ($120\text{-}200 \text{ mg/m}^2$), agent immunosuppresseur majeur, auquelle ont été associés d'autres immunosuppresseurs d'activité myélotoxique variable, le cyclophosphamide ($40\text{-}120 \text{ mg/Kg}$), le busulfan à faible dose ($3.2\text{-}12.8 \text{ mg/Kg}$), le melphalan ($70\text{-}140 \text{ mg/m}^2$) ou une irradiation complète de faible intensité (2 grays). D'autres schémas sans fludarabine ont également été utilisés : irradiation faible intensité ou busulfan faible dose avec cyclophosphamide, melphalan et/ou aracytine.

Les patients souffrant d'aplasie médullaire ont bénéficié d'un conditionnement particulier à base de cyclophosphamide seul à la dose de 50 mg/kg/j pendant quatre jours. A noter également que deux LLC ont reçu en complément des anticorps monoclonaux anti-CD20 et un désordre immunitaire des anticorps monoclonaux anti-CD52, le but étant d'augmenter le taux de rémission si la fludarabine n'est pas suffisamment efficace.

II.1.2.2 Prophylaxie de la réaction du greffon contre l'hôte

L'association la plus utilisée est l'association méthotrexate (MTX) intraveineuse à la dose de 15 mg/m^2 à J1 puis de 10 mg/m^2 aux J3, J6 et J11 avec la ciclosporine (CsA) intraveineuse en continue 3mg/Kg/j de J-1 à J30 suivit par un relai oral jusqu'à J180. Le mycophénolate mofetil (Cellcept) remplace parfois le méthotrexate chez les patients ayant des conditionnements atténués. Dans les greffes de sang placentaire, le MTX est souvent par des corticostéroïdes. D'autres prophylaxies ont été plus rarement utilisés telles que la CsA seule, le MTX seul ou la T-déplétion *in vivo* ou *in vitro* du greffon.

Le sérum anti-lymphocytaire (SAL) est également utilisé dans la prévention de la GVHD aigue comme chronique et dans la prévention du rejet du greffon par son effet de T-déplétion *in vivo*. On différencie les SAL issus du sérum de cheval (lymphoglobulines) ou du sérum de lapin (thymoglobulines et Frésenius[®]). Les SAL sont principalement utilisés dans les allogreffes non apparentées. Les patients ayant bénéficié de SAL ont principalement eu des thymoglobulines à la dose de $\pm 7,5 \text{ mg/Kg}$ ($2,5\text{-}15 \text{ mg/Kg}$) et du Frésenius[®] aux doses de 40 mg/Kg ou 90 mg/Kg .

II.1.2.3 Prophylaxie antivirale

La prévention des complications virales secondaires au déficit immunitaire induit par les chimiothérapies et autres traitements immunosuppresseurs a comporté : de l'aciclovir intraveineuse (IV) avec relai par valaciclovir *per os* pour l'HSV et le VZV pour tous les patients jusqu'à J180. Pour le CMV, l'EBV, l'HHV-6 et l'adénovirus une stratégie

préemptive a été mise en place, par ganciclovir pour le CMV, mabthera pour l'EBV, vistide pour l'adénovirus et foscarnet pour l'HHV-6. Cependant trois patients ont bénéficié d'une prophylaxie pour le CMV par Cymévan®.

II.1.3. Suivi infectieux

II.1.3.1 HHV-6

La stratégie adoptée par le service de transplantation médullaire du CHU de Nancy est un suivi virologique de l'HHV-6 bihebdomadaire les trois premiers mois puis hebdomadaire jusqu'à J100, par technique PCR sur échantillons de sang total. Les patients à risque peuvent bénéficier d'une surveillance prolongée.

II.1.3.2 Autres viroses

Un suivi identique à l'HHV-6 jusqu'à J100 a été réalisé pour le CMV, l'EBV et l'adénovirus, également par PCR quantitative en temps réel. Le suivi perdure toutes les deux à quatre semaines si le patient présente une GVHC.

II.1.3.3 Autres infections

Un suivi a été également réalisé pour les infections à HSV, à VZV, à virus respiratoires, les septicémies, les infections fongiques et la toxoplasmose. Les virus respiratoires incluent les virus de la grippe A et B, le virus respiratoire syncytial et les virus parainfluenza 1, 2 et 3. Les septicémies incluent les septicémies bactériennes et les infections fongiques invasives. Les infections fongiques non invasives ont été répertoriées dans les infections fongiques.

Les données concernant les réactivations virales ont été fournies par le service de transplantation médullaire du CHU de Nancy. Pour l' HHV-6, elles ont été confrontées et complétées par les données du laboratoire de virologie du CHU de Nancy.

Pour notre étude, la réactivation HHV-6 a été définie comme correspondant à la présence d'au moins une PCR positive sur l'ensemble des échantillons analysés dans les 150 jours qui ont suivi la greffe. Pour les autres infections, la période d'intéressement s'est également limitée à J150 après la greffe.

II.1.4. Suivi clinique

II.1.4.1 Reconstitution hématologique

Les données concernant les sorties d'aplasie et de thrombopénie post-greffe ont été fournies par le service de transplantation médullaire du CHU de Nancy. La sortie d'aplasie a été définie comme correspondant à une numération de polynucléaires neutrophiles $>500/\text{mm}^3$, trois jours de suite; et la sortie de thrombopénie comme correspondant à une numération plaquettaire $>20000/\text{mm}^3$, trois jours de suite sans transfusions.

La prise de greffe est définie comme: plaquettes $>50000/\text{mm}^3$ sans transfusions pendant une semaine, polynucléaires neutrophiles $>500/\text{mm}^3$ trois jours de suite, leucocytes $>1000/\text{mm}^3$ trois jours de suite.

II.1.4.2 Réaction du greffon contre l'hôte

Complication majeure de la greffe de CSH, la réaction du greffon contre l'hôte ou GVHD (Graft Versus Host Disease) s'exprime de deux façons : aigue (GVHA) (deux semaines à trois mois après la greffe), ou chronique (GVHC) (≥ 100 jours après la greffe).

Le diagnostic de la GVHA se fait à partir de signes cliniques au niveau d'organes cibles :

- la peau : rash cutané plus ou moins sévère
- le tube digestif : nausées, diarrhées, douleurs abdominales, anorexie
- le foie : cytolysé, ictere

La GVHD aigue est classée en quatre stades selon les critères de Glucksberg-Seattle [Glucksberg et al., 1974].

La GVHC s'exprime au-delà de J100 et touche habituellement la peau, les yeux, la cavité buccale, le tractus digestif et les poumons avec des composantes plus ou moins inflammatoires avec établissement d'un score (0-3) selon le site et la sévérité.

Les données concernant la GVHA ont été considérées, en revanche celles concernant la GVHC n'ont pas été prises en compte.

II.1.4.3 Données cliniques

Les données cliniques ont été recueillies à partir des données fournies par le service de transplantation médullaire du CHU de Nancy ou directement dans les dossiers patients.

II.1.4.4 Décès

Les données concernant le décès, date et causes du décès, ont été fournies par le service de transplantation médullaire du CHU de Nancy.

II.1.5. Analyses statistiques

L'analyse a consisté dans un premier temps en une description brute des données recueillies avec une description des caractéristiques de l'ensemble des patients de la cohorte. Dans un second temps, la population de la cohorte ($n=390$) a été divisée en fonction de son statut HHV-6, tous les patients ayant eu au moins une charge virale positive dans les 150 jours suivant la greffe ont été placés dans le sous-groupe des HHV-6+, les autres dans le sous-groupe des HHV-6-. Les patients pour lesquels l'intégration de l'HHV-6 ($n=3$) était suspectée, ont été exclus des analyses statistiques en raison de la présence permanente du génome dans les cellules du sang, ou de l'organisme, indifféremment des caractéristiques ou facteurs de risques associés. L'étude de cohorte s'est donc faite sur un effectif de 387 patients.

Sur cette population, nous avons évalué l'incidence cumulative de la réactivation HHV-6 brute et au sein de la population <18 ans. Les manifestations cliniques associées à la réactivation HHV-6 ont été appréciées en fonction des données recueillies dans les dossiers cliniques des patients. L'implication de l'HHV-6 a été suspectée devant la présence concomitante d'ADN HHV-6 dans les échantillons de sang total et de signes cliniques non documentés. Nous avons échelonné cette suspicion en "peu probable, forte, et avérée", en fonction des arguments clinico-biologiques. L'association de la réactivation HHV-6 avec les délais de sortie d'aplasie (Neutrophiles >0.5 G/L) et de thrombopénie (Plaquettes >20 G/L et Plaquettes >50 G/L) a été testé statistiquement.

Les facteurs associés à la réactivation HHV-6 ont été évalués par l'analyse statistique de l'association entre les données recueillies (âge, sexe, malignité de l'hémopathie, nature du greffon, allotype du donneur, conditionnement, prise de SAL, prophylaxie GVHD, sévérité GVHA) et la réactivation.

L'association entre l'infection à HHV-6 et d'autres co-infections (CMV, EBV, Adénovirus, VZV, HSV, virus respiratoires, mycoses, septicémies, toxoplasmose) a été

évaluée statistiquement en tenant compte des facteurs de risque associés à ces infections (GVHA ≥ 2 , délai de sortie d'aplasie).

L'impact de l'infection à HHV-6 sur la survie a été évalué par une représentation en Kaplan Meier de la survie cumulée entre les populations HHV-6+ (réactivant l'HHV_6) et HHV-6-. Les facteurs associés au décès (âge, malignité de l'hémopathie, la réactivation HHV-6, CMV, EBV, la présence d'une infection au moins, la présence d'un GVHA) ont été testés.

Les variables qualitatives ont été exprimées par leur effectif et leur pourcentage, les variables quantitatives par leur moyenne et écart-type. Les comparaisons ont été effectuées en fonction du type de variable par le test du Chi2 (ou le test de Fischer si les effectifs étaient insuffisants) et par le test t de Student.

La valeur du seuil de significativité statistique a été fixée à 0,05.

Les analyses statistiques ont été réalisées par le Dr Nelly Agrinier du service d'épidémiologie et d'évaluations cliniques du CHU de Nancy.

II.2. Diagnostic et suivi virologique des patients HHV-6

II.2.1. Echantillons

II.2.1.1 Prélèvements et préparation des échantillons

Les ADN ont été obtenus à partir d'échantillons de sang total, LCR ou biopsies, de 390 patients allogreffés de CSH de janvier 1999 à décembre 2008. La fréquence des prélèvements de sang total s'est faite au rythme de deux prélèvements par semaine pendant trois mois puis un prélèvement par semaine jusqu'à J100 comme nous l'avons évoqué auparavant. Les aliquots d'ADN extraits ont été stockés à -80°C une fois les analyses effectuées. Un prélèvement capillaire a également été effectué, il a été conservé dans de l'eau pour extraction qualité PCR fournie dans le kit Argene CMV HHV6,7,8 R-geneTM durant le transport.

II.2.1.2 Extraction de l'ADN

II.2.1.2.a) Méthode manuelle

L'extraction de l'ADN de certains prélèvements sanguins, et du prélèvement capillaire a été réalisée manuellement à l'aide du kit Qiagen : QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Annexe 3).

- Echantillons sanguins (Annexe 2)

L'échantillon est préalablement lysé en présence de protéases dans un tampon de lyse. Les lysats sont ensuite déposés dans une colonne contenant un gel de silice sur lequel l'ADN va se lier. Les caractéristiques physicochimiques du lysat sont telles que les protéines et les autres contaminants pouvant inhiber la PCR ne sont pas retenus sur la membrane. Le tampon de lyse permet d'optimiser les capacités de liaison de l'ADN sur ce gel. Une fois l'ADN fixé sur la colonne, celle-ci est lavée à l'aide de deux tampons de lavage. Cette opération permet d'éliminer la totalité des éventuels contaminants sans affecter la liaison de l'ADN au gel. L'étape d'élution, par du tampon d'élution ou de l'eau distillée, permet d'obtenir un ADN purifié directement utilisable en PCR. L'ADN élué est conservé à -80°C.

- Echantillon capillaire

Le prélèvement de cheveux a été traité comme une biopsie. Il a été préalablement broyé dans de l'eau pour extraction PCR fournie dans le kit Argene CMV HHV6,7,8 R-gene™ puis 200 µL du broyat a été mis à incuber 3 heures au bain marie à 56°C. Il a ensuite suivi la même procédure qu'une biopsie (Annexe 3). L'ADN élué a été conservé à -80°C.

II.2.1.2.b) Méthode automatisée

La plupart des échantillons sanguins ont été extraits de manière automatisée sur le MagNA Pure LC® de Roche diagnostic (Annexe 4). Le principe est le même que la méthode manuelle mis à part le fait que l'on utilise des particules magnétiques couplées à la silice et non une colonne. L'échantillon de sang est lysé avec un tampon contenant de la protéinase K et des agents chaotropiques. L'ADN libéré se lie à la silice présente à la surface de particules magnétiques. Ces dernières sont séparées magnétiquement du reste. Tout ce qui ne s'est pas fixé et tous les interférents de PCR sont éliminés par une série de lavages successifs. L'ADN fixé et purifié est ensuite recueilli par élution et conservé à -80°C.

II.2.2. PCR HHV-6

II.2.2.1 De 1999 à 2003

De 1999 à 2003, une PCR qualitative était utilisée. Les résultats étaient rendus positif ou négatif, le variant A ou B étant identifié.

- Amorces utilisées

Amorces	Séquences
HHV6 A+B sens	5' GCG TGA ATC AAA CCT CGC TCG A 3'
HHV6 A+B anti-sens	5' GCC TTA CTC GGA ATC TAC TGC 3'

Tableau 5: Amorces PCR qualitative 1999-2003

- Protocole PCR qualitative 1999-2003

Réactif	Quantité pour un tube
Tampon	5 µl
MgCl ₂	1 µl
dNTP	1 µl
HHV6 A+B sens 10 µM	1 µl
HHV6 A+B antisens 10 µM	1 µl
Sonde Taq Man 10 µM	0,30 µl
Eau qsp 40 µl	35,7 µl
ADN	5 µl
Total	50 µl

Tableau 6: Mix PCR qualitative 1999-2003

- Conditions PCR

7 min à 95°C
 1min à 94°C
 1min à 55°C
 1 min à 72°C

} 40 cycles

10 min à 72°C

II.2.2.2 De 2003 à 2006

De 2003 à 2006, c'est la PCR quantitative décrite par Agnès Gautheret-Dejean [Gautheret-Dejean et al., 2002] qui a été utilisée. La séquence de nucléotides à amplifier correspond à environ 173 pb de la souche U1102 situées aux positions 101529-101701 dans les gènes U65-66 de HHV-6. La séquence des amorces et de la sonde Taq Man et les conditions de la PCR sont décrites en dessous. La quantification se fait par rapport à une gamme étalon d'ADN plasmidique dans laquelle la concentration d'HHV-6 est connue (10^{11} copies/mL) et à partir de laquelle on prépare plusieurs dilutions pour avoir une gamme de 10^3 à 10^7 copies/mL. Le seuil de sensibilité était de 200 copies/mL. L'expression des résultats est donnée en copies/mL. Le variant n'était pas identifié.

- Sondes et amorces utilisées

Amorces et sondes	Séquences
HHV6-sens	5' GAC AAT CAC ATG CCT GGA TAA TG 3'
HHV6-anti-sens	5' TGT AAG CGT GTG GTA ATG GAC TAA 3'
HHV6-sonde	5'-FAM-AGC AGC TGG CGA AAA GTG CTG TGC-TAMRA-3'

Tableau 7: Amorces et sonde PCR quantitative HHV-6 Gène U65-66 [Gautheret-Dejean et al., 2002]

- Protocole pour la PCR HHV-6 [Gautheret-Dejean et al., 2002]

Réactif	Quantité pour un tube
Taq Man® PCR Master mix	25 µl
HHV6-sens 10 µM	1 µl
HHV6-antisens 10 µM	1 µl
Sonde Taq Man 10 µM	0,50 µl
Eau qsp 40 µl	12,5 µl
ADN	10 µl
Total	50 µl

Tableau 8: Composition du mix pour la PCR HHV-6 [Gautheret-Dejean et al., 2002]

- Conditions PCR

Thermocycleur ABI PRISM® 7000 SDS

Incubation : 2 min à 50°C

Dénaturation : 10 min à 95°C

PCR 45 cycles

Un cycle : 15 sec à 95°C

1 min à 60°C

II.2.2.3 Après 2006

Depuis 2006, le laboratoire de virologie utilise la PCR quantitative en temps réel du laboratoire Argene CMV HHV6,7,8 R-gene™. Elle permet de quantifier le génome de l'HHV-6 dans le sang total, le plasma, le sérum et le LCR. L'extraction de l'ADN a été faite de façon manuelle ou automatisée comme vu au chapitre précédent. L'amplification a été faite sur un thermocycleur Rotor-Gene 6000®. La limite de détection est inférieure à 250 copies/mL. Le seuil de quantification est fixé à 2500 copies/mL et la gamme de quantification va jusqu'à 10^7 copies/mL.

II.2.3. PCR albumine

Neuf patients présentant une cinétique de charges virales HHV-6 positives ont été sélectionnés pour être quantifiés en PCR albumine. Le but de cette PCR étant de quantifier le nombre de cellules afin de rapporter la charge virale HHV-6 au nombre de cellules.

II.2.3.1 PCR albumine [Gautheret-Dejean et al., 2002]

L'ADN a été extrait selon le protocole d'extraction décrit dans la partie matériels et méthodes. Le protocole utilisé ici est celui décrit par Agnès Gautheret-Dejean dans *Journal of Virological Methods* [Gautheret-Dejean et al., 2002]. Il s'agit d'une PCR Taq Man en temps réel.

- Sondes et amorce utilisées

Les amorces et sondes utilisées pour amplifiées le gène de l'albumine ont été fournies par Agnès Gautheret-Dejean du laboratoire de Virologie de la Pitié-Salpêtrière et décrites auparavant par Ingrid Laurendeau du laboratoire de Génétique Moléculaire de la faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques Paris V [Laurendeau et al., 1999].

Amorces et sondes	Séquences
Alb-sens	5' GCT GTC ATC TCT TGT GGG GTG T 3'
Alb-antisens	5' ACT CAT GGG AGC TGC TGG TTC 3'
Alb-sonde	5'-FAM-CCT GTC ATG CCC ACA CAA ATC TCT CC-TAMRA-3'

Tableau 9: Amorces et sonde *ALB* gene pour PCR albumine (Gautheret-Dejean et al., 2002)

- Protocole de PCR albumine

Réactif	Quantité pour un tube
Taq Man® PCR Master mix	25 µl
Albumine sens 10 µM	1 µl
Albumine antisens 10 µM	1 µl
Sonde albumine 10µM	0,5 µl
Eau qsp 40µl	12,5 µl
ADN	10 µl
Total	50 µl

Tableau 10: Composition du mix de PCR albumine (Laurendeau et al., 1999)

- Conditions PCR

Thermocycleur ABI PRISM® 7000 SDS

Incubation : 2 min à 50°C

Dénaturation : 10 min à 95°C

PCR 45 cycles

Un cycle : 15 sec à 95°C

1 min à 65°C

II.2.3.2 Gamme de quantification

La gamme de quantification a été établie à partir de dilutions d'ADN génomique humain (Human Genomic DNA® Roche 0,2 mg/mL). En tenant compte des données des travaux de Laurendeau et al. (1999) sur les facteurs de conversion entre quantité d'ADN et génome diploïde [Laurendeau et al., 1999], notre solution initiale est à $6,06 \cdot 10^{10}$ génome équivalent copie (gec) d'albumine/mL. Le génome équivalent copie (gec) correspond en fait au nombre d'exemplaires du gène présents.

La gamme de dilution a été faite en fonction des valeurs normales des leucocytes dans le sang: $4 \cdot 10^6$ - $1 \cdot 10^7$ cellules/mL ce qui correspond à $8 \cdot 10^6$ - $2 \cdot 10^7$ gec albumine/mL en estimant qu'il y a deux copies du gène albumine par cellule [Laurendeau et al., 1999]. La gamme a donc été établie entre 10^5 et 10^8 gec albumine/mL.

Dilutions	Pur	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
Volume ADN (μ l)	50	50	50	50	50	50
Volume eau (μ l)	0	450	450	450	450	450
gec alb/ml	$6,06 \cdot 10^{10}$	$6,06 \cdot 10^9$	$6,06 \cdot 10^8$	$6,06 \cdot 10^7$	$6,06 \cdot 10^6$	$6,06 \cdot 10^5$

Tableau 11: Dilution gamme d'étalonnage PCR albumine

II.2.3.3 Expression des résultats

II.2.3.3.a) Charge virale en copies/mL

Les résultats de la PCR HHV-6 des échantillons de sang ont été rendus en copies/mL lorsque la charge virale était quantifiable (≥ 2500 copies/mL); les résultats < 2500 copies/mL mais supérieurs au seuil de détection sont rendus détectable.

Le résultat de la PCR HHV-6 sur le prélèvement capillaire a été rendu de manière qualitative en détectable ou non détectable.

Les résultats de la PCR albumine sont rendus en gec d'albumine/mL.

II.2.3.3.b) Charge virale HHV-6 exprimée en copies/ 10^6 cellules

Les charges virales HHV-6 en copies/mL ont été rapportées au nombre de cellules. Le nombre de cellules est calculé à partir des résultats de la PCR albumine. Selon Laurendeau [Laurendeau et al., 1999], il y a deux copies du gène de l'albumine par cellules. Pour avoir le nombre de cellules, il faut donc diviser les résultats de PCR albumine exprimés en gec/mL, par deux pour obtenir le nombre de cellules par millilitre. La charge virale en copies/ 10^6 cellules est donc donnée par l'opération suivante :

$$\text{Copies}/10^6 \text{ cellules} = [\text{HHV-6 copies/mL}] / [(\text{albumine en gec/mL})/2] \times 10^6$$

II.2.4. Analyses

Les incidences en fonction des techniques PCR utilisées seront évaluées. L'influence de certains facteurs (cordon, âge) sur l'intensité des charges virales ainsi que l'impact de l'intensité de ces charges sur les symptômes cliniques, seront appréciés. Puis à partir des données de charges virales en copies/mL et en copies/cellules obtenues, nous analyserons certains profils virologiques de la cohorte correspondant aux situations de réactivation virale et d'intégration génomique.

III. Résultats

III.1. Etude de cohorte

La population de la cohorte a été divisée en fonction de son statut HHV-6, tous les patients ayant eu une charge virale positive dans les 150 jours suivant la greffe ont été placés dans le sous-groupe des HHV-6+, les autres dans le sous-groupe des HHV-6-. Les patients pour lesquels l'intégration de l'HHV-6 est suspectée ont été exclus des analyses statistiques en raison de la présence permanente du génome dans les cellules du sang, ou de l'organisme, indifféremment des caractéristiques ou facteurs de risques associés. Cette population (n=3) sera évoquée dans le chapitre suivant. Une fois divisés, les effectifs HHV-6+ et HHV-6- représentent respectivement n=57 et n=330

III.1.1. Description de la cohorte

L'étude a porté sur 236 (60,5%) allogreffes d'enfants et 154 (39,5%) allogreffes d'adultes, l'âge médian étant de 23,7 ans. Les patients étaient atteints d'hémopathies malignes n=332 (85,1%), surtout des leucémies aigues LAM et LAL n=215 (64,8%) ou chroniques LMC, LMMC, LLC n=40 (12,1%), quelques syndromes myélodysplasiques et myéloprolifératifs n=34 (10,2%), quelques lymphomes n=36 (10,8%), lymphomes du manteau, LNH et maladies de Hodgkin, ainsi que des myélomes multiples n=7 (2,1%). Les diagnostics initiaux d'hémopathies non malignes n=24 (6,2%) comportaient surtout des aplasies médullaires idiopathiques n=15 (62,5%), des anémies de Fanconi n=6 (25,0%), des cas de drépanocytose n=2 (8,3%), une lymphohistiocytose primitive n=1 (4,2%). Certains patients atteints de tumeurs solides ont également été allogreffés n=26 (6,7%).

La plupart des greffons étaient des moelles ou des cellules souches périphériques n=325 (83,9%). Les greffons placentaires ont représenté 16,1% (n=62) des greffons. La parenté du greffon était présente dans 49,1% (n=191) des cas.

Le conditionnement s'est avéré myéloablatif dans 52,7% (n=204) des cas. Le détail des conditionnements myéloablats et atténués est fourni dans le tableau 12.

Les prophylaxies GVHD se sont basées sur les associations CsA+MTX n=175 (44,9%), CsA+Cell n=138 (35,4%), CsA+Méthylprednisolone n=37 (9,5%). La CsA a été utilisée seule dans 24 cas (6,1%) et le MTX seul dans dix cas (2,6%); deux patients (0,5%) n'ont pas eu de prophylaxie. Les patients ayant bénéficié de SAL n=229 (59,9%), ont eu surtout du Frésenius n=148 (38,5%).

Les sorties d'aplasie se sont déroulées dans des délais inférieurs à 30 jours pour 82,4% des patients (n=243), et les sorties de thrombopénie dans des délais inférieurs à 45 jours pour 88,3% des patients (n=212).

Pour la GVHA, 58,5% ont fait une GVHA ≥ 2 (n=223).

La mortalité s'élève à 46,8% (n=181), dans des délais aléatoires allant de 1 à 2993 jours après la greffe avec un délai médian de 185 jours.

Tableau 12: Conditionnements et effectifs

Conditionnements myéloablatifs			
Avec ICT		Sans ICT	
ICT ¹² /Cy ¹²⁰	81	Cy ²⁰⁰ /BU ou BU*	52
ICT ¹² /Cy ¹²⁰ /platine	1	Cy ²⁰⁰ /BU ou BU*/Fluda ¹⁵⁰	2
ICT ¹² /Cy ¹²⁰ /VP16	1	Cy ²⁰⁰ /BU ¹⁶ /Thiotepa ¹⁰	1
ICT ¹² /Mel ¹⁴⁰ /Arac ¹²	18	Cy ¹²⁰ /BU ^{*12-17}	3
ICT ¹² /Mel ¹⁴⁰	6	Cy ¹²⁰ /BU ^{*12-17} /Fluda ¹⁶⁰	1
ICT ¹² /Mel ¹⁴⁰ /Thiotepa ¹⁰	3	Cy ¹²⁰ /BU ¹⁰⁻¹⁶	1
ICT ¹² /VP16	4	Cy ¹²⁰ /BU ¹⁰⁻¹⁶ /Fluda ¹⁵⁰	1
ICT ¹² /VP16/Fluda ¹⁶⁰	2	Cy ¹²⁰ /BU ¹⁶⁻²¹ /Mel ¹⁴⁰	5
ICT ^{7,5-12} /Thiotepa ¹⁰ /Fluda ²⁰⁰	2	Cy ¹²⁰ /BU ^{*16-19} /Mel ¹⁴⁰	5
ICT ¹² /Arac ¹²	1	Cy ²⁰ /BU ⁵ /Fluda ¹⁸⁰	1
ICT ¹² /Fluda ⁹⁰	1		
Total	123	Total	72
Total=195			

Conditionnements atténusés			
Avec fludarabine		Sans fludarabine	
Mel ¹⁴⁰ /Fluda ¹²⁵	74	Cy ¹²⁰ /ICT ⁴	9
Mel ¹⁴⁰ /ICT ² /Fluda ²⁰⁰	8	Cy ⁶⁰ /ICT ⁶	7
Mel ¹⁴⁰ /ICT ² /Fluda ¹⁴⁰	1	ICT ⁶ /Cy ⁶⁰	1
Mel ⁷⁰ /ICT ² /Fluda ¹⁴⁰	1	Cy ¹²⁰ /BU*	4
ICT ² /Fluda ⁹⁰	22	Mel ¹⁴⁰ /BU ²⁰ /Arac ¹²	1
BU ^{*3,2-9,6} /Fluda ¹²⁰⁻¹⁸⁰	13	Cy ¹²⁰ /BU	2
Cy ⁴⁰ /ICT ^{4,5} /Fluda ¹⁵⁰	3	Cy ²⁰⁰ /ICT ²	3
Cy ⁵⁰ /ICT ² /Fluda ²⁰⁰	1	Cy ⁶⁰ /ICT ² /Fluda ²⁰⁰	1
Cy ¹²⁰ /Fluda ¹²⁵	4	ICT ² /Fluda ⁶⁰	1
Cy ⁶⁰ /Fluda ¹²⁰	2	ICT ²	1
Cy ²⁰⁰ /ICT ² /Fluda ¹⁵⁰	2	Cy ²⁰⁰	4
BU ⁴⁻⁸ /Fluda ¹²⁰⁻¹²⁵	11	BU ^{*12,8}	2
Fluda ¹²⁵ /Arac ¹⁰	1	Cy ⁸⁰ /ICT ⁴	1
ICT ⁶ /Cy ⁶⁰ /Fluda ²⁰⁰	1		
ICT ^{4,5} /Cy ⁴⁰ /Fluda ¹⁵⁰	1		
Total	145	Total	37
Total=182			

ICT²=irradiation corporelle totale (2 grays), Cy²⁰⁰=cyclophosphamide (200 mg/Kg), Bu¹⁶=busulfan (16 mg/Kg), Fluda¹⁵⁰=fludarabine (150 mg/Kg), Mel¹⁴⁰=melphalan (140 mg/m²), VP16=étoposide, AraC¹²=aracytine (12 mg/Kg), Thiotepa¹⁰=thiotépa (10 mg/Kg)

Tableau 13: Caractéristiques des patients de la cohorte

Caractéristiques		Effectifs N=390	%
Age (médiane, années)		23,7 (0,3-64,4)	
Sexe M/F		237/153	60,8/39,2
Diagnostic	Hémopathies malignes	332	85,1
	Hémopathies non malignes	24	6,2
	Tumeurs solides	26	6,7
	Autres	8	2
Allotype donneur	Apparenté	191	49,1
	Non apparenté (Moelle + CSP)	136	35
	Sang placentaire	62	15,9
Greffon	Moelle	206	53,2
	CSP	117	30,2
	Sang placentaire	62	16,1
	Moelle + CSP	2	0,5
Conditionnements	Myéloablatis	204	52,7
	Atténus	183	47,3
Prophylaxie GVHD	CsA+MTX	175	44,9
	CsA+Cellcept	138	35,4

Caractéristiques		Effectifs N=390	%
Prophylaxie GVHD (suite)	CsA + Méthylprednisolone	37	9,5
	CsA	24	6,1
	MTX	10	2,6
	Déplétion lymphocytes T <i>ex vivo</i> +/- MTX, CsA, SAL	4	1
	Pas de prophylaxie	2	0,5
SAL	Thymoglobulines	79	20,5
	Frésenius®	148	38,5
	Campath®	2	0,5
	Absence	156	40,5
Délai sortie d'aplasie	<30 jours	243	82,4
	31-45 jours	40	13,6
	>45 jours	12	4
Délai plaquettes >20 G/L	<45 jours	212	88,3
	45-100 jours	24	10
	>100 jours	4	1,7
Incidence GVHA	Stades 0-1	158	40,5
	Stades ≥2	223	58,5
Décès	Oui	181	46,8
	Non	206	53,2

III.1.2. Incidence et délai de la réactivation HHV-6

57 personnes ont fait une réactivation à HHV-6 sur un effectif de 387 personnes en excluant les trois personnes où le génome de l'HHV-6 est suspecté intégré. Le taux d'incidence s'élève à 14,7% à 150 jours en post-greffe (Figure 11).

Le nombre d'événements se répartie de la façon suivante: trois événements (5,3%) entre J4 et J7, 40 événements (70,2%) entre J10 et J44, huit événements (14%) entre J49 et J81, rien entre J81 et J132, et cinq événements (10,5%) entre J132 et J150.

L'incidence observée dans la population <18 ans, s'élève à 18,3% (28/153). La répartition des événements est sensiblement identique à celle de la cohorte.

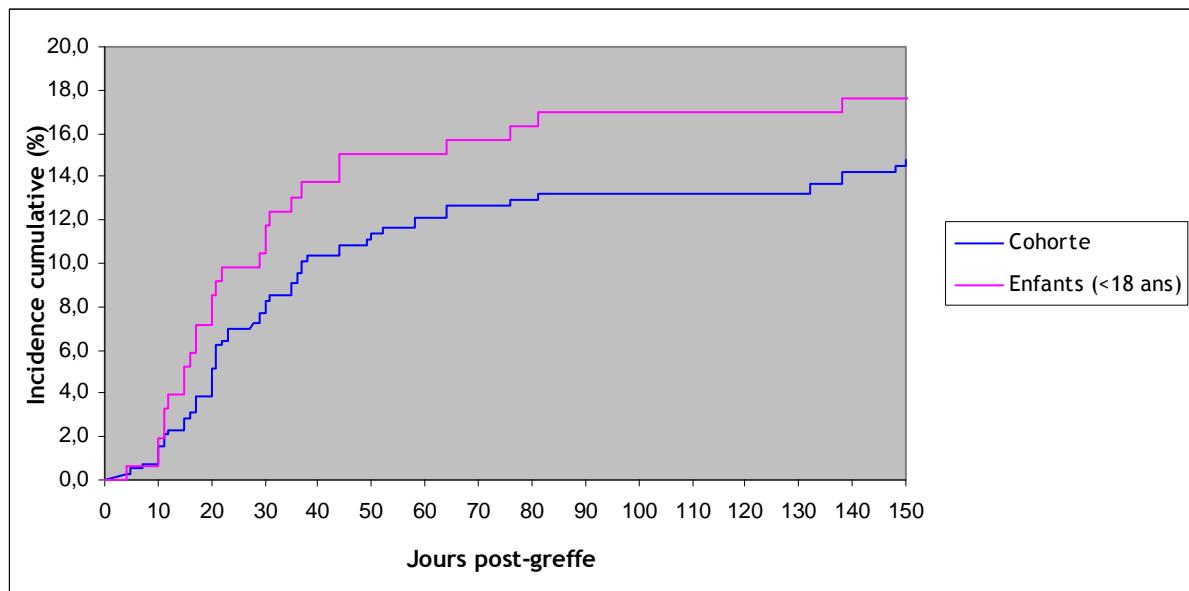


Figure 11: Incidence cumulative de l'HHV-6 sur 150 jours post-greffe

III.1.3. Facteurs associés à la survenue d'une réactivation HHV-6

Les deux populations HHV-6+ et HHV-6- ont été comparées afin de définir d'éventuels facteurs de risques de la réactivation HHV-6 en post-greffe de CSH. Les résultats obtenus en analyse univariée sont présentés dans le Tableau 16.

Tableau 14: Facteurs associés à la réactivation HHV-6

	Patients HHV-6 -			Patients HHV-6 +			p**
	N	%/moy	ET*	N	%/moy	ET*	
Age	326	26,6	18,1	57	23,4	16,5	NS
Sexe							
Homme	198	60,0		39	68,4		NS
Femme	132	40,0		18	31,6		
Diagnostic initial							
Hémopathie maligne	281	85,2		48	84,2		NS
Hémopathie non maligne	21	6,4		3	5,3		
Tumeurs solides	20	6,1		6	10,5		
Autres	8	2,4		.			
Greffon							
Moëlle	182	55,7		24	42,1		
CSP	107	32,7		7	12,3		
Cordon	36	11,0		26	45,6		<0,0001
Moëlle et CSP	2	0,6		.			
Allotype du donneur							
Apparenté	170	51,7		21	36,8		
Non apparenté (moelle+CSP)	123	37,4		10	17,5		
Non apparenté (cordon)	36	10,9		26	45,6		<0,0001
Conditionnement							
attenué	160	48,9		20	35,1		
myéloablatif	167	51,1		37	64,9		0,0533
Sérum anti-lymphocytaire							
Thyroglobuline	65	19,9		14	25		
Fresenius	127	39,0		19	33,9		NS
Absence	132	40,5		23	41,1		
Campath	2	0,6		.			
Prophylaxie de la réaction du greffon contre l'hôte							
CsA+MTX	156	47,2		19	33,3		
CsA+Cell	117	35,5		18	31,5		
CsA+Méthylprednisolone	22	6,7		15	26,3		0,0093
MTX	9	2,7		1	0,2		
CsA	20	6,1		4	0,7		
GVH aiguë							
Stades 0 et 1	142	44,1		15	26,8		
Stades ≥2	180	55,9		41	73,2		0,0152

* Ecart Type

** Test du Chi-2 ou test exact de Fisher pour variables qualitatives, test issu d'un test de Student pour les variables quantitatives

NS Non Significatif (p>0,05)

Les résultats nous montrent que les proportions de greffons de type de cordon et de GVHA ≥ 2 sont plus importantes chez les patients qui ont réactivé l'HHV-6 que chez ceux qui ne l'ont pas réactivé (26 (45,6%) vs 36 (11,0%), p< 0,0001 pour les greffons de cordon; 41 (73,2%) vs 180 (55,9%), p= 0,0152 pour les GVHA ≥ 2).

De plus, les proportions de greffes de cordon non apparentée et de prophylaxie GVHD par CsA+Méthylprednisolone sont plus importantes au sein de la population qui a réactivé l'HHV-6 (26 (45,6%) vs 36 (10,9%), p< 0,0001 pour les greffes de cordon non apparentées; 15 (26,3%) vs 22 (6,7%), p=0,0093 pour la prophylaxie GVHD par CsA+Méthylprednisolone). Hors cette prophylaxie GVHD par CsA+Méthylprednisolone n'est donnée que dans les greffes de cordon. Ceci ne fait que donc que confirmer le lien déjà établi entre la réactivation HHV-6 et le greffon de type cordon.

La différence de proportion de conditionnements myéloablatis observée entre les patients réactivant l'HHV-6 et ceux ne le réactivant pas n'est pas statistiquement significative (37 (64,7%) vs 167 (51,1%), p= 0,0533 (NS)).

Pour le reste, les patients présentant une réactivation HHV-6 ne sont pas plus âgés que ceux ne réactivant pas ($23,4 \pm 16,5$ vs $26,6 \pm 18,1$ ans, p= NS), et il y a proportionnellement autant d'hémopathies malignes et de patients ayant pris du SAL de type Frésenius[©] dans les populations réactivant ou pas l'HHV-6 (48 (84,2%) vs 281 (85,2%), p= NS pour les hémopathies malignes; 19 (33,9%) vs 127 (39,0%), p= NS pour la prise de Frésenius[©].

Les incidences de réactivation HHV-6 ont été étudiées au sein des facteurs statistiquement associés (Figure 12). Ainsi, on observe que 41,9% (26/62) des patients ayant eu un greffon de type cordon réactive leur HHV-6 contre 11,7% (24/204) pour les moelles et 6,1% (7/114) pour les CSP. Les incidences augmentent également en fonction du stade de GVHA, 9,6% (15/157) pour les stades 0 et 1, 17,9% (32/179) pour le stade 2 et 21,4% (9/42) pour les stades ≥ 3 .

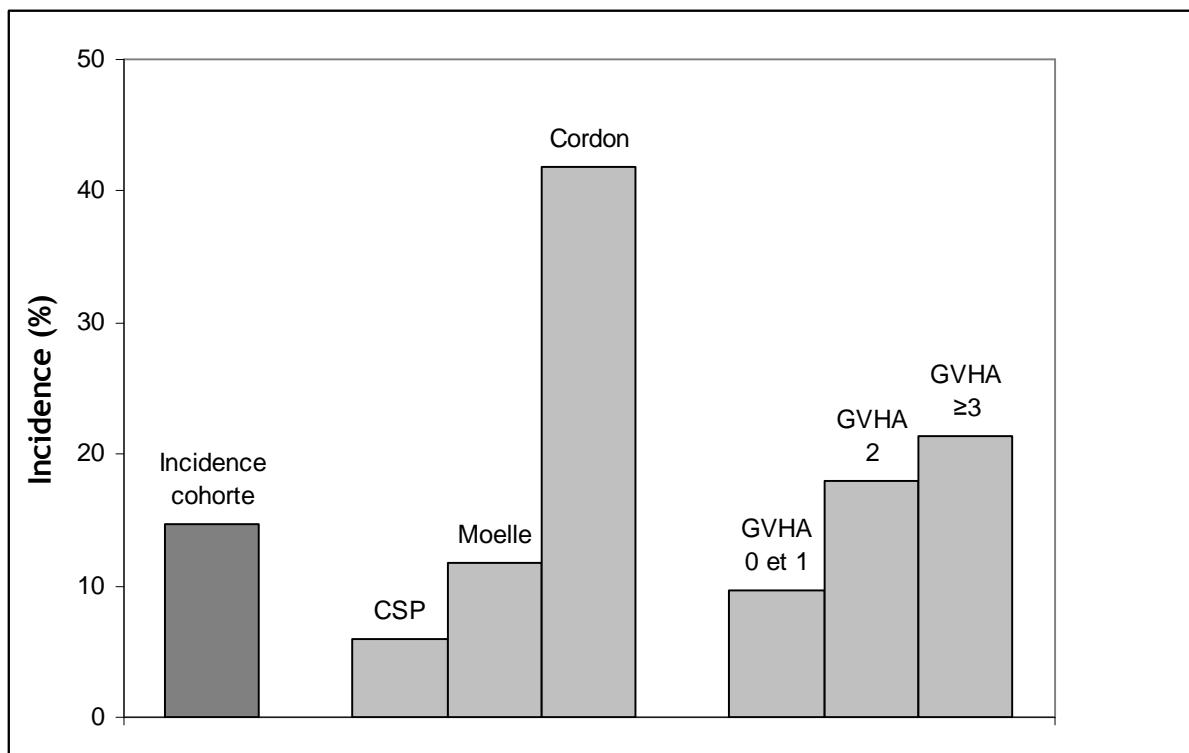


Figure 12: Incidence de la réactivation HHV-6 en fonction du greffon et du stade de GVHA

III.1.4. Co-infections

La problématique posée ici est de savoir si la réactivation HHV-6 favoriserait d'autres infections concomitantes ou vice versa. Les données fournies dans ce tableau répertorient les infections virales, bactériennes, fongiques et toxoplasmiques dans les populations HHV-6+ et HHV-6- dans un délai de 150 jours suivant la greffe, ce délai étant identique au délai de considération de la population HHV-6+. Ont été testé en parallèle, les facteurs pouvant favoriser les co-infections : délai de sortie d'aplasie, GVHA ≥ 2 .

Tableau 15: Co-infections HHV-6 et autres agents infectieux

	Patients HHV-6 -			Patients HHV-6 +			p**
	N	%/moy	ET*	N	%/moy	ET*	
Cytomégalovirus							
oui	70	22,3		13	23,2		NS
Epstein Barr virus							
oui	33	10,3		5	8,9		NS
Adénovirus							
oui	45	14,1		14	25,5		0,033
Virus Herpes simplex							
oui	11	3,4		4	7,1		NS
Virus du zona et de la varicelle							
oui	3	0,9		1	1,8		NS
Virus respiratoires							
oui	19	5,9		6	10,7		NS
Mycose							
oui	85	26,2		6	10,7		0,012
Septicémie							
oui	40	12,4		20	35,7		<0,0001
Toxoplasmose							
oui	2	0,9		2	4,2		NS
Au moins une infection							
oui	198	60		40	71,4		NS
GVH aiguë grade ≥2							
oui	180	55,9		41	73,2		0,0152
Délai de sortie d'aplasie							
médiane							
(jours)	247	24,1	13,5	44	29,5	15,4	0,017

* Ecart Type

** Test du Chi-2 ou test exact de Fisher pour variables qualitatives, test issu d'un test de Student pour les variables

quantitatives

NS Non Significatif (p>0,05)

Les patients ayant réactivé l'HHV-6 présente proportionnellement plus d'infections à adénovirus et de septicémies que ceux qui n'ont pas réactivé (14 (25,5%) vs 45 (14,1%), p= 0,033 pour les adénovirus; 20 (35,7%) vs 40 (12,4%), p< 0,0001 pour les septicémies. Une fois ajustés sur les variables GVHA et délai de sortie d'aplasie, le lien avec les adénovirus n'est plus retrouvé (OR= 1.560 CI [0.685-3.556], p= NS), celui avec les septicémies est conservé (OR= 3.457 CI [1.635-7.311], p=0.001).

La proportion d'infections mycosiques est moins importante chez les patients ayant réactivé leur HHV-6 que chez ceux qui ne l'ont pas réactivé (6 (10,7%) vs 85 (26,2%), p= 0,012).

Pour les autres infections, il n'y a pas de différence significative de répartition entre les deux groupes et notamment pour le CMV (13 (23,2%) vs 70 (22,3%), p= NS).

III.1.5. Manifestations cliniques associées à l'HHV-6

La majorité des réactivations sont restées asymptomatiques ou supposées asymptomatiques 65% (37/57) indépendamment de la stratégie préemptive. 31 cas étaient cliniquement totalement asymptomatiques malgré des ADNémies persistantes et la découverte d'ADN HHV-6 dans les biopsies intestinales de huit patients et des biopsies pulmonaires de deux patients. Les signes cliniques (fièvre) de cinq autres cas se sont avérés documentés par d'autres agents infectieux.

Dans les formes symptomatiques 35% (20/57) (Tableau 16), deux encéphalites à HHV-6 ont été avérées et documentées par la détection de l'ADN HHV-6 dans le LCR et dans le sang total. Un autre cas d'encéphalite HHV-6 a été suspecté face à la présence concomitante d'une ADNémie HHV-6 et d'un syndrome confusionnel. Il a ensuite été écarté devant l'absence d'autres arguments. L'HHV-6 a également été impliqué dans des cytopénies (n=8), dont deux peu probables, se manifestant par des pancytopenies persistantes (n=6) et donc des retards de sortie d'aplasie, ainsi que par une bi-cytopénie persistante associant lymphopénie et thrombopénie, et dans une thrombopénie seule persistante. Ces implications étant basées sur la présence d'ADNémie HHV-6 concomitante avec ces cytopénies sans autres agents infectieux documentés. Les deux cytopénies dont la liaison avec l'HHV-6 a été jugée peu probable, présentaient par ailleurs de l'ADNémie CMV. Trois fièvres non documentées sans GVHA sont concordantes avec la présence d'ADNémie HHV-6. L'implication dans le retard de prise du greffon et dans la sévérité des GVHD a été évoquée à cinq reprises. Enfin il a été signalé la présence d'HHV-6 dans des biopsies de l'appareil digestif haut comme bas, chez neuf patients qui par ailleurs avaient présentés une ADNémie HHV-6. L'implication clinique a été suspectée que dans un cas d'œsophagite. Pour ce qui est de l'implication dans les rashes cutanés, il a été difficile de faire la distinction entre GVHD et réactivation symptomatique de l'HHV-6. Un cas a été rapporté devant la persistance et l'extension d'un rash cutané concomitant avec une ADNémie HHV-6 persistante sous traitement antiviral.

L'analyse statistique de l'association entre la réactivation HHV-6, les retards de sortie d'aplasie et les retards de sortie de thrombopénie (Tableau 17) nous montre que les délais médians de sortie d'aplasie (polynucléaires >0,5 G/L), de sorties de thrombopénie (plaquettes >20 G/L et >50 G/L) en jours post-greffe sont plus longs au sein de la population HHV-6+ que dans la population HHV-6- ($29,5 \pm 15,4$ vs $24,1 \pm 13,5$, $p= 0,0170$ pour les sorties d'aplasie; $69,0 \pm 140,6$ vs $25,7 \pm 17,4$, $p= 0,0004$ pour les plaquettes >20 G/L; $67,1 \pm 128,0$ vs $33,0 \pm 27,3$, $p= 0,011$ pour les plaquettes >50 G/L). Une fois ajusté sur les variables GVHA ≥ 2 et présence au minimum d'une infection, les liens avec l'allongement des sorties d'aplasie et de thrombopénie >50 G/L sont conservés (OR=1,931 CI [1,078-3,457], $p=0,027$ pour les sorties d'aplasie; OR=2,64 CI [1,14-5,49], $p=0,26$ pour les plaquettes >50 G/L).

L'analyse statistique de l'association entre la réactivation HHV-6 et la sévérité des GVHA (stades ≥ 3) (Tableau 17) nous montre que la proportion de GVHA ≥ 3 est plus importante dans la population HHV-6+ que dans la population HHV-6- (9 (16,1%) vs 33 (10,2%), $p= 0,0444$).

Tableau 16. Manifestations cliniques associées à la réactivation de l'HHV-6

	Suspicion HHV-6			Total			
	$N=22$						
	Avérée	Forte	Peu probable				
	N	N	N	N	%		
Encéphalite/SNC							
	2	.	1	3	13,6		
Cytopénies							
	.	6	2	8	36,4		
Rash cutané							
	.	.	1	1	4,5		
Fièvre							
	.	3	1	4	18,2		
Œsophagite							
	.	1	.	1	4,5		
Retard prise greffon							
	.	.	1	1	4,5		
GVHD sévère							
	.	.	4	4	18,2		

Tableau 17: Influence de l'infection à HHV-6 sur la reconstitution hématologique et sur la sévérité de la GVHA

	Patients HHV-6-			Patients HHV-6+			p**
	N	%/moy	ET*	N	%/moy	ET*	
Polynucléaires >0,5 G/L							
Médiane (jours)	247	24,1	13,5	44	29,5	15,4	0,017
Plaquettes >20 G/L							
Médiane (jours)	197	25,7	17,4	36	69	140,6	0,0004
Plaquettes >50 G/L							
Médiane (jours)	180	33	27,3	35	67,1	128	0,0011
GVHA							
Stades 0; 1	142	44,1		15	26,8		
Stades 2	147	45,7		32	57,1		
Stades ≥ 3	33	10,2		9	16,1		0,0444

* Ecart Type

** Test du Chi-2 ou test exact de Fisher pour variables qualitatives, test issu d'un test de Student pour les variables quantitatives

NS Non Significatif (p>0,05)

III.1.6. HHV-6 et mortalité

III.1.6.1 Survie cumulée et facteurs associés au décès

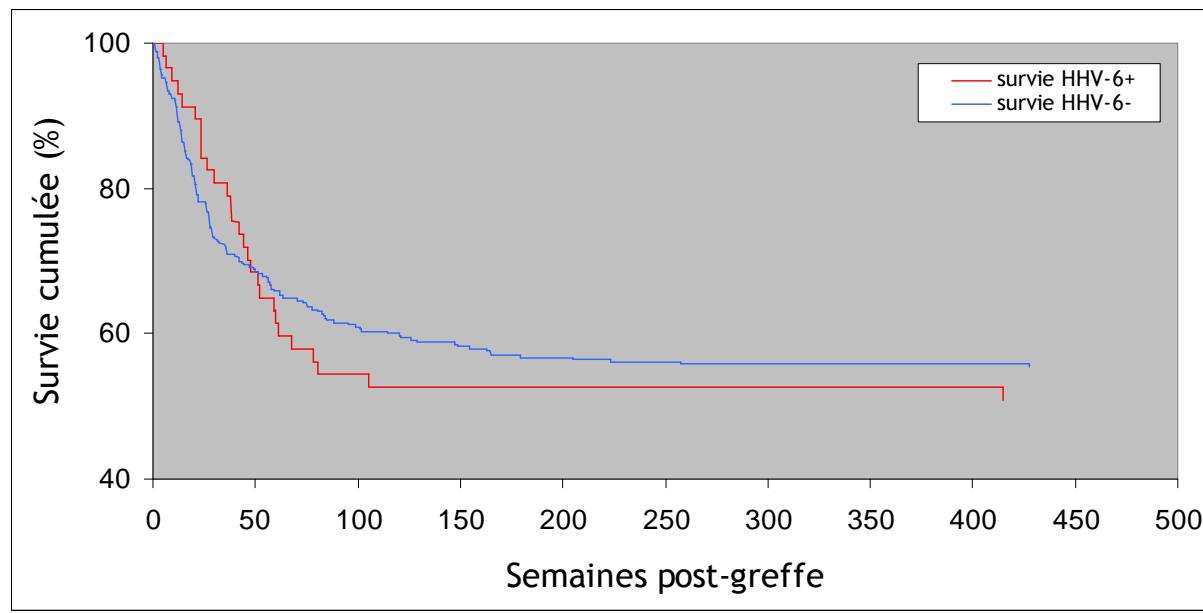


Figure 13: Survie cumulée en Kaplan Meier en fonction du statut HHV-6

La proportion de survivants dans la cohorte est de 54,5% (n=203) au bout de la 500^{ème} semaine post-transplantation, elle est de 47,4% (n=27) au sein de la population HHV-6+ et de 53,3% (n=176) au sein de la population HHV-6-. Pour la population HHV-6+, les décès (n=26/29 (89,7%)) sont concentrés sur les 105 semaines qui suivent la greffe avant de se stabiliser. Pour la population HHV-6-, les décès sont plus étalés dans le temps, il faut 179 semaines post-greffe pour atteindre la même proportion de décès (n=143/152 (94,1%)).

Les facteurs associés au décès ont été analysés dans le tableau 18.

La proportion d'infections HHV-6 n'est pas plus importante chez les patients qui sont décédés que chez ceux qui ne le sont pas (29 (16,4%) vs 27 (13,3%), p= NS).

Les facteurs dont les proportions sont significativement plus importantes au sein de la population décédée par rapport à celle qui ne l'est pas, sont: les hémopathies malignes (161 (89,0%**) vs 165 (81,3%), p= 0,0241), les infections mycosiques (56 (30,9%) vs 35 (17,6%), p= 0,0023), la toxoplasmose (4 (3,3%) vs 0, p= 0,032), la présence d'au moins une infection (121 (66,9%) vs 117 (57,6%), p= 0,063), la présence d'un GVHA (135 (75,0%) vs 127 (64,1%), p= 0,0222).

Tableau 18: Facteurs associés au décès

	Décès						p**	
	Non N=203			Oui N=181				
	N	%/moy	ET*	N	%/moy	ET*		
Age	203	22,5	17,5	181	29,7	17,2	<0,0001	
Diagnostic								
Hémopathies malignes	165	81,3		161	89		0,0241	
Hémopathies non malignes	19	9,4		5	2,8			
Autres	19	9,4		15	8,3			
HHV-6								
oui	27	13,3		29	16,4		NS	
CMV								
oui	43	21,9		40	23		NS	
EBV								
oui	18	9,1		20	11,2		NS	
Adénovirus								
oui	27	13,6		32	18,3		NS	
HSV								
oui	6	3,1		9	5		NS	
Zona								
oui	3	1,5		1	0,6		NS	
Virus respiratoire								
oui	12	6,1		13	7,3		NS	
Mycose								
oui	35	17,6		56	30,9		0,0023	
Septicémie								
oui	29	14,6		31	17,4		NS	
Toxoplasmose								
oui	.			4	3,3		0,0332	
Au moins une infection								
oui	117	57,6		121	66,9		0,0633	
GVHA								
oui	129	64,2		135	75		0,0223	

* Ecart Type

** Test du Chi-2 ou test exact de Fisher pour variables qualitatives, test issu d'un test de Student pour les variables quantitatives

NS Non Significatif (p>0,05)

III.1.6.2 Causes du décès

Les causes du décès au sein de la cohorte sont données dans le tableau 19. Les proportions de décès par GVHA, GVHC, infections et pneumopathies interstitielles sont plus

importantes dans la population HHV-6+ décédée que dans la population HHV-6- décédée (14,3% vs 6,2% pour GVHA; 10,7% vs 5,5% pour GVHC; 21,4% vs 13,8% pour infections; 14,3% vs 6,9% pour pneumopathies interstitielles). Cependant, ces différences de proportions n'ont pas été testées statistiquement, afin de ne pas donner de fausse significativité, en raison du manque de données concernant les décès de 31 patients HHV-6-.

Tableau 19: Causes du décès

	Patients HHV-6 - décédés N=176		Patients HHV-6 + décédés N=28	
	N	%/moy	N	%/moy
Maladie veino-occlusive	2	1,4	.	.
Déchéance neurologique	1	0,7	.	.
Déchéance cardiaque	.	.	1	3,6
GVHA	9	6,2	4	14,3
GVHC	8	5,5	3	10,7
Infections	20	13,8	6	21,4
Pneumopathie interstitielle	10	6,9	4	14,3
Microangiopathie	3	2,1	1	3,6
Rejet	5	3,4	.	.
Déchéance hépatique	1	0,7	.	.
Toxicité du conditionnement	2	1,4	.	.
LymphomeB	2	1,4	.	.
Rechute	60	41,4	6	21,4
Cancer secondaire	2	1,4	1	3,6
Déchéance multivicérale	13	9	2	7,1
Autres	7	4,8	.	.
Non renseigné	31			

III.1.7. Efficacité du traitement

- **Efficacité sur l'infection HHV-6**

Tous les patients ayant présenté une réactivation HHV-6 n'ont pas été traités, la stratégie prophylactique de traitement est préemptive. Seuls les patients dont l'imputabilité clinique de l'infection HHV-6 était suspectée ou ceux présentant plusieurs charges virales HHV-6 positives successives, ont bénéficié d'un traitement. Le foscarnet a été donné en première intention, le ganciclovir et le cidofovir étant donnés en fonction de la tolérance, de la fonction rénale et de la présence d'une co-infection virale. Moins d'un patient sur deux a bénéficié d'un traitement (n=27 (47,3%)) (Tableau 20). Ont été inclus dans les patients traités, ceux ayant reçu une de ces trois molécules pour cette indication et ceux ayant reçu une de ces trois molécules pour une autre indication (CMV, adénovirus) pendant une période concomitante à l'infection HHV-6.

Tableau 20: Prévalence des traitements antiviraux au sein de la population HHV-6+

Traitements	
Oui	
N=27	
	N
	%
Foscarnet	
12	44,4
Ganciclovir	
7	25,9
Cidofovir	
5	18,5
Foscarnet+ganciclovir	
2	7,4
Cidofovir+ganciclovir	
1	3,7

Pour les patients traités par foscarnet sur une durée de 14 jours, huit traitements ont été couronnés de succès avec négativation de l'ADNémie, deux patients ont vu leur charge virale diminuer sans pour autant se négativer, deux autres n'ont eu aucun effet du

traitement sur la charge virale HHV-6. Parmi les sept patients traités par ganciclovir, trois traitements ont été couronnés de succès, un n'a eu aucun effet et a été changé par du foscavir, et trois autres ont été difficiles à évaluer car indiqués à l'origine pour le CMV, ils n'ont pas bénéficié d'une durée suffisamment longue de traitement et se sont négativés que tardivement après l'arrêt du ganciclovir. Pour le cidofovir, deux patients ont été traités avec succès, les trois autres traités à la base pour une adénovirose n'ont pas bénéficié d'une durée suffisamment longue pour juger de l'efficacité. Les bithérapies (n=3) ont été efficaces.

- Efficacité sur la mortalité

Nous avons testé l'impact du traitement de la réactivation HHV-6 sur la mortalité de la population HHV-6+ (Tableau 21). La proportion de patients traités n'est pas plus importante chez les patients HHV-6+ décédés que chez les HHV-6+non traités (15 (51,7%) vs 13 (46,4%)).

Tableau 21: Effet du traitement anti-HHV-6 sur la mortalité

	Décès					
	Non		Oui		N=203	N=181
	N	%/moy	N	%/moy		
HHV-6						
oui	27	13,3	29	16,4		NS
Traitement anti-HHV-6						
oui	13	46,4	15	51,7		NS

III.1.8. Conclusion

Sur cette cohorte de 390 patients allogreffés de CSH sur une période de dix ans, l'incidence des réactivations HHV-6 atteint 15% sur un suivi de 150 jours post-greffe. La majorité ayant été considéré comme asymptomatique (65%), les répercussions cliniques de ces réactivations ont été difficiles à mettre en évidence. Deux cas avérés d'encéphalites et quelques cas de cytopénie, retard de sortie d'aplasie ont été rapportés (n=8), ainsi que trois fièvres non documentées, un rash, quatre GVHD sévère. L'analyse statistique des

facteurs associés à la réactivation HHV-6 a mis en évidence un lien entre la réactivation HHV-6 et le type de greffon et la GVHA. La réactivation HHV-6 augmente significativement le délai de sortie de thrombopénie, le délai de sortie d'aplasie et la sévérité du GVHA. Aucun lien n'est retrouvé avec l'âge, le sexe, la malignité de l'hémopathie, la parenté du donneur, le conditionnement ou la prescription de SAL. Le lien entre la réactivation HHV-6 et d'autres infections a été établi pour les septicémies; en revanche, ce lien n'est pas significatif pour le CMV et les autres virus.

L'impact de la réactivation HHV-6 sur la mortalité n'a pas été établi. Les facteurs associés significativement au décès sont l'âge, la pathologie initiale, les septicémies, les infections fongiques, les GVHA. Auparavant nous avons pu établir un lien significatif entre la réactivation HHV-6 et les septicémies, les GVHA. Enfin, concernant le traitement antiviral des infections HHV-6, si l'efficacité a été établie sur la négativation des ADNémies HHV-6, l'impact sur la survie de la population HHV-6+ n'est pas significatif.

III.2. Diagnostic et suivi virologique des patients HHV-6

Sur les 390 patients allogreffés analysés, 60 ont eu au moins une charge virale positive dans les 150 jours qui ont suivi leur greffe. Une charge virale est considérée comme positive à partir du moment où elle est détectable. Parmi ces 60 patients, 57 ont présenté une réactivation virale classique avec absence de charge virale détectable en pré greffe, apparition d'une charge virale et négativation à plus ou moins long terme, avec ou sans traitement; deux patients ont présenté en post-greffe des charges virales très élevées qui se maintiennent supérieures à 10^6 copies/mL ; une patiente présentait déjà une charge virale supérieure à 10^6 copies/mL en pré-greffe, avant d'observer une diminution de sa charge virale en post-greffe. On observe donc deux types de population selon l'intensité de la charge virale. Une fois la réactivation virale établie analytiquement, reste à distinguer les simples réactivations virologiques des réactivations cliniquement significatives.

III.2.1. Patients ayant présentés une réactivation

III.2.1.1 Incidence de la réactivation HHV-6 par rapport aux techniques de PCR

Sur la période considérée (10 ans), trois PCR différentes ont été utilisées pour le diagnostic des infections à HHV-6. L'incidence des réactivations HHV-6 de 1999 à 2003 avec l'utilisation d'une PCR qualitative classique, s'élève à 7,63% (10/131). Celle entre 2003 et 2006 avec l'utilisation d'une PCR quantitative, s'élève à 21,8% (26/119). Et enfin celle utilisant de la PCR quantitative en temps réel de 2006 à 2008, s'élève à 15,3% (21/137) (Figure 14).

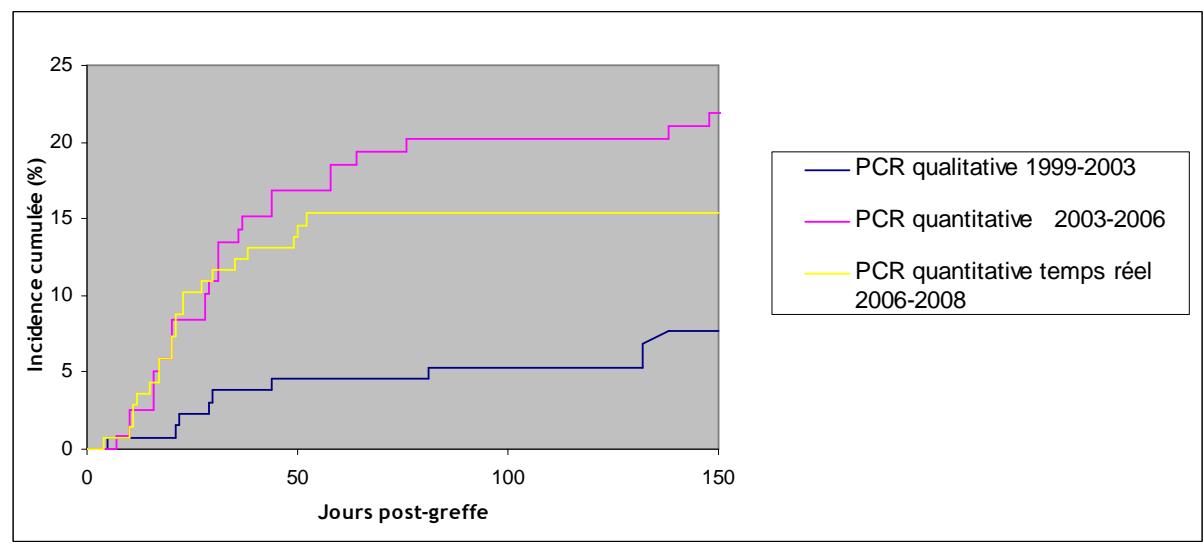


Figure 14: Incidence de la réactivation en fonction de la technique PCR

III.2.1.2 Délai de la réactivation HHV-6

Les délais de réactivation virale s'échelonnent de J4 à J156 (Figure 15). 45,6% des réactivations se déroulent entre deux et quatre semaines après la greffe, 5,3% dans la première semaine, et 49,1% au-delà de quatre semaines dont 22,8% supérieur à sept semaines. Le délai médian se situant à 23 jours après la greffe.

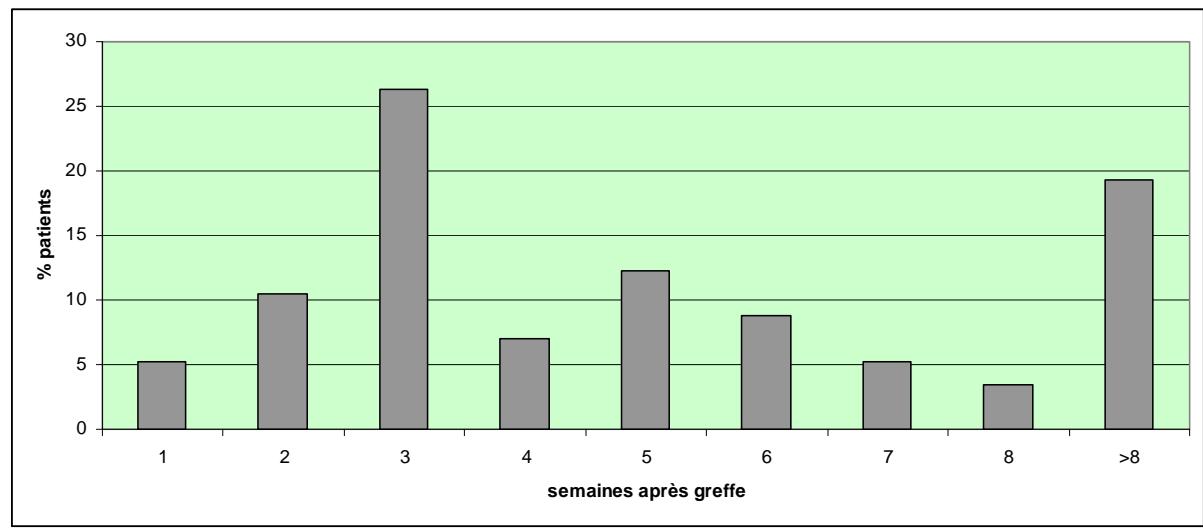


Figure 15: Délai de la réactivation

III.2.1.3 Intensité de la charge virale HHV-6

- Valeurs des charges virales HHV-6

Les charges virales à la première détection ont été à 74,5% (35/47) détectables (>250 copies/mL et <2500 copies/mL). Les 12 autres charges virales (25,5%) ont été quantifiables (≥ 2500 copies/mL), entre 2319 et 174000 copies/mL (médiane à 4769 copies/mL). A noter que les résultats antérieurs à 2003 (n=10) ont été rendus de manière qualitative, leur intensité n'est donc pas évaluable, c'est pourquoi ils n'ont pas été comptabilisés dans le tableau. Pour les pics viraux, 16 (34,0%) ont été quantifiables, de 2312 à 1740000 copies/mL (médiane à 28258 copies/mL) (Tableau 22).

Tableau 22: Intensité de la charge virale au moment de la première détection et au pic

	Effectifs patients N=57			
	1ère charge virale		pic charge virale	
	N	%	N	%
détectable < $2,5 \cdot 10^3$	35	74,5	31	66,0
$2,5 \cdot 10^3$ - $1 \cdot 10^4$	9	19,1	4	8,5
$1 \cdot 10^4$ - $1 \cdot 10^5$	2	4,3	8	17,0
$1 \cdot 10^5$ - $1 \cdot 10^6$	1	2,1	4	8,5
> 10^6	0	0,0	0	0,0

A noter que l'ensemble des réactivations ayant présenté une charge virale quantifiable (≥ 2500 copies/mL) à la première détection, se situe dans des délais ne dépassant pas 50 jours. Pour les réactivations plus tardives (>50 jours), les charges virales n'ont pas dépassé le seuil de quantification, se situant entre le seuil de détection (250 copies/mL) et le seuil de quantification (2500 copies/mL).

- Facteurs influençant l'intensité de la charge virale HHV-6

Nous avons étudiés l'influence de facteurs décrits dans la littérature sur l'intensité de la charge virale HHV-6 (Tableau 23). Les receveurs de sang de cordon seraient associés à des réactivations avec des charges virales HHV-6 plus intenses que dans les autres types de greffon [Sashihara et al., 2002, Tanaka et al., 2005, Yamane et al., 2007]. Cette observation n'est pas confirmée ici. En effet, parmi les receveurs de sang de cordon HHV-6+, 23,1% (6/26) ont une charge virale supérieure au seuil de quantification (>2500 copies/mL) contre 25,0%(6/24) chez les receveurs de moelle. Le type de greffon n'a donc pas d'incidence sur l'intensité des charges virales HHV-6.

D'autre part, il a été décrit dans les infections à adénovirus chez les greffés de CSH que le jeune âge est associé à des charges virales de forte intensité [Feuchtinger et al., 2007]. Dans notre étude, il y a 17,9% des patients <18 ans qui ont eu des charges

quantifiables (>2500 copies/mL), contre 24,1% chez les patient >18 ans. La médiane d'âge des patients ayant des charges >2500 copies/mL est de 23,2 ans; celle de la population HHV-6+ entière est de 23,4 ans. Il n'y a donc pas d'influence de l'âge sur l'intensité des charges virales.

Tableau 23: Pourcentage de patients HHV-6+ ayant une charge virale >2500 copies/mL

	Effectifs patients									
	Age		Greffon							
	<18 ans		>18 ans		Moelle		CSP		Cordon	
	N=28	%	N=29	%	N=24	%	N=7	%	N=26	%
1ère charge virale >2500 copies/mL	5	17,9	7	24,1	6	25,0	0	0,0	6	23,1

- Association intensité de la charge virale et signes cliniques

Parmi les patients présentant une charge virale quantifiable (>2500 copies/mL) à la première détection, 16,7% (2/12) ont présenté des signes cliniques. Pour ceux dont la première charge virale est seulement détectable (<2500 copies/mL), 34,3% (12/35) ont présenté des signes cliniques. Il ne semble donc pas qu'il y ait de liaisons entre l'intensité des charges virales à la première détection et la répercussion clinique. Pour les pics de charges virales HHV-6, 18,8% (3/16) sont associés à des signes cliniques lorsque la charge virale est quantifiable et 35,5% (11/31) lorsqu'elles restent seulement détectables.

Tableau 24: Association intensité de la charge virale HHV-6 / signes cliniques

	Effectifs patients							
	1ère charge virale				pic charge virale			
	<2500 copies/mL		>2500 copies/mL		<2500 copies/mL		>2500 copies/mL	
	N=35	%	N=12	%	N=31	%	N=16	%
Symptomatiques	12	34,3	2	16,7	13	22,8	3	25,0
Asymptomatiques	23	65,7	10	83,3	18	54,1	13	75,0

III.2.1.4 Exemples de profils de réactivation

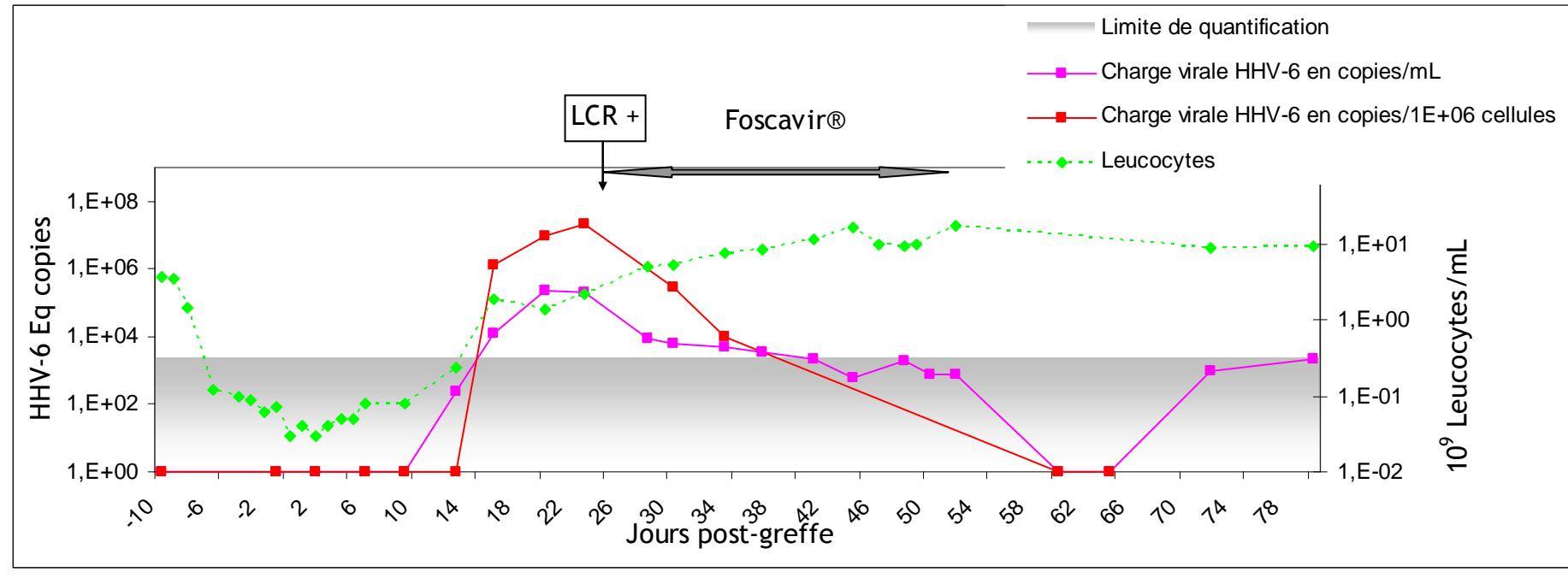


Figure 16: Réactivation HHV-6 avec encéphalite

Pour ce patient, la réactivation HHV-6 a eu lieu dans la troisième semaine, la charge virale est importante à la première détection $1,33 \cdot 10^6$ copies/ 10^6 cellules mais $<10^6$ copies/mL. Elle se traduit cliniquement par une encéphalite et régresse sous traitement pour se négativer.

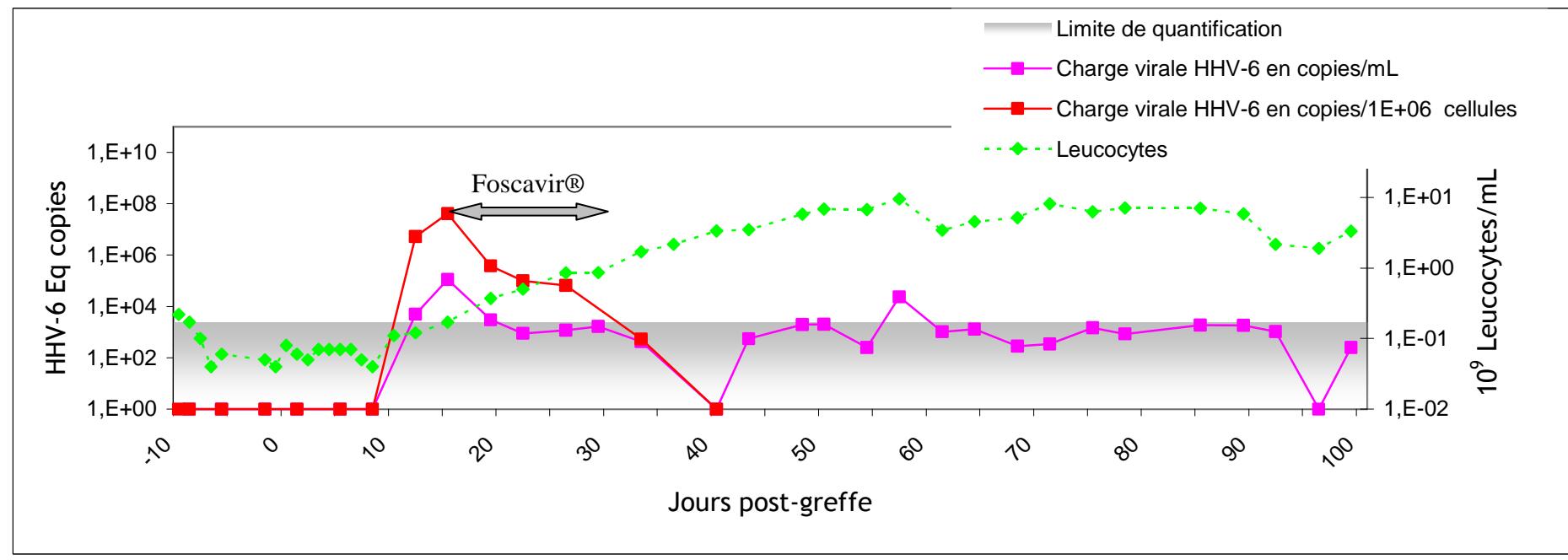


Figure 17: Réactivation HV-6 asymptomatique

Chez ce deuxième patient, la réactivation a lieu dans la deuxième semaine, elle ne se traduit pas cliniquement et régresse sous foscavir (traitement de 14 jours) pour se négativer.

III.2.2. Patients ayant présenté une intégration

III.2.2.1 Délai et intensité des charges virales HHV-6

- Patients présentant un profil d'intégration en post-greffe**

Trois patients ont présenté des profils particuliers, deux patients ne présentant pas de charges virales en pré-greffe ont présenté des charges virales très rapidement en post-greffe (J1 pour l'un et J6 pour l'autre). L'intensité des ADNémies atteint des taux très élevés $>10^6$ copies/mL dès J17 et J26 pour ne plus redescendre en dessous 10^6 copies/mL ensuite. L'expression des charges virales en copies/ 10^6 cellules nous montre que les charges virales atteignent des taux $>10^6$ copies/ 10^6 cellules très rapidement dès les premiers jours (J1 et J26). Puis ces charges virales se stabilisent à 10^7 copies/ 10^6 cellules dès J8 pour le patient 1 et à 10^6 copies/ 10^6 cellules à J28 pour le patient 2.

Les chimères reviennent 100% donneur à J30. Les PBMC des donneurs des deux patients ont été testés, ils présentent des charges virales très élevés $>10^7$ copies/mL.

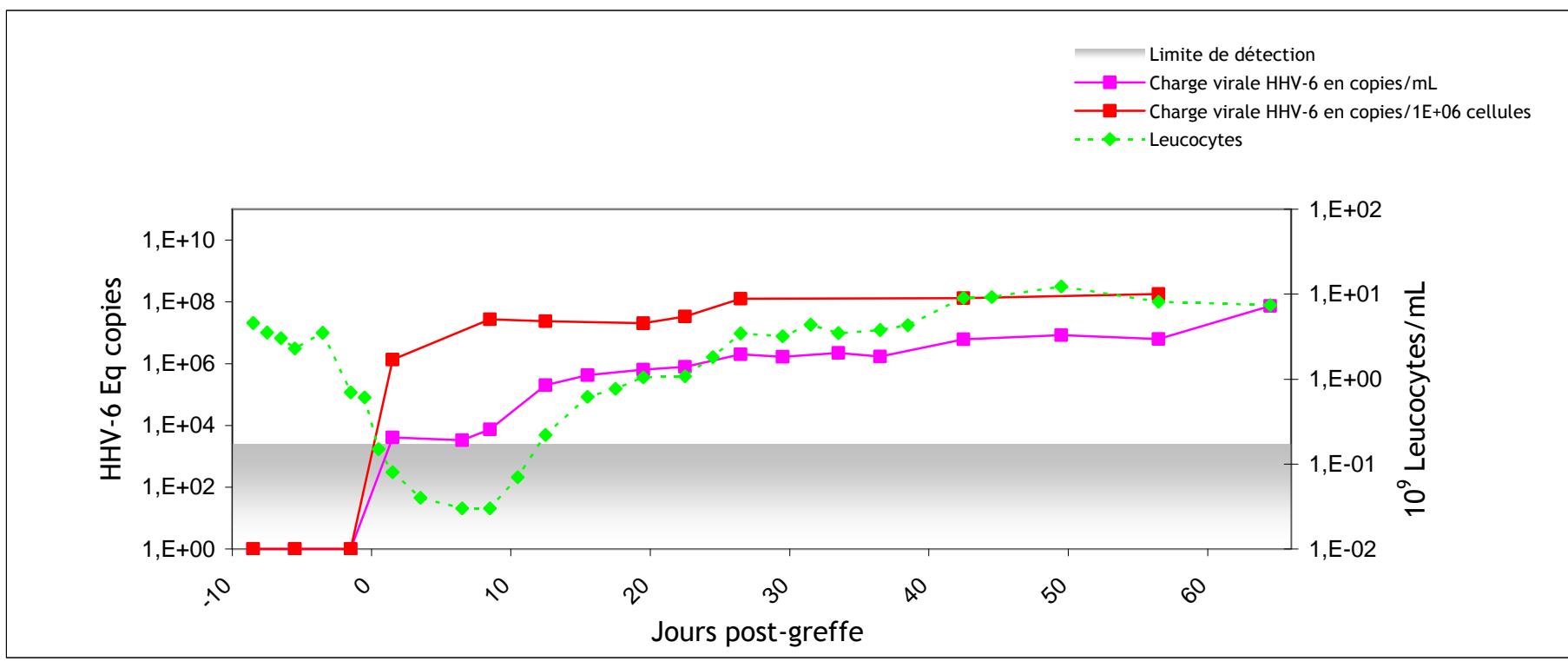


Figure 18: Profil intégration patient 1

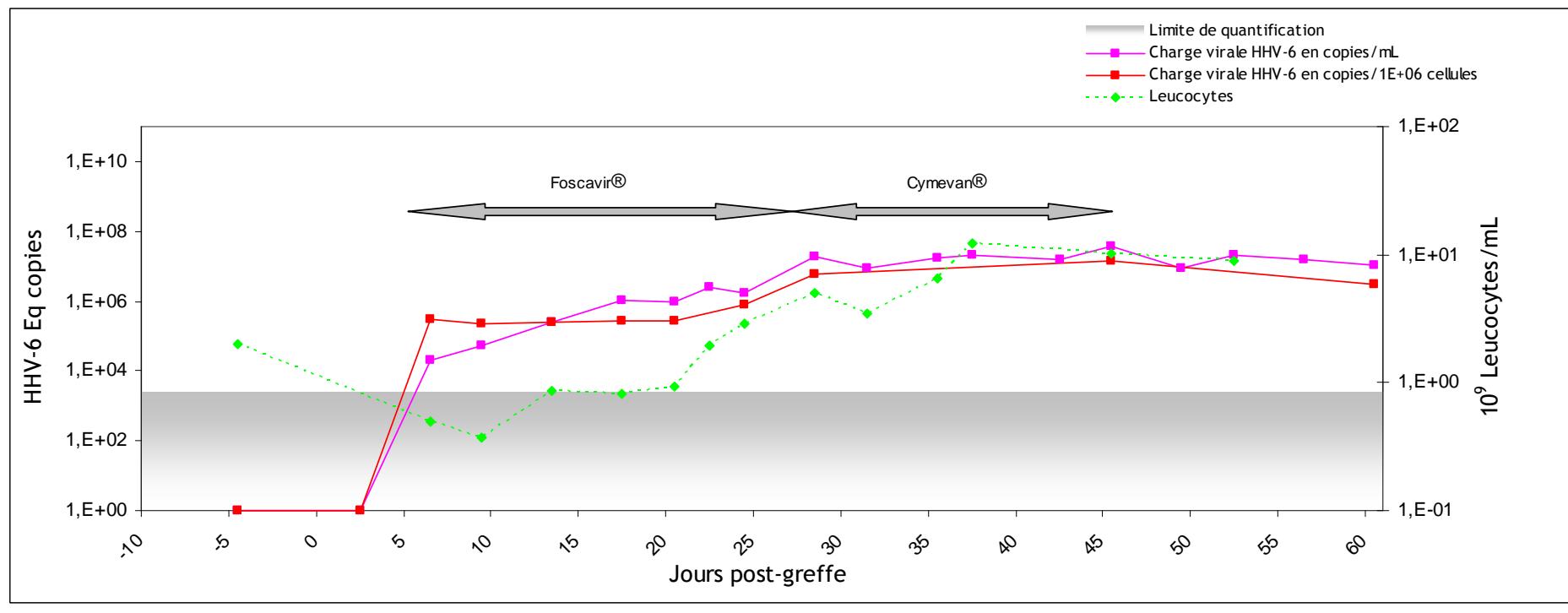


Figure 19: Profil intégration patient 2

On remarque que la mise en place d'un traitement antiviral chez le patient 2, du foscarnet de J6 à J28 et du ganciclovir de J30 à J48, n'a aucun effet sur la charge virale HHV-6 qui reste toujours supérieure à 10^6 copies/ 10^6 cellules. Le patient 1 n'a eu aucun traitement mis en place. Pendant la période d'aplasie, aucun signe clinique n'a été répertorié, ni aucun autre virus détecté.

- Patient présentant un profil d'intégration en pré-greffe

Une patiente présentait en pré-greffe une charge virale élevée $>10^6$ copies/mL sur plusieurs prélèvements consécutifs. La charge virale a ensuite décrue progressivement suite à l'aplasie et à la greffe de moelle pour se stabiliser à une charge virale détectable à partir de J180.

La chimère est revenue 100% donneur à partir de J30. Les PBMC du donneur ont été testés en HHV-6 et se sont révélés négatifs. Un prélèvement capillaire chez le receveur est revenu positif à HHV-6.

Les résultats exprimés en copies/ 10^6 cellules montrent également une décroissance globale entre J12 et J120. Un traitement antiviral par Foscavir® est instauré à partir de J7 jusqu'à J28, alors que la charge virale en copies/mL décroît au même rythme que sans traitement, la charge virale exprimée en copies/ 10^6 cellules, elle, augmente jusqu'à 10^9 copies/ 10^6 cellules à J19 puis décroît ensuite de J19 à J26 pour retrouver la même pente que la courbe en copies/mL. Cliniquement, une fièvre non documentée est répertoriée de J1 à J15.

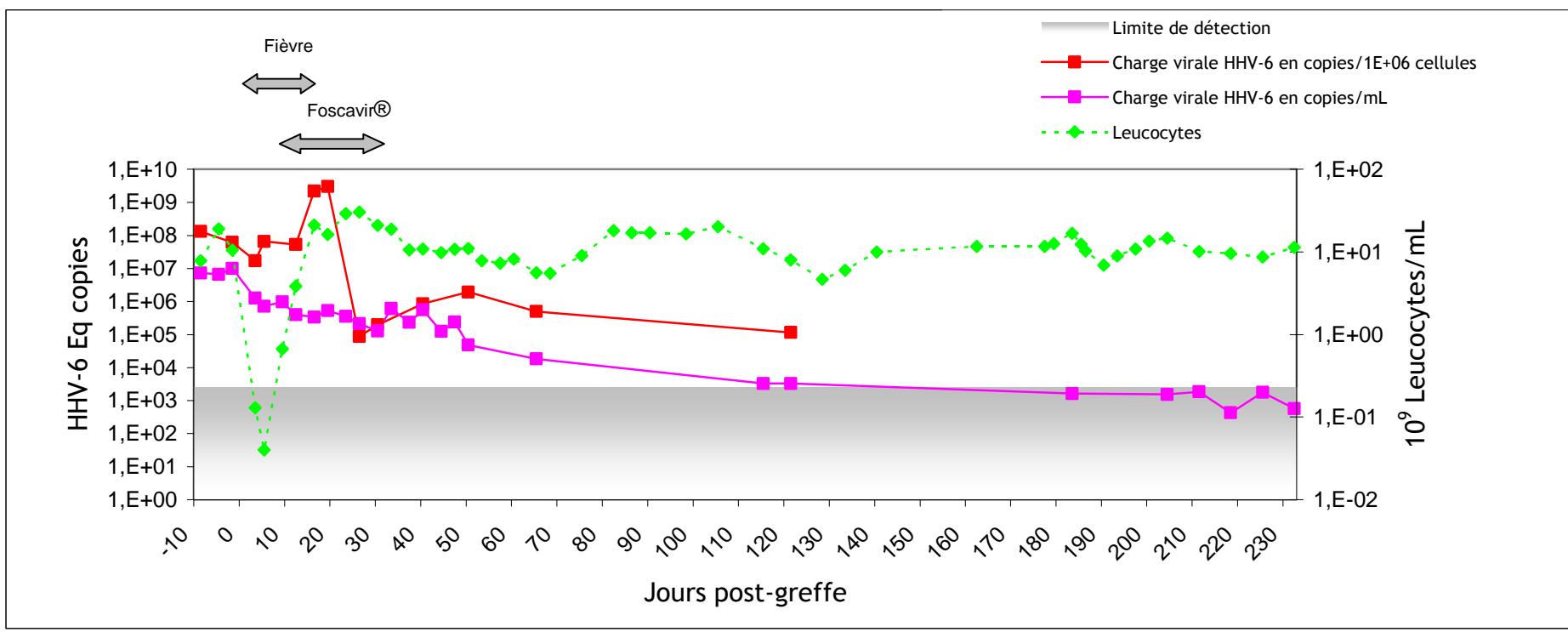


Figure 20: Profil intégration patient 3

III.2.3. Conclusion

Le but est de définir des profils théoriques de réactivation virale et d'intégration virale de l'HHV-6 dans les greffes de CSH afin d'identifier et traiter les véritables réactivations virales cliniquement expressives et d'éviter de traiter inutilement des patients chez qui le virus est intégré au génome cellulaire sans risque clinique associé à ce jour.

III.2.3.1 Arguments cliniques et biologiques en faveur d'une réactivation

- Charge virale HHV-6+ dans les semaines qui suivent la greffe**

L'HHV-6, au même titre que les autres herpèsvirus, est un virus latent et donc susceptible de se réactiver lorsque les conditions sont propices. L'aplasie qui entoure les greffes de CSH est un contexte propice à la réactivation de l'HHV-6. Donc toute présence d'une charge virale HHV-6 chez un allogreffé de CSH dans les semaines qui suivent la greffe est une réactivation virologique du virus HHV-6. La sortie d'aplasie se faisant préférentiellement dans les 30 jours qui suivent la greffe, les réactivations HHV-6 se font elles aussi surtout dans les quatre premières semaines qui suivent la greffe.

- Charges virales HHV-6 modérées**

Des charges virales, en première détection et surtout au pic, d'intensité modérée $10^3\text{-}10^4$ copies/mL ($10^5\text{-}10^6$ copies/ 10^6 cellules) sont plus en faveur d'une réactivation. Ça été le cas dans cette étude où la plupart des profils de réactivation ont eu des charges virales de faible intensité en dessous du seuil de quantification.

- Signes cliniques**

La présence de signes cliniques, tels qu'encéphalites, cytopénies, rashes cutanés, fièvres, GVHD sévère, non documentés par un autre agent infectieux et en l'absence d'une co-infection virale comme notamment le CMV, en concomitance avec une ADNémie HHV-6 peut évoquer le fait que la réactivation virologique HHV-6 soit cliniquement expressive.

- Efficacité du traitement antiviral**

Une baisse de la charge virale sous foscarnet, ganciclovir ou cidofovir signant une efficacité des traitements antiviraux agissant sur la réPLICATION de l'HHV-6 est en faveur d'une réactivation virologique, définie comme étant la production d'un cycle de réPLICATION complet.

L'ensemble de ces quatre facteurs constitue un faisceau d'arguments en faveur d'une réactivation virale HHV-6.

III.2.3.2 Arguments cliniques et biologiques en faveur d'une intégration

III.2.3.2.a) Intégration chez le donneur de CSH

- Présence de charges virales très élevées chez le receveur dans les jours qui suivent la greffe

La présence d'une charge virale élevée $>10^6$ copies/mL (10^7 - 10^9 copies/ 10^6 cellules) dans les jours qui suivent la greffe et la persistance de cette charge virale élevée évoque un profil d'intégration génomique des CSH du donneur. Cependant, la prudence s'impose car certain profil de réactivation virale présente des charges virales très élevées ponctuellement notamment dans les cas d'encéphalites, cela a été le cas d'un patient non inclus dans la cohorte, car greffé en 2009, qui a présenté une première charge virale $>10^6$ copies/mL qui a ensuite régressée sous traitement.

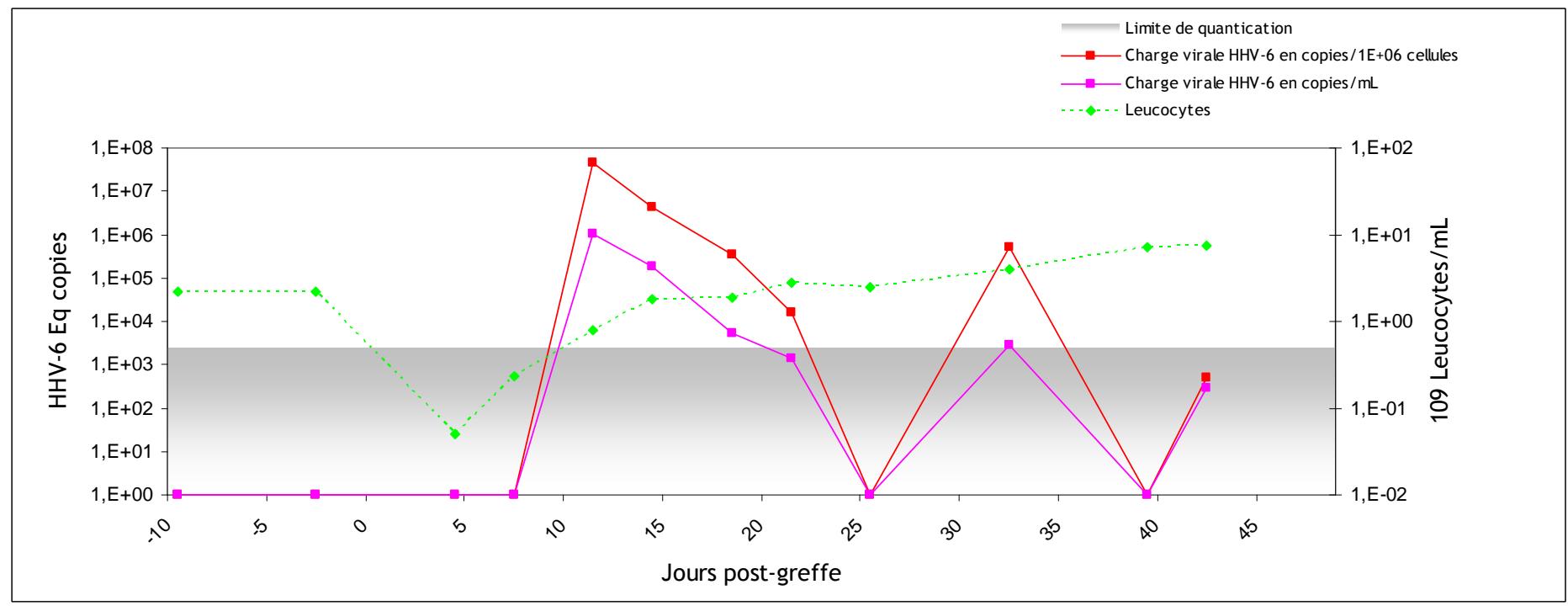


Figure 21: Charges virales patient ayant présenté une encéphalite à HHV-6 en post-greffe

- Absence de signes cliniques

Une charge virale élevée sans signe clinique est en faveur d'un profil d'intégration. Les deux cas présentés dans la cohorte n'ont pas présenté de signe clinique.

- Inefficacité du traitement antiviral

L'absence d'effet des antiviraux classiquement actifs sur l'HHV-6 est en faveur d'une absence de réPLICATION virale.

- PBMC du donneur positif HHV-6

Une PCR positive sur les PBMC du donneur est en faveur d'une intégration génomique chez ce donneur.

III.2.3.2.b) Intégration chez le receveur de CSH

- Présence de charges virales très élevées chez le receveur avant la greffe
- Absence de signes cliniques
- Inefficacité du traitement antiviral
- Diminution de la charge virale en post-greffe

La chimérisation se faisant, il ne reste progressivement plus de cellules souches receveur remplacées par les CSH du donneur d'où la disparition progressive de la charge virale HHV-6.

- PBMC donneur HHV-6 négatif
- Recherche HHV-6 dans d'autres cellules

La recherche positive d'HHV-6 dans d'autres cellules que celles du sang, telles que les follicules pilaires, évoque une intégration du receveur.

III.2.3.3 Profils théoriques

III.2.3.3.a) Réactivation

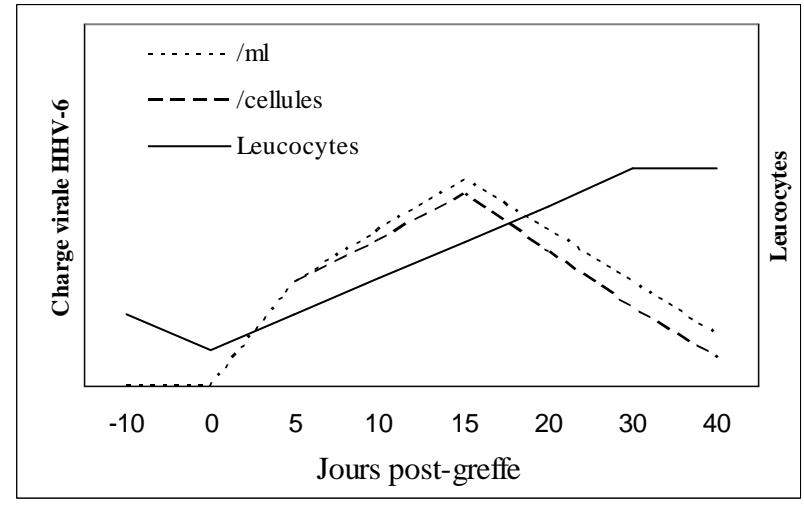


Figure 22: Profil théorique d'une réactivation de l'HHV-6 en post-greffe chez le patient greffé de CSH

III.2.3.3.b) Intégration

- Donneur

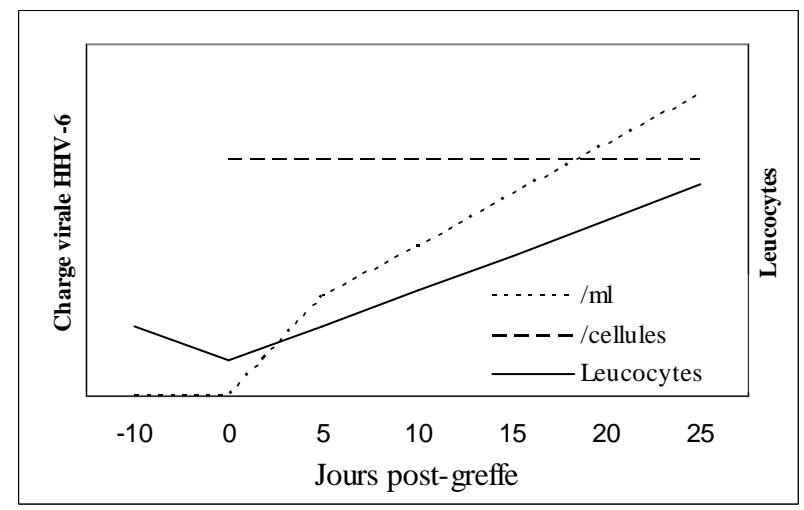


Figure 23: Profil théorique d'une intégration de l'HHV-6 en post-greffe chez le patient greffé de CSH à partir d'un donneur intégré

- Receveur

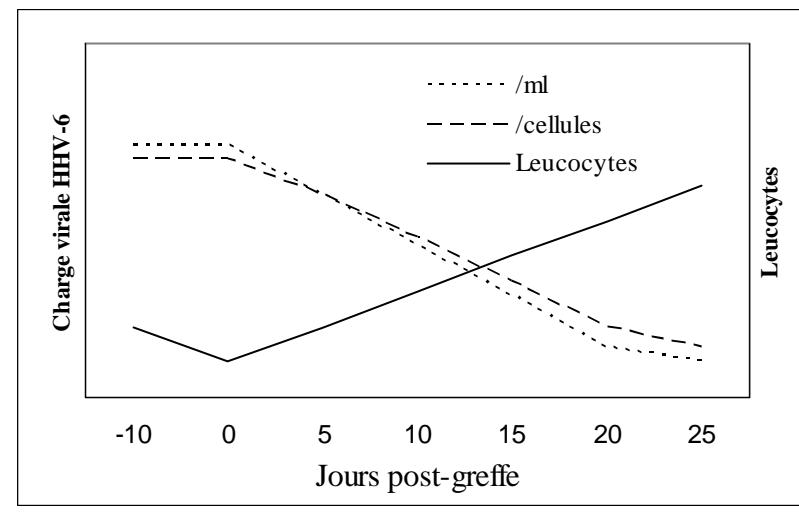


Figure 24: Profil théorique d'une intégration de l'HHV-6 en pré-greffe chez un patient greffé de CSH

III.2.3.4 Algorithme de prise en charge

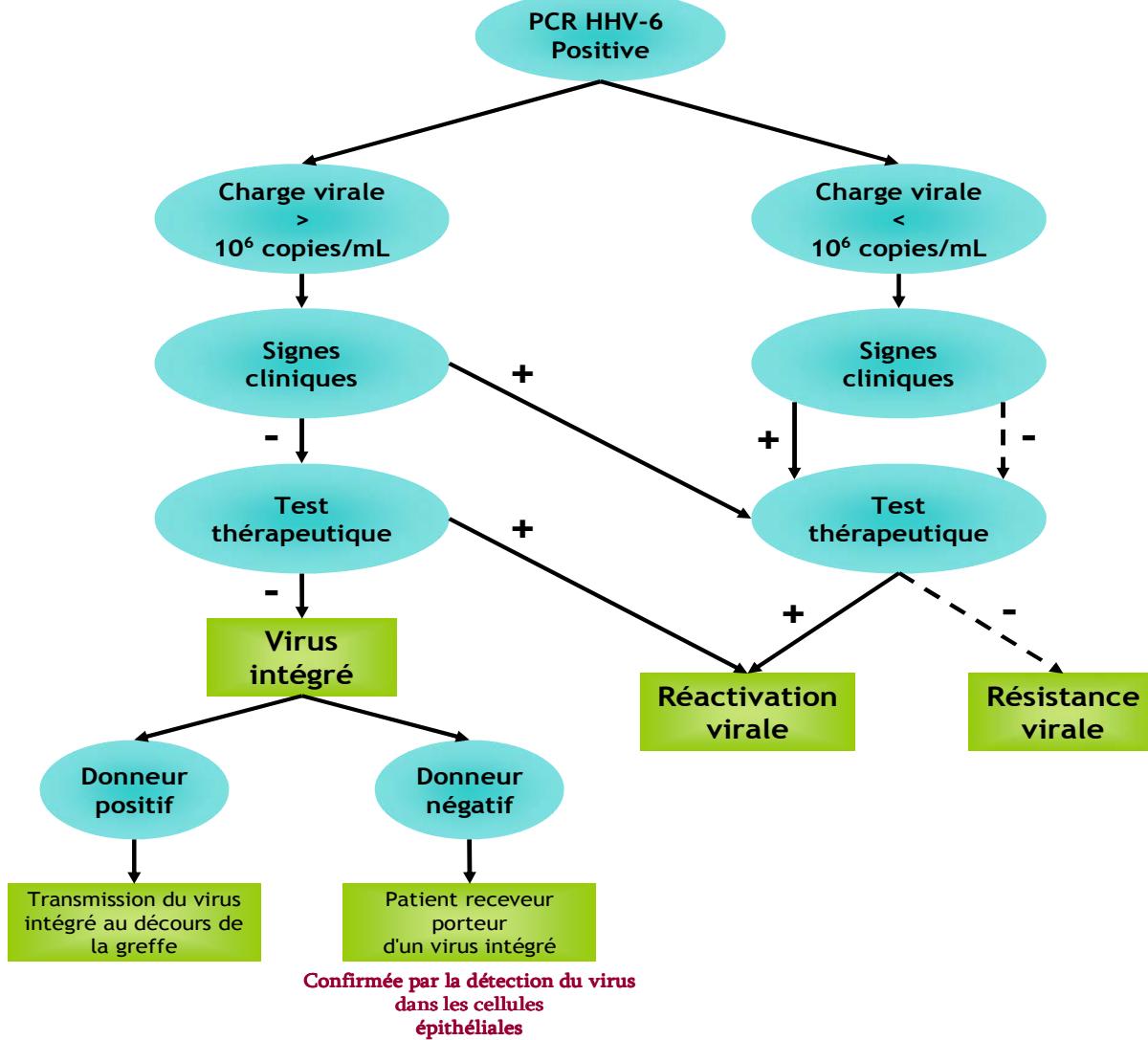


Figure 25: Algorithme de prise en charge biologique des infections à HHV-6 en post-allogreffe de CSH

DISCUSSION

Les infections à HHV-6 dans les greffes de CSH sont courantes, cependant leurs répercussions cliniques ne sont pas encore totalement élucidées. Pour essayer de clarifier cette situation, plusieurs études ont tenté d'évaluer l'incidence de la réactivation HHV-6 en utilisant différentes techniques incluant l'isolement du virus, la recherche d'antigénémie, et la PCR. Dans notre étude, en utilisant successivement une PCR qualitative de 1999 à 2003, une PCR quantitative de 2003 à 2006 et une PCR quantitative en temps réel de 2006 à aujourd'hui, sur la plus large cohorte étudiée ($n=390$), nous obtenons une incidence qui s'élève à 14,7%. Le délai de réactivation de l'HHV-6 médian se situe vers quatre semaines. La réactivation HHV-6 s'est trouvée statistiquement plus fréquente chez les patients ayant reçu un greffon de type cordon et chez les patients présentant une GVHA ≥ 2 . Cliniquement, la réactivation HHV-6 se trouve statistiquement associée à un allongement des délais de sortie d'aplasie et de reconstitution plaquettaire, ainsi qu'à des GVHA plus sévères de stade ≥ 3 . La proportion de septicémie s'est trouvé plus importante dans la population ayant réactivé l'HHV-6. Les infections à HHV-6 ont été responsables par ailleurs de deux encéphalites et suspectées d'être responsables de fièvres, d'un rash cutané et d'une œsophagite. Cependant la majorité (65%) des réactivations HHV-6 s'est avérée cliniquement silencieuse. La réactivation HHV-6 n'a pas été statistiquement retrouvée comme étant un facteur de mortalité. L'arsenal thérapeutique antiviral utilisé dans notre étude contre les infections à HHV-6 (foscarnet, ganciclovir, cidofovir ou bithérapies) s'est avéré efficace sauf pour deux patients traités par foscarnet et pour un patient traité par ganciclovir.

Les études de la littérature sur la réactivation HHV-6 en post-allogreffe de CSH font état d'incidences plus élevées que dans notre étude, variant de 26,0 à 78,0% (Annexe 1). Si les effectifs considérés sont moindres par rapport à notre étude (26-228 vs 390), les périodes de suivi post-greffe sont concordants avec notre étude (5-52 semaines vs 21

semaines). La fréquence du suivi est hebdomadaire dans la plupart des études, elle est bihebdomadaire ou hebdomadaire dans notre étude. Les délais médians de réactivation HHV-6 se situent principalement dans le mois qui suit la greffe (3-7 semaines), comme celui de notre étude qui se situe dans la 4^{ème} semaine. En revanche, les techniques utilisées sont très variables, elles ne sont pas standardisées, les sensibilités des tests sont variables ainsi que les échantillons utilisés (sang total/PBMC/plasma). L'utilisation de la PCR qualitative ne permet pas de distinguer une infection latente d'une infection active, les PCR utilisant les lymphocytes ou PBMC comme échantillons détectent le génome latent de l'HHV-6 et donnent donc des faux positifs [Yoshikawa et al., 2004], les PBMC ayant été identifiés comme un site de latence préférentiel de l'HHV-6 [Braun et al., 1997a]. L'arrivée de la PCR quantitative sur plasma ou sang total a permis de résoudre en partie ce problème [Achour et al., 2007]. Mais les sensibilités analytiques ne sont pas standardisées. Les seuils de détection analytiques varient de 25 à 250 copies/mL selon les études. Hors en regardant de plus près les études de Zerr et de Yamane par exemple [Yamane et al., 2007, Zerr et al., 2005], qui présentent des incidences de réactivation HHV-6 respective de 47,0% et de 48,0% avec des seuils de détection de 25 copies/mL et 200 copies/mL, on constate que dans l'étude de Zerr la charge virale médiane des patients HHV-6+ se situe à 138 copies/mL. Le seuil de détection de notre technique actuelle est de 250 copies/mL, soit dix fois plus élevé que celui de l'étude de Zerr. Avec notre technique actuelle, au minimum la moitié des patients n'aurait pas pu être détectée. Dans l'étude de Yamane, 15 des 36 échantillons positifs (41,7%) se situent juste au seuil de détection (200 copies/mL), notre seuil étant à 250 copies/mL nous ne les aurions pas détectés. De plus, comparativement les incidences des réactivations HHV-6 dans les greffes hépatiques présentent des écarts encore plus importants de 14% à 82% [Dockrell and Paya et al., 2001, Emery et al., 2001, Mendez et al., 2001]. Et au sein même de notre étude, l'incidence est très différente par rapport aux trois techniques de PCR utilisées. L'utilisation d'une PCR qualitative classique de 1999 à 2003, montre une incidence moindre par rapport aux PCR quantitatives utilisées par la suite de 2003 à 2006 et de 2006 à 2008 (7,63% (10/131) vs 21,8% (26/119) vs 15,3% (21/137)), nos deux techniques quantitatives ayant des seuils de détection différents (200 copies/mL vs 250 copies/mL). Le fait que les techniques de détection ne soient pas standardisées au niveau international et que les échantillons analysés soient différents entre les laboratoires, ne permet pas de comparer ces études.

Concernant les facteurs de risque associés à la réactivation HHV-6, la littérature fait état des deux facteurs que nous avons trouvés dans notre étude: greffon de type cordon [Imbert-Marcille et al., 2000, Sashihara et al., 2002, Yamane et al., 2007] et la GVHA [de Pagter et al., 2008a, Radonic et al., 2005]. Pour le greffon de type cordon, l'immaturité

immunologique et l'absence de cellules T spécifiques [Yamane et al., 2007] semble être l'explication à ce risque associé. Pour la GVHA, l'explication est moins nette, certaines études la considèrent comme une manifestation clinique de la réactivation clinique [de Pagter et al., 2008a, Zerr et al., 2005], d'autres comme un facteur de risque [Radonic et al., 2005]. Il semble pourtant que l'HHV-6 soit par sa pathogénicité (infection lytique, réponse inflammatoire, lymphoprolifération) un facteur favorisant la GVHA [Grivel et al., 2003], comme cela est décrit pour d'autres réactivations virales [Gratama et al., 1987]. D'autres facteurs sont rapportés par la littérature: l'âge du patient, le risque étant plus important pour les patients < 18 ans [Zerr et al., 2005], l'incompatibilité du sexe donneur/receveur [Zerr et al., 2005], la non parenté du donneur [Hentrich et al., 2005, Ljungman et al., 2000], l'incompatibilité HLA donneur/receveur [Ogata et al., 2006, Yamane et al., 2007], la malignité de l'hémopathie [Zerr et al., 2005], le conditionnement myéloablatif [de Pagter et al., 2008b], l'utilisation de SAL [Ljungman et al., 2000], l'ICT [Savolainen et al., 2005], une prophylaxie par tacrolimus [Yamane et al., 2007] et la GVHC [de Pagter et al., 2008a]. Le fait que notre période d'intéressement se limite à J150 et que les patients décédés dans les cent premiers jours ne soient pas considérés, nous a incités à ne pas étudier la GVHC sachant qu'elle se diagnostique qu'à partir de J100. Les incompatibilités HLA et les incompatibilités de sexe donneur/receveur n'ont pas été testées dans notre étude, les autres facteurs n'ont pas été significatifs ici.

L'HHV-6 par son effet cytopathogène direct et ses propriétés immunomodulatrices [Lusso et al., 2006] est susceptible de créer un terrain favorable à d'autres infections. L'association CMV-HHV-6 a été la plus souvent mise en avant dans les réactivations virales chez les greffés de CSH. Déjà décrite en 1996 par Kadakia comme facteur de risque de l'infection à HHV-6 [Kadakia et al., 1996], elle sera reprise plus tard par deux autres équipes mais, cette fois-ci, comme manifestation clinique de l'infection à HHV-6 [Wang et al., 2006, Yamane et al., 2007]. Aucun lien similaire n'a pu être mis en avant dans notre étude, comme avec aucun des autres virus. Le seul lien établit dans notre étude est celui avec les septicémies.

Cliniquement l'ensemble des signes cliniques attribués, statistiquement ou pas, à la réactivation HHV-6 dans notre étude est répertorié dans la littérature, encéphalites [Drobyski et al., 1994], cytopénies [Singh and Carrigan et al., 1996], GVHA sévère [Zerr et al., 2005], fièvres et rashes [Asano et al., 1991]. Le rapport réactivation HHV-6 et mortalité n'a pas pu être établi dans notre étude. Les survies cumulées entre les populations HHV-6+ et HHV-6- sont quasiment identiques (47,4% vs 53,3%), la mortalité étant tout de même plus prononcée dans les semaines qui suivent la greffe pour la population HHV-6+. Et c'est peut-être là, que notre étude sur l'impact de l'infection à HHV-6 sur la survie montre ces

limites. En effet sachant que la majorité des décès au sein de la population se situait dans les 100 semaines qui ont suivi la greffe, peut-être aurions-nous du considérer la population décédée sur cette période et non sur la durée totale de considération de la cohorte (\approx 500 semaines). Dans l'étude où De Pagter établie un lien entre la réactivation HHV-6 et la mortalité, la période considérée correspond elle aussi à la période de considération de sa cohorte (\approx 150 jours) [de Pagter et al., 2008b]. L'étude sur la mortalité n'a donc pas été approfondie car elle nécessitait plus d'investigations sur la définition des délais à considérer, sur le suivi chronologique des facteurs susceptibles d'être associés au décès, et sur les causes associée au décès, ce qui n'était pas l'objectif principal de notre étude.

L'étude de l'efficacité des traitements antiviraux sur les infections à HHV-6 a été également assez succincte. La seule chose qui peut être affirmée dans notre étude, est que les infections à HHV-6, associées à une symptomatologie sévère, ont été traitées avec succès par foscarnet (n=8), cidofovir (n=2) ou ganciclovir (n=3), conformément à ce que rapporte la littérature [Denes et al., 2004, Deray et al., 1989, Mookerjee and Vogelsang et al., 1997]. Certains traitements n'ont eu aucun impact sur les charges virales HHV-6, faut-il parler de résistance virale ? La question nécessiterait également plus d'investigation sachant que des cas ont été décrits vis-à-vis du ganciclovir [Manichanh et al., 2001, Safronetz et al., 2003].

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons étudié les profils de suivi virologique de tous les patients ayant présenté au moins une charge virale HHV-6 positive (n=57), et des trois patients chez qui l'HHV-6 a été suspecté intégré.

Parmi les 57 patients de notre étude ayant réactivé l'HHV-6, dix n'ont pas été analysés car leurs données étaient antérieures à 2003 et leurs charges virales rendues qualitativement. Pour les autres (n=47), la plupart des charges virales sont restées inférieures au seuil de quantification, entre 250 et 2500 copies/mL (74,5% à la première détection et 66,0% au pic de détection). L'intensité des charges virales lors de la réactivation HHV-6 est une variable souvent décrite dans les études de la littérature mais peu soumise à interprétation lorsqu'elles-ci ne dépassent pas 10^6 copies/mL. L'équipe de De Pagter en 2008 a étudié chez des enfants greffés de CSH, les facteurs pouvant impacter sur l'intensité des charges virales lors de la réactivation HHV-6 [de Pagter et al., 2008b]. Les enfants ayant réactivé l'HHV-6 ont été divisés en trois groupes selon l'intensité de la charge virale, <250 copies/mL, entre 250 et 1000 copies/mL, et >1000 copies/mL. Aucun facteur de risque (âge, conditionnement, greffon) n'avait pu être associé à un groupe ou à un autre. Nous n'avons testé dans notre étude que le greffon de type cordon et l'âge, tous

deux déjà décrits dans la littérature; les charges virales HHV-6 seraient plus intenses chez les receveurs de sang de cordon que pour les autres types de greffon [Sashihara et al., 2002, Tanaka et al., 2005, Yamane et al., 2007], et le jeune âge serait associé à des charges virales de plus forte intensité dans les infections à adénovirus chez les greffés de CSH [Feuchtinger et al., 2007]. Dans notre étude, les proportions de patients HHV-6+ ayant des charges virales quantifiables (>2500 copies/mL) avec un greffon de sang de cordon ne diffèrent pas par rapport à ceux ayant des charges virales quantifiables avec un greffon de moelle (23,1% vs 25,0%), de même que le jeune âge non plus (17,9% vs 24,1%).

Pour répondre à la problématique posée par la distinction entre infection active à HHV-6 et intégration de l'HHV-6 au génome cellulaire, nous avons établi des profils théoriques de suivi virologique correspondant à chaque situation (réactivation ou intégration) à partir d'exemples ciblés dans la cohorte étudiée.

Le terme de réactivation virale HHV-6 correspond à une réinfection endogène à partir d'un HHV-6 resté à l'état latent. Dans la littérature, De Pagter a fait une revue bibliographique sur les réactivations chez les patients greffés de CSH [de Pagter et al., 2008a], l'ensemble des études répertoriées (Annexe 1) définit la réactivation HHV-6 comme la survenue d'au moins une charge virale dans les semaines qui suivent la greffe. Ces charges virales sont modérées $<10^6$ copies/mL [Ogata et al., 2006, Yamane et al., 2007, Zerr et al., 2005] et associées dans certains cas à des manifestations cliniques comme nous l'avons vu auparavant. Elles régressent généralement sous traitement antiviral adapté. L'étude des profils viologiques des 57 patients ayant réactivé l'HHV-6 confirme les observations de la littérature. Aucune charge virale ne dépasse 10^6 copies/mL à la première détection ni au pic viral, seule une dépasse 10^5 copies/mL à la première détection et quatre au pic viral. Le délai médian de réactivation est de 23 jours. Les charges virales ont généralement régressé sous traitement antiviral comme dans les deux profils que nous avons présentés.

Le terme de virus HHV-6 intégré correspond à l'intégration du génome viral HHV-6 au génome de la cellule hôte. A l'heure actuelle, aucune technique de séquençage du génome intégré de l'HHV-6 n'existe. La multiplication des sites d'intégration en complique la tâche et ce ne sont pas des techniques applicables à grande échelle pour des virus à forte séroprévalence comme l'HHV-6. Seule la technique FISH arrive à mettre en évidence l'intégration génomique de l'HHV-6 [Tanaka-Taya et al., 2004, Torelli et al., 1995]. Cependant cette technique reste inférieure en terme de sensibilité et de spécificité à la biologie moléculaire, et elle est, elle non plus, pas applicable à grande échelle. En attendant de trouver des techniques adaptées, il faut pouvoir distinguer l'intégration

génomique de l'infection active à HHV-6 avec les moyens clinico-biologiques existants. Trois patients de la cohorte ont retenu notre attention et ont été suspectés d'avoir un génome viral HHV-6 intégré au génome cellulaire. Les trois présentaient des charges virales HHV-6 très importantes ($>10^6$ copies/mL) en permanence, deux dans les jours qui ont suivi la greffe et un dans les jours qui ont précédé la greffe. La présence de charges virales très importante ($>10^6$ copies/mL) est l'argument majeur en faveur d'une intégration, comme l'ont déjà démontrés Ward et Hubacek [Hubacek et al., 2007b, Ward et al., 2006]. En quantifiant en parallèle le gène cellulaire de l'actine, ils ont pu rapporter la charge virale au nombre de cellules et ainsi mettre en évidence qu'il y avait au moins une copie de génome viral par cellule dans les formes intégrées, ceci dans le sang comme dans les follicules pileux. Ward a décrit pour la première fois la transmission de la forme intégrée de l'HHV-6 au cours d'une greffe de CSH, le génome intégré a été mis en évidence par technique FISH au niveau du chromosome 17 dans les PBMCs du donneur et du receveur en post-greffe mais pas dans les PBMCs du receveur en pré-greffe. Hubacek a mis en évidence la forme intégrée chez une patiente atteinte d'une anémie sévère aplasique. Il l'a confirmé en mettant en évidence l'ADN de l'HHV-6 ≥ 1 copie/cellule sur un prélèvement capillaire. Une autre étude américaine sur des enfants présentant une intégration de l'HHV-6 ,transmise de manière congénitale et confirmée par FISH en dehors d'un contexte de greffe de CSH, met en évidence la présence d'une charge virale élevée (≥ 1 copie/cellule) dans les PBMCs, la salive, les urines, et les follicules pileux de ces enfants [Hall et al., 2008]. Théoriquement l'intégration devrait concerner un nombre variable de cellules suivant le mode de transmission, soit une intégration dans toutes les cellules de l'organisme dans les cas de transmission verticale de cette forme intégrée décrite par Daibata [Daibata et al., 1999, Daibata et al., 1998], soit un mélange entre des cellules porteuses du génome et des cellules indemnes dans les autres modes de transmission (intra-utérine ?) encore soumis à interrogation [Hermouet and Minvielle et al., 2000, Luppi et al., 2006]. Dans le cadre des greffes de CSH, le choix de tester les PBMC du donneur apparaît judicieux pour conclure à la transmission de la forme intégrée au décours de la greffe. Le choix de tester un prélèvement capillaire chez le receveur apparaît, lui, judicieux pour conclure à une transmission héréditaire de la forme intégrée.

Pour nos patients, nous avons retrouvé de l'ADN HHV-6 dans un prélèvement capillaire pour un patient et les PBMC des donneurs des deux autres patients ont été testés et ils présentaient des charges virales très importantes, comparables à celles trouvées dans le sang. L'ensemble des études sur l'intégration de l'HHV-6 n'associe, à ce jour, aucune manifestation clinique au virus intégré. Les traitements antiviraux n'ont également aucun

effet sur les charges virales des formes intégrées d'HHV-6 [Hubacek et al., 2007b]. Deux de nos patients ont bénéficié d'un traitement sans effet sur la charge virale HHV-6.

Les profils de suivi virologique de ces trois patients correspondent à deux situations bien distinctes. Les profils d'intégration des patients 1 et 2 sont similaires au profil d'intégration post-greffe déjà décrit par Ward [Ward et al., 2006]. L'augmentation de la charge virale HHV-6 et des leucocytes en post-greffe sont strictement parallèles. La charge virale HHV-6 est très élevée, $>10^6$ copies/mL de sang total chez le receveur comme chez le donneur en post-greffe. Aucun signe clinique n'y est associé aussi bien chez le receveur que chez le donneur, il n'y a pas de réponse au traitement. Le profil du patient 3 est similaire à un cas déjà décrit par Hubacek [Hubacek et al., 2007a]. Chez un receveur porteur d'un HHV-6 intégré, la disparition de la charge virale HHV-6 est progressive après la greffe de CSH, sachant que le donneur n'est pas porteur. La charge virale devient non détectable dans le cas de Hubacek, elle reste détectable dans notre cas. Peut-être peut-on penser que des fragments du génome d'HHV-6 chromosomique soient relargés de compartiments extra-sanguins [Jeulin et al., 2009a].

D'un point de vue technique, le développement de la PCR du gène de l'albumine en parallèle de la PCR HHV-6 permet l'expression de la charge virale HHV-6 dans le sang par million de cellules [Gautheret-Dejean et al., 2002, Laurendeau et al., 1999]. Ce mode d'expression est plus approprié au suivi des infections à HHV-6 chez le sujet immunodéprimé. Dans le sang, les polynucléaires prennent une part importante dans la charge virale HHV-6. Les deux modes d'expression de la charge virale HHV-6 sont corrélés dans le sang et dans le LCR, lorsque le nombre de polynucléaires est normal. En revanche en cas de leucopénie, les charges virales exprimées en copies/ 10^6 cellules et celles exprimées en copies/mL ne sont plus corrélées [Gautheret-Dejean et al., 2009]. Ainsi, la charge virale peut être mesurée aussi bien dans le sang périphérique que dans un autre fluide biologique ou que dans n'importe quel tissu ou prélèvement cellulaire. Les mesures obtenues sont standardisées et peuvent ainsi être comparées entre différents compartiments de l'organisme. Dans les cas que nous avons étudié ici, la corrélation entre les charges virales exprimées en copies/mL et celles exprimées en copies/ 10^6 cellules semble correcte. Une seule discordance est apparue chez le patient porteur d'un virus intégré en pré-greffe: alors que sa charge virale dans le sang total décroît suite à la greffe de CSH, le patient présente une recrudescence de sa charge virale HHV-6 exprimée en copies/cellules à J19, non révélée par la charge virale en copies/mL, le patient étant encore légèrement neutropénique. S'agit-il d'un relargage massif passager ? S'agit-il d'une réactivation virale indépendante de la forme intégrée ? Toujours est-il que le suivi en

copies/cellules semble plus adapté, et permet de mettre en évidence des événements ignorés par la PCR en copies/mL chez le patient neutropénique.

L'algorithme de prise en charge biologique des infections à HHV-6, que nous avons proposé, reprend toutes ces observations. Le seuil décisionnel est fixé à 10^6 copies/mL (1copie/cellule). Cependant comme nous l'avons observé chez un patient faisant une infection à HHV-6 avec encéphalite, des taux supérieurs à 10^6 copies/mL peuvent être associés à une réactivation virale. C'est pourquoi la charge virale seule ne suffit pas et doit être complétée par d'autres éléments: la clinique, la cinétique de la charge virale (présence d'une charge virale $> 10^6$ copies/mL sur plusieurs prélèvements consécutifs), la réponse au traitement.

CONCLUSION

La mise en place du diagnostic moléculaire des infections à HHV-6 après allogreffe de CSH au laboratoire de virologie du CHU de Nancy, a permis sur ces dix années d'étude de détecter, de prévenir et de traiter des infections potentiellement graves. Comme nous l'avons vu, les techniques ne sont pas standardisées entre les laboratoires et ceci explique en partie les différences d'incidence trouvées entre les différentes études, sans pour autant qu'il y ait de répercussions cliniques. La découverte récente de l'intégration du virus au génome cellulaire a mis à mal l'interprétation des charges virales de forte intensité ($>10^6$ copies/mL), considérées jusqu'ici, le plus souvent à tort, comme des réactivations virales et traitées comme telles. Nous avons donc établi un algorithme de prise en charge biologique à partir d'éléments clinico-biologiques afin d'identifier les différentes situations virologique et clinique (intégration, réactivation virale symptomatique ou non). Cet algorithme présente l'avantage de se baser sur des arguments biologiques assez simples à mettre en avant à partir d'investigations peu invasives (sang total, follicules pileux) pour des patients ayant déjà des traitements lourds par ailleurs. Il a l'autre avantage d'identifier assez rapidement les profils d'intégration ou de réactivation virale afin d'éviter des traitements antiviraux dont la toxicité n'est pas négligeable. Deux situations potentielles mais peu probables restent cependant en suspend: Premièrement, que faire des charges virales $<10^6$ copies/mL non répondeuses aux traitements ? Doit-on parler de résistance virale ? Si la résistance au ganciclovir a été décrite, celle au foscarnet ou au cidofovir ne le sont pas encore. Nos deux cas d'échec thérapeutique du foscarnet n'ont pas eu de conséquence et les charges virales ont fini par être non détectables dans le temps. Deuxièmement, que faire des charges virales d'intensité constantes $<10^6$ copies/mL sur plusieurs prélèvements successifs, non répondeuses au traitement et sans clinique associée ? L'idée avancée par Luppi selon laquelle le phénomène d'intégration, hors transmission congénitale puisse ne concerner qu'une minorité de cellules infectées [Luppi et al., 2006], reste encore totalement hypothétique mais elle répondrait à cette situation. Une telle situation ne s'est pas présentée dans notre étude.

BIBLIOGRAPHIE

1. Ablashi DV, Balachandran N, Josephs SF, Hung CL, Krueger GR, Kramarsky B, et al. Genomic polymorphism, growth properties, and immunologic variations in human herpesvirus-6 isolates. *Virology* 1991;184:545-52.
2. Ablashi DV, Salahuddin SZ, Josephs SF, Imam F, Lusso P, Gallo RC, et al. HBLV (or HHV-6) in human cell lines. *Nature* 1987;329:207.
3. Achour A, Boutolleau D, Slim A, Agut H, Gautheret-Dejean A. Human herpesvirus-6 (HHV-6) DNA in plasma reflects the presence of infected blood cells rather than circulating viral particles. *J Clin Virol* 2007;38:280-5.
4. Acott PD, Lee SH, Bitter-Suermann H, Lawen JG, Crocker JF. Infection concomitant with pediatric renal allograft rejection. *Transplantation* 1996;62:689-91.
5. Adams O, Krempe C, Kogler G, Wernet P, Scheid A. Congenital infections with human herpesvirus 6. *J Infect Dis* 1998;178:544-6.
6. Agut H, Aubin JT, Huraux JM. Homogeneous susceptibility of distinct human herpesvirus 6 strains to antivirals in vitro. *J Infect Dis* 1991;163:1382-3.
7. Akashi K, Eizuru Y, Sumiyoshi Y, Minematsu T, Hara S, Harada M, et al. Brief report: severe infectious mononucleosis-like syndrome and primary human herpesvirus 6 infection in an adult. *N Engl J Med* 1993;329:168-71.
8. Andre-Garnier E, Milpied N, Boutolleau D, Saiagh S, Billaudel S, Imbert-Marcille BM. Reactivation of human herpesvirus 6 during ex vivo expansion of circulating CD34+ haematopoietic stem cells. *J Gen Virol* 2004;85:3333-6.
9. Ansari A, Emery VC. The U69 gene of human herpesvirus 6 encodes a protein kinase which can confer ganciclovir sensitivity to baculoviruses. *J Virol* 1999;73:3284-91.
10. Asada H, Klaus-Kovtun V, Golding H, Katz SI, Blauvelt A. Human herpesvirus 6 infects dendritic cells and suppresses human immunodeficiency virus type 1 replication in coinfecting cultures. *J Virol* 1999;73:4019-28.
11. Asano Y, Yoshikawa T, Suga S, Kobayashi I, Nakashima T, Yazaki T, et al. Clinical features of infants with primary human herpesvirus 6 infection (exanthem subitum, roseola infantum). *Pediatrics* 1994;93:104-8.
12. Asano Y, Yoshikawa T, Suga S, Nakashima T, Yazaki T, Fukuda M, et al. Reactivation of herpesvirus type 6 in children receiving bone marrow transplants for leukemia. *N Engl J Med* 1991;324:634-5.
13. Aubin JT, Poirel L, Agut H, Huraux JM, Bignozzi C, Brossard Y, et al. Intrauterine transmission of human herpesvirus 6. *Lancet* 1992;340:482-3.
14. Balachandran N, Amelse RE, Zhou WW, Chang CK. Identification of proteins specific for human herpesvirus 6-infected human T cells. *J Virol* 1989;63:2835-40.
15. Baldanti F, Michel D, Simoncini L, Heuschmid M, Zimmermann A, Minisini R, et al. Mutations in the UL97 ORF of ganciclovir-resistant clinical cytomegalovirus isolates differentially affect GCV phosphorylation as determined in a recombinant vaccinia virus system. *Antiviral Res* 2002;54:59-67.
16. Barone SR, Kaplan MH, Krilov LR. Human herpesvirus-6 infection in children with first febrile seizures. *J Pediatr* 1995;127:95-7.

17. Beovic B, Pecaric-Meglic N, Marin J, Bedernjak J, Muzlovic I, Cizman M. Fatal human herpesvirus 6-associated multifocal meningoencephalitis in an adult female patient. *Scand J Infect Dis* 2001;33:942-4.
18. Bethge W, Beck R, Jahn G, Mundinger P, Kanz L, Einsele H. Successful treatment of human herpesvirus-6 encephalitis after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999;24:1245-8.
19. Bhattacharay P, Pancharoen C, Mekmullica J. Seroprevalence of anti-human herpes virus-6 IgG antibody in children of Bangkok, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2001;32:143-7.
20. Biberfeld P, Kramarsky B, Salahuddin SZ, Gallo RC. Ultrastructural characterization of a new human B lymphotropic DNA virus (human herpesvirus 6) isolated from patients with lymphoproliferative disease. *J Natl Cancer Inst* 1987;79:933-41.
21. Birnbaum T, Padovan CS, Sporer B, Rupprecht TA, Ausserer H, Jaeger G, et al. Severe meningoencephalitis caused by human herpesvirus 6 type B in an immunocompetent woman treated with ganciclovir. *Clin Infect Dis* 2005;40:887-9.
22. Black JB, Lopez C, Pellett PE. Induction of host cell protein synthesis by human herpesvirus 6. *Virus Res* 1992;22:13-23.
23. Black JB, Pellett PE. Human herpesvirus 7. *Rev Med Virol* 1999;9:245-62.
24. Boutolleau D, Agut H, Gautheret-Dejean A. Human herpesvirus 6 genome integration: a possible cause of misdiagnosis of active viral infection? *J Infect Dis* 2006;194:1019-20; author reply 1021-3.
25. Boutolleau D, Fernandez C, Andre E, Imbert-Marcille BM, Milpied N, Agut H, et al. Human herpesvirus (HHV)-6 and HHV-7: two closely related viruses with different infection profiles in stem cell transplantation recipients. *J Infect Dis* 2003;187:179-86.
26. Braun DK, Dominguez G, Pellett PE. Human herpesvirus 6. *Clin Microbiol Rev* 1997a;10:521-67.
27. Braun KA, Lao Y, He Z, Ingles CJ, Wold MS. Role of protein-protein interactions in the function of replication protein A (RPA): RPA modulates the activity of DNA polymerase alpha by multiple mechanisms. *Biochemistry* 1997b;36:8443-54.
28. Briggs M, Fox J, Tedder RS. Age prevalence of antibody to human herpesvirus 6. *Lancet* 1988;1:1058-9.
29. Campadelli P, Gangai C, Pasquale F. Automated morphometric analysis in peripheral neuropathies. *Comput Biol Med* 1999;29:147-56.
30. Carrigan DR, Knox KK. Human herpesvirus 6 (HHV-6) isolation from bone marrow: HHV-6-associated bone marrow suppression in bone marrow transplant patients. *Blood* 1994;84:3307-10.
31. Caserta MT, McDermott MP, Dewhurst S, Schnabel K, Carnahan JA, Gilbert L, et al. Human herpesvirus 6 (HHV6) DNA persistence and reactivation in healthy children. *J Pediatr* 2004;145:478-84.
32. Caserta MT, Mock DJ, Dewhurst S. Human herpesvirus 6. *Clin Infect Dis* 2001;33:829-33.
33. Challoner PB, Smith KT, Parker JD, MacLeod DL, Coulter SN, Rose TM, et al. Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:7440-4.
34. Clark DA. Human herpesvirus 6. *Rev Med Virol* 2000;10:155-73.
35. Clark DA, Ait-Khaled M, Wheeler AC, Kidd IM, McLaughlin JE, Johnson MA, et al. Quantification of human herpesvirus 6 in immunocompetent persons and post-mortem tissues from AIDS patients by PCR. *J Gen Virol* 1996;77 (Pt 9):2271-5.

36. Clark DA, Nacheva EP, Leong HN, Brazma D, Li YT, Tsao EH, et al. Transmission of integrated human herpesvirus 6 through stem cell transplantation: implications for laboratory diagnosis. *J Infect Dis* 2006;193:912-6.
37. Clark DA, Ward KN. Importance of chromosomally integrated HHV-6A and -6B in the diagnosis of active HHV-6 infection. *Herpes* 2008;15:28-32.
38. Collot S, Petit B, Bordessoule D, Alain S, Touati M, Denis F, et al. Real-time PCR for quantification of human herpesvirus 6 DNA from lymph nodes and saliva. *J Clin Microbiol* 2002;40:2445-51.
39. Cone RW, Hackman RC, Huang ML, Bowden RA, Meyers JD, Metcalf M, et al. Human herpesvirus 6 in lung tissue from patients with pneumonitis after bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1993;329:156-61.
40. Daibata M, Taguchi T, Nemoto Y, Taguchi H, Miyoshi I. Inheritance of chromosomally integrated human herpesvirus 6 DNA. *Blood* 1999;94:1545-9.
41. Daibata M, Taguchi T, Sawada T, Taguchi H, Miyoshi I. Chromosomal transmission of human herpesvirus 6 DNA in acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1998;352:543-4.
42. De Bolle L, Naesens L, De Clercq E. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clin Microbiol Rev* 2005a;18:217-45.
43. De Bolle L, Van Loon J, De Clercq E, Naesens L. Quantitative analysis of human herpesvirus 6 cell tropism. *J Med Virol* 2005b;75:76-85.
44. de Pagter PJ, Schuurman R, Meijer E, van Baarle D, Sanders EA, Boelens JJ. Human herpesvirus type 6 reactivation after haematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Virol* 2008a;43:361-6.
45. de Pagter PJ, Schuurman R, Visscher H, de Vos M, Bierings M, van Loon AM, et al. Human herpes virus 6 plasma DNA positivity after hematopoietic stem cell transplantation in children: an important risk factor for clinical outcome. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008b;14:831-9.
46. Deback C, Agbalika F, Scieux C, Marcelin AG, Gautheret-Dejean A, Cherot J, et al. Detection of human herpesviruses HHV-6, HHV-7 and HHV-8 in whole blood by real-time PCR using the new CMV, HHV-6, 7, 8 R-gene kit. *J Virol Methods* 2008;149:285-91.
47. Denes E, Magy L, Pradeau K, Alain S, Weinbreck P, Ranger-Rogez S. Successful treatment of human herpesvirus 6 encephalomyelitis in immunocompetent patient. *Emerg Infect Dis* 2004;10:729-31.
48. Deray G, Martinez F, Katlama C, Levaltier B, Beaufils H, Danis M, et al. Foscarnet nephrotoxicity: mechanism, incidence and prevention. *Am J Nephrol* 1989;9:316-21.
49. DesJardin JA, Gibbons L, Cho E, Supran SE, Falagas ME, Werner BG, et al. Human herpesvirus 6 reactivation is associated with cytomegalovirus infection and syndromes in kidney transplant recipients at risk for primary cytomegalovirus infection. *J Infect Dis* 1998;178:1783-6.
50. Di Luca D, Katsafanas G, Schirmer EC, Balachandran N, Frenkel N. The replication of viral and cellular DNA in human herpesvirus 6-infected cells. *Virology* 1990;175:199-210.
51. Di Luca D, Mirandola P, Ravaioli T, Dolcetti R, Frigatti A, Bovenzi P, et al. Human herpesviruses 6 and 7 in salivary glands and shedding in saliva of healthy and human immunodeficiency virus positive individuals. *J Med Virol* 1995;45:462-8.
52. Dockrell DH. Human herpesvirus 6: molecular biology and clinical features. *J Med Microbiol* 2003;52:5-18.
53. Dockrell DH, Paya CV. Human herpesvirus-6 and -7 in transplantation. *Rev Med Virol* 2001;11:23-36.
54. Dockrell DH, Prada J, Jones MF, Patel R, Badley AD, Harmsen WS, et al. Seroconversion to human herpesvirus 6 following liver transplantation is a marker of cytomegalovirus disease. *J Infect Dis* 1997;176:1135-40.

55. Dominguez G, Dambaugh TR, Stamey FR, Dewhurst S, Inoue N, Pellett PE. Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A. *J Virol* 1999;73:8040-52.
56. Drobyski WR, Dunne WM, Burd EM, Knox KK, Ash RC, Horowitz MM, et al. Human herpesvirus-6 (HHV-6) infection in allogeneic bone marrow transplant recipients: evidence of a marrow-suppressive role for HHV-6 in vivo. *J Infect Dis* 1993;167:735-9.
57. Drobyski WR, Knox KK, Majewski D, Carrigan DR. Brief report: fatal encephalitis due to variant B human herpesvirus-6 infection in a bone marrow-transplant recipient. *N Engl J Med* 1994;330:1356-60.
58. Emery VC. Human herpesviruses 6 and 7 in solid organ transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2001;32:1357-60.
59. Enders G, Biber M, Meyer G, Helftenbein E. Prevalence of antibodies to human herpesvirus 6 in different age groups, in children with exanthema subitum, other acute exanthematous childhood diseases, Kawasaki syndrome, and acute infections with other herpesviruses and HIV. *Infection* 1990;18:12-5.
60. Feuchtinger T, Lang P, Handgretinger R. Adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma* 2007;48:244-55.
61. Flamand L, Gosselin J, D'Addario M, Hiscott J, Ablashi DV, Gallo RC, et al. Human herpesvirus 6 induces interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha, but not interleukin-6, in peripheral blood mononuclear cell cultures. *J Virol* 1991;65:5105-10.
62. Flamand L, Gosselin J, Stefanescu I, Ablashi D, Menezes J. Immunosuppressive effect of human herpesvirus 6 on T-cell functions: suppression of interleukin-2 synthesis and cell proliferation. *Blood* 1995;85:1263-71.
63. Flamand L, Stefanescu I, Menezes J. Human herpesvirus-6 enhances natural killer cell cytotoxicity via IL-15. *J Clin Invest* 1996;97:1373-81.
64. Foa-Tomasi L, Avitabile E, Campadelli-Fiume G. Selection of a monoclonal antibody specific for variant B human herpesvirus 6-infected mononuclear cells. *J Virol Methods* 1995;51:289-96.
65. Foa-Tomasi L, Boscaro A, di Gaeta S, Campadelli-Fiume G. Monoclonal antibodies to gp100 inhibit penetration of human herpesvirus 6 and polykaryocyte formation in susceptible cells. *J Virol* 1991;65:4124-9.
66. Fox JD, Briggs M, Ward PA, Tedder RS. Human herpesvirus 6 in salivary glands. *Lancet* 1990;336:590-3.
67. Gautheret-Dejean A, Henquell C, Mousnier F, Boutolleau D, Bonnafous P, Dhedin N, et al. Different expression of human herpesvirus-6 (HHV-6) load in whole blood may have a significant impact on the diagnosis of active infection. *J Clin Virol* 2009;46:33-6.
68. Gautheret-Dejean A, Manichanh C, Thien-Ah-Koon F, Fillet AM, Mangeney N, Vidaud M, et al. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of human herpesvirus-6 infection and application to bone marrow transplant patients. *J Virol Methods* 2002;100:27-35.
69. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* 1974;18:295-304.
70. Goedhard JG, Galama JM, Wagenvoort JH. Active human herpesvirus 6 infection in an adolescent male. *Clin Infect Dis* 1995;20:1070-1.
71. Gompels UA, Macaulay HA. Characterization of human telomeric repeat sequences from human herpesvirus 6 and relationship to replication. *J Gen Virol* 1995;76 (Pt 2):451-8.
72. Gompels UA, Nicholas J, Lawrence G, Jones M, Thomson BJ, Martin ME, et al. The DNA sequence of human herpesvirus-6: structure, coding content, and genome evolution. *Virology* 1995;209:29-51.

73. Gratama JW, Weiland HT, Hekker AC, Weijers TF, The TH, Stijnen T, et al. Herpes virus immunity and acute graft-versus-host disease. *Transplant Proc* 1987;19:2680-2.
74. Grivel JC, Santoro F, Chen S, Faga G, Malnati MS, Ito Y, et al. Pathogenic effects of human herpesvirus 6 in human lymphoid tissue ex vivo. *J Virol* 2003;77:8280-9.
75. Hall CB, Caserta MT, Schnabel K, Shelley LM, Marino AS, Carnahan JA, et al. Chromosomal integration of human herpesvirus 6 is the major mode of congenital human herpesvirus 6 infection. *Pediatrics* 2008;122:513-20.
76. Hall CB, Caserta MT, Schnabel KC, Long C, Epstein LG, Insel RA, et al. Persistence of human herpesvirus 6 according to site and variant: possible greater neurotropism of variant A. *Clin Infect Dis* 1998;26:132-7.
77. Hall CB, Long CE, Schnabel KC, Caserta MT, McIntyre KM, Costanzo MA, et al. Human herpesvirus-6 infection in children. A prospective study of complications and reactivation. *N Engl J Med* 1994;331:432-8.
78. Henrich M, Oruzio D, Jager G, Schlemmer M, Schleuning M, Schiel X, et al. Impact of human herpesvirus-6 after haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2005;128:66-72.
79. Hermouet S, Minvielle S. Inheritance of chromosomally integrated viral DNA? *Blood* 2000;95:1108-9.
80. Hoshino K, Nishi T, Adachi H, Ito H, Fukuda Y, Dohi K, et al. Human herpesvirus-6 infection in renal allografts: retrospective immunohistochemical study in Japanese recipients. *Transpl Int* 1995;8:169-73.
81. Hubacek P, Hyncicova K, Muzikova K, Cinek O, Zajac M, Sedlacek P. Disappearance of pre-existing high HHV-6 DNA load in blood after allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2007a;40:805-6.
82. Hubacek P, Maalouf J, Zajickova M, Kouba M, Cinek O, Hyncicova K, et al. Failure of multiple antivirals to affect high HHV-6 DNAemia resulting from viral chromosomal integration in case of severe aplastic anaemia. *Haematologica* 2007b;92:e98-e100.
83. Hudnall SD, Chen T, Allison P, Tyring SK, Heath A. Herpesvirus prevalence and viral load in healthy blood donors by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Transfusion* 2008;48:1180-7.
84. Humar A, Kumar D, Caliendo AM, Moussa G, Ashi-Sulaiman A, Levy G, et al. Clinical impact of human herpesvirus 6 infection after liver transplantation. *Transplantation* 2002;73:599-604.
85. Imbert-Marcille BM, Tang XW, Lepelletier D, Besse B, Moreau P, Billaudel S, et al. Human herpesvirus 6 infection after autologous or allogeneic stem cell transplantation: a single-center prospective longitudinal study of 92 patients. *Clin Infect Dis* 2000;31:881-6.
86. Isegawa Y, Mukai T, Nakano K, Kagawa M, Chen J, Mori Y, et al. Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B. *J Virol* 1999;73:8053-63.
87. Jacobs U, Ferber J, Klehr HU. Severe allograft dysfunction after OKT3-induced human herpes virus-6 reactivation. *Transplant Proc* 1994;26:3121.
88. Jeulin H, Guery M, Clement L, Salmon A, Beri M, Bordigoni P, et al. Chromosomally integrated HHV-6: slow decrease of HHV-6 viral load after hematopoietic stem-cell transplantation. *Transplantation* 2009a;88:1142-3.
89. Jeulin H, Salmon A, Gautheret-Dejean A, Agut H, Bordigoni P, Fortier B, et al. Contribution of human herpesvirus 6 (HHV-6) viral load in whole blood and serum to investigate integrated HHV-6 transmission after haematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Virol* 2009b;45:43-6.

90. Johnston RE, Geretti AM, Prentice HG, Clark AD, Wheeler AC, Potter M, et al. HHV-6-related secondary graft failure following allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 1999;105:1041-3.
91. Josephs SF, Salahuddin SZ, Ablashi DV, Schachter F, Wong-Staal F, Gallo RC. Genomic analysis of the human B-lymphotropic virus (HBLV). *Science* 1986;234:601-3.
92. Kadakia MP, Rybka WB, Stewart JA, Patton JL, Stamey FR, Elsayy M, et al. Human herpesvirus 6: infection and disease following autologous and allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1996;87:5341-54.
93. Kashanchi F, Araujo J, Doniger J, Muralidhar S, Hoch R, Khleif S, et al. Human herpesvirus 6 (HHV-6) ORF-1 transactivating gene exhibits malignant transforming activity and its protein binds to p53. *Oncogene* 1997;14:359-67.
94. Kato Z, Kozawa R, Teramoto T, Hashimoto K, Shinoda S, Kondo N. Acute cerebellitis in primary human herpesvirus-6 infection. *Eur J Pediatr* 2003;162:801-3.
95. Knox KK, Carrigan DR. Chronic myelosuppression associated with persistent bone marrow infection due to human herpesvirus 6 in a bone marrow transplant recipient. *Clin Infect Dis* 1996;22:174-5.
96. Knox KK, Harrington DP, Carrigan DR. Fulminant human herpesvirus six encephalitis in a human immunodeficiency virus-infected infant. *J Med Virol* 1995;45:288-92.
97. Kondo K, Kondo T, Okuno T, Takahashi M, Yamanishi K. Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. *J Gen Virol* 1991;72 (Pt 6):1401-8.
98. Kondo K, Nagafuji H, Hata A, Tomomori C, Yamanishi K. Association of human herpesvirus 6 infection of the central nervous system with recurrence of febrile convulsions. *J Infect Dis* 1993;167:1197-200.
99. Kondo K, Shimada K, Sashihara J, Tanaka-Taya K, Yamanishi K. Identification of human herpesvirus 6 latency-associated transcripts. *J Virol* 2002;76:4145-51.
100. Krueger GR, Ablashi DV, Josephs SF, Salahuddin SZ, Lembke U, Ramon A, et al. Clinical indications and diagnostic techniques of human herpesvirus-6 (HHV-6) infection. *In Vivo* 1991;5:287-95.
101. Krueger GR, Wassermann K, De Clerck LS, Stevens WJ, Bourgeois N, Ablashi DV, et al. Latent herpesvirus-6 in salivary and bronchial glands. *Lancet* 1990;336:1255-6.
102. LaCroix S, Stewart JA, Thouless ME, Black JB. An immunoblot assay for detection of immunoglobulin M antibody to human herpesvirus 6. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7:823-7.
103. Lau YL, Peiris M, Chan GC, Chan AC, Chiu D, Ha SY. Primary human herpes virus 6 infection transmitted from donor to recipient through bone marrow infusion. *Bone Marrow Transplant* 1998;21:1063-6.
104. Laurendeau I, Bahau M, Vodovar N, Larramendy C, Olivi M, Bieche I, et al. TaqMan PCR-based gene dosage assay for predictive testing in individuals from a cancer family with INK4 locus haploinsufficiency. *Clin Chem* 1999;45:982-6.
105. Lautenschlager I, Hockerstedt K, Linnauori K, Taskinen E. Human herpesvirus-6 infection after liver transplantation. *Clin Infect Dis* 1998;26:702-7.
106. Lautenschlager I, Linnauori K, Hockerstedt K. Human herpesvirus-6 antigenemia after liver transplantation. *Transplantation* 2000;69:2561-6.
107. Leong HN, Tuke PW, Tedder RS, Khanom AB, Eglin RP, Atkinson CE, et al. The prevalence of chromosomally integrated human herpesvirus 6 genomes in the blood of UK blood donors. *J Med Virol* 2007;79:45-51.
108. Levy JA, Ferro F, Greenspan D, Lennette ET. Frequent isolation of HHV-6 from saliva and high seroprevalence of the virus in the population. *Lancet* 1990;335:1047-50.

109. Li C, Goodrich JM, Yang X. Interferon-gamma (IFN-gamma) regulates production of IL-10 and IL-12 in human herpesvirus-6 (HHV-6)-infected monocyte/macrophage lineage. *Clin Exp Immunol* 1997;109:421-5.
110. Ljungman P, Wang FZ, Clark DA, Emery VC, Remberger M, Ringden O, et al. High levels of human herpesvirus 6 DNA in peripheral blood leucocytes are correlated to platelet engraftment and disease in allogeneic stem cell transplant patients. *Br J Haematol* 2000;111:774-81.
111. Luppi M, Barozzi P, Bosco R, Vallerini D, Potenza L, Forghieri F, et al. Human herpesvirus 6 latency characterized by high viral load: chromosomal integration in many, but not all, cells. *J Infect Dis* 2006;194:1020-1; author reply 1021-3.
112. Luppi M, Barozzi P, Morris C, Maiorana A, Garber R, Bonacorsi G, et al. Human herpesvirus 6 latently infects early bone marrow progenitors in vivo. *J Virol* 1999;73:754-9.
113. Luppi M, Marasca R, Barozzi P, Ferrari S, Ceccherini-Nelli L, Batoni G, et al. Three cases of human herpesvirus-6 latent infection: integration of viral genome in peripheral blood mononuclear cell DNA. *J Med Virol* 1993;40:44-52.
114. Lusso P. HHV-6 and the immune system: mechanisms of immunomodulation and viral escape. *J Clin Virol* 2006;37 Suppl 1:S4-10.
115. Lusso P, Gallo RC. Human herpesvirus 6. *Baillieres Clin Haematol* 1995;8:201-23.
116. Lusso P, Garzino-Demo A, Crowley RW, Malnati MS. Infection of gamma/delta T lymphocytes by human herpesvirus 6: transcriptional induction of CD4 and susceptibility to HIV infection. *J Exp Med* 1995;181:1303-10.
117. Lusso P, Malnati M, De Maria A, Balotta C, DeRocco SE, Markham PD, et al. Productive infection of CD4+ and CD8+ mature human T cell populations and clones by human herpesvirus 6. Transcriptional down-regulation of CD3. *J Immunol* 1991;147:685-91.
118. Lusso P, Markham PD, Tschauder E, di Marzo Veronese F, Salahuddin SZ, Ablashi DV, et al. In vitro cellular tropism of human B-lymphotropic virus (human herpesvirus-6). *J Exp Med* 1988;167:1659-70.
119. Lusso P, Salahuddin SZ, Ablashi DV, Gallo RC, Di Marzo Veronese F, Markham PD. Diverse tropism of HBLV (human herpesvirus 6). *Lancet* 1987;2:743.
120. Mace M, Manichanh C, Bonnafous P, Precigout S, Boutolleau D, Gautheret-Dejean A, et al. Real-time PCR as a versatile tool for investigating the susceptibility of human herpesvirus 6 to antiviral agents. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3021-4.
121. Mackenzie IR, Carrigan DR, Wiley CA. Chronic myelopathy associated with human herpesvirus-6. *Neurology* 1995;45:2015-7.
122. Maeda T, Okuno T, Hayashi K, Nagata M, Ueda M, Terashima K, et al. Outcomes of infants whose mothers are positive for human herpesvirus-6 DNA within the genital tract in early gestation. *Acta Paediatr Jpn* 1997;39:653-7.
123. Manichanh C, Grenot P, Gautheret-Dejean A, Debre P, Huraux JM, Agut H. Susceptibility of human herpesvirus 6 to antiviral compounds by flow cytometry analysis. *Cytometry* 2000;40:135-40.
124. Manichanh C, Olivier-Aubron C, Lagarde JP, Aubin JT, Bossi P, Gautheret-Dejean A, et al. Selection of the same mutation in the U69 protein kinase gene of human herpesvirus-6 after prolonged exposure to ganciclovir in vitro and in vivo. *J Gen Virol* 2001;82:2767-76.
125. McGavin JK, Goa KL. Ganciclovir: an update of its use in the prevention of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Drugs* 2001;61:1153-83.
126. Mendez JC, Dockrell DH, Espy MJ, Smith TF, Wilson JA, Harmsen WS, et al. Human beta-herpesvirus interactions in solid organ transplant recipients. *J Infect Dis* 2001;183:179-184.
127. Mirandola P, Menegazzi P, Merighi S, Ravaioli T, Cassai E, Di Luca D. Temporal mapping of transcripts in herpesvirus 6 variants. *J Virol* 1998;72:3837-44.

128. Montejo M, Ramon Fernandez J, Testillano M, Valdivieso A, Aguirrebengoa K, Varas C, et al. Encephalitis caused by human herpesvirus-6 in a liver transplant recipient. *Eur Neurol* 2002;48:234-5.
129. Mookerjee BP, Vogelsang G. Human herpes virus-6 encephalitis after bone marrow transplantation: successful treatment with ganciclovir. *Bone Marrow Transplant* 1997;20:905-6.
130. Moore PS, Gao SJ, Dominguez G, Cesarman E, Lungu O, Knowles DM, et al. Primary characterization of a herpesvirus agent associated with Kaposi's sarcomae. *J Virol* 1996;70:549-58.
131. Mori Y. Recent topics related to human herpesvirus 6 cell tropism. *Cell Microbiol* 2009;11:1001-6.
132. Mori Y, Akkapaiboon P, Yang X, Yamanishi K. The human herpesvirus 6 U100 gene product is the third component of the gH-gL glycoprotein complex on the viral envelope. *J Virol* 2003a;77:2452-8.
133. Mori Y, Akkapaiboon P, Yonemoto S, Koike M, Takemoto M, Sadaoka T, et al. Discovery of a second form of tripartite complex containing gH-gL of human herpesvirus 6 and observations on CD46. *J Virol* 2004;78:4609-16.
134. Mori Y, Seya T, Huang HL, Akkapaiboon P, Dhepkason P, Yamanishi K. Human herpesvirus 6 variant A but not variant B induces fusion from without in a variety of human cells through a human herpesvirus 6 entry receptor, CD46. *J Virol* 2002;76:6750-61.
135. Mori Y, Yang X, Akkapaiboon P, Okuno T, Yamanishi K. Human herpesvirus 6 variant A glycoprotein H-glycoprotein L-glycoprotein Q complex associates with human CD46. *J Virol* 2003b;77:4992-9.
136. Morris C, Luppi M, McDonald M, Barozzi P, Torelli G. Fine mapping of an apparently targeted latent human herpesvirus type 6 integration site in chromosome band 17p13.3. *J Med Virol* 1999;58:69-75.
137. Morris DJ, Littler E, Arrand JR, Jordan D, Mallick NP, Johnson RW. Human herpesvirus 6 infection in renal-transplant recipients. *N Engl J Med* 1989;320:1560-1.
138. Mukai T, Yamamoto T, Kondo T, Kondo K, Okuno T, Kosuge H, et al. Molecular epidemiological studies of human herpesvirus 6 in families. *J Med Virol* 1994;42:224-7.
139. Nacheva EP, Ward KN, Brazma D, Virgili A, Howard J, Leong HN, et al. Human herpesvirus 6 integrates within telomeric regions as evidenced by five different chromosomal sites. *J Med Virol* 2008;80:1952-8.
140. Nigro G, Luzi G, Krzysztofiak A, D'Orio F, Aiuti F. Detection of IgM antibodies to human herpesvirus 6 in Romanian children with nonprogressive human immunodeficiency virus disease. *Pediatr Infect Dis J* 1995;14:891-4.
141. Nii S, Yoshida M, Uno F, Kurata T, Ikuta K, Yamanishi K. Replication of human herpesvirus 6 (HHV-6): morphological aspects. *Adv Exp Med Biol* 1990;278:19-28.
142. Ogata M, Kikuchi H, Satou T, Kawano R, Ikewaki J, Kohno K, et al. Human herpesvirus 6 DNA in plasma after allogeneic stem cell transplantation: incidence and clinical significance. *J Infect Dis* 2006;193:68-79.
143. Okuno T, Higashi K, Shiraki K, Yamanishi K, Takahashi M, Kokado Y, et al. Human herpesvirus 6 infection in renal transplantation. *Transplantation* 1990;49:519-22.
144. Okuno T, Oishi H, Hayashi K, Nonogaki M, Tanaka K, Yamanishi K. Human herpesviruses 6 and 7 in cervixes of pregnant women. *J Clin Microbiol* 1995;33:1968-70.
145. Okuno T, Sao H, Yamanishi K. [Human herpes virus 6 (HHV-6)]. *Uirusu* 1991;41:65-76.
146. Okuno T, Shao H, Asada H, Shiraki K, Takahashi M, Yamanishi K. Analysis of human herpesvirus 6 glycoproteins recognized by monoclonal antibody OHV1. *J Gen Virol* 1992;73 (Pt 2):443-7.

147. Parker CA, Weber JM. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of IgG and IgM antibodies to human herpesvirus type 6. *J Virol Methods* 1993;41:265-75.
148. Paterson DL, Singh N, Gayowski T, Carrigan DR, Marino IR. Encephalopathy associated with human herpesvirus 6 in a liver transplant recipient. *Liver Transpl Surg* 1999;5:454-5.
149. Pedersen SM, Oster B, Bundgaard B, Hollsberg P. Induction of cell-cell fusion from without by human herpesvirus 6B. *J Virol* 2006;80:9916-20.
150. Potenza L, Barozzi P, Masetti M, Pecorari M, Bresciani P, Gautheret-Dejean A, et al. Prevalence of human herpesvirus-6 chromosomal integration (CIHHV-6) in Italian solid organ and allogeneic stem cell transplant patients. *Am J Transplant* 2009;9:1690-7.
151. Qavi HB, Green MT, Lewis DE, Hollinger FB, Pearson G, Ablashi DV. HIV-1 and HHV-6 antigens and transcripts in retinas of patients with AIDS in the absence of human cytomegalovirus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:2040-7.
152. Radonic A, Oswald O, Thulke S, Brockhaus N, Nitsche A, Siegert W, et al. Infections with human herpesvirus 6 variant B delay platelet engraftment after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2005;131:480-2.
153. Ranger S, Patillaud S, Denis F, Himmich A, Sangare A, M'Boup S, et al. Seroepidemiology of human herpesvirus-6 in pregnant women from different parts of the world. *J Med Virol* 1991;34:194-8.
154. Rapaport D, Engelhard D, Tagger G, Or R, Frenkel N. Antiviral prophylaxis may prevent human herpesvirus-6 reactivation in bone marrow transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2002;4:10-6.
155. Rapp JC, Krug LT, Inoue N, Dambaugh TR, Pellett PE. U94, the human herpesvirus 6 homolog of the parvovirus nonstructural gene, is highly conserved among isolates and is expressed at low mRNA levels as a spliced transcript. *Virology* 2000;268:504-16.
156. Reux I, Fillet AM, Agut H, Katlama C, Hauw JJ, LeHoang P. In situ detection of human herpesvirus 6 in retinitis associated with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Ophthalmol* 1992;114:375-7.
157. Reymen D, Naesens L, Balzarini J, Holy A, Dvorakova H, De Clercq E. Antiviral activity of selected acyclic nucleoside analogues against human herpesvirus 6. *Antiviral Res* 1995;28:343-57.
158. Rieux C, Gautheret-Dejean A, Challine-Lehmann D, Kirch C, Agut H, Vernant JP. Human herpesvirus-6 meningoencephalitis in a recipient of an unrelated allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 1998;65:1408-11.
159. Robert C, Aubin JT, Visse B, Fillet AM, Huraux JM, Agut H. Difference in permissiveness of human fibroblast cells to variants A and B of human herpesvirus-6. *Res Virol* 1996;147:219-25.
160. Rogers J, Rohal S, Carrigan DR, Kusne S, Knox KK, Gayowski T, et al. Human herpesvirus-6 in liver transplant recipients: role in pathogenesis of fungal infections, neurologic complications, and outcome. *Transplantation* 2000;69:2566-73.
161. Rossi C, Delforge ML, Jacobs F, Wissing M, Pradier O, Remmelink M, et al. Fatal primary infection due to human herpesvirus 6 variant A in a renal transplant recipient. *Transplantation* 2001;71:288-92.
162. Rotola A, Ravaioli T, Gonelli A, Dewhurst S, Cassai E, Di Luca D. U94 of human herpesvirus 6 is expressed in latently infected peripheral blood mononuclear cells and blocks viral gene expression in transformed lymphocytes in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:13911-6.
163. Safronetz D, Petric M, Tellier R, Parvez B, Tipples GA. Mapping ganciclovir resistance in the human herpesvirus-6 U69 protein kinase. *J Med Virol* 2003;71:434-9.

164. Salahuddin SZ, Ablashi DV, Markham PD, Josephs SF, Sturzenegger S, Kaplan M, et al. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science* 1986;234:596-601.
165. Santoro F, Kennedy PE, Locatelli G, Malnati MS, Berger EA, Lusso P. CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell* 1999;99:817-27.
166. Sashihara J, Tanaka-Taya K, Tanaka S, Amo K, Miyagawa H, Hosoi G, et al. High incidence of human herpesvirus 6 infection with a high viral load in cord blood stem cell transplant recipients. *Blood* 2002;100:2005-11.
167. Savolainen H, Lautenschlager I, Piiparinen H, Saarinen-Pihkala U, Hovi L, Vettenranta K. Human herpesvirus-6 and -7 in pediatric stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer* 2005;45:820-5.
168. Simmons A, Demmrich Y, La Vista A, Smith K. Replication of human herpesvirus 6 in epithelial cells in vitro. *J Infect Dis* 1992;166:202-5.
169. Singh N, Carrigan DR. Human herpesvirus-6 in transplantation: an emerging pathogen. *Ann Intern Med* 1996;124:1065-71.
170. Singh N, Carrigan DR, Gayowski T, Marino IR. Human herpesvirus-6 infection in liver transplant recipients: documentation of pathogenicity. *Transplantation* 1997;64:674-8.
171. Singh N, Carrigan DR, Gayowski T, Singh J, Marino IR. Variant B human herpesvirus-6 associated febrile dermatosis with thrombocytopenia and encephalopathy in a liver transplant recipient. *Transplantation* 1995;60:1355-7.
172. Singh N, Paterson DL. Encephalitis caused by human herpesvirus-6 in transplant recipients: relevance of a novel neurotropic virus. *Transplantation* 2000;69:2474-9.
173. Sobue R, Miyazaki H, Okamoto M, Hirano M, Yoshikawa T, Suga S, et al. Fulminant hepatitis in primary human herpesvirus-6 infection. *N Engl J Med* 1991;324:1290.
174. Soldan SS, Jacobson S. Role of viruses in etiology and pathogenesis of multiple sclerosis. *Adv Virus Res* 2001;56:517-55.
175. Suga S, Suzuki K, Ihira M, Furukawa H, Yoshikawa T, Asano Y. [Clinical features of primary HHV-6 and HHV-7 infections]. *Nippon Rinsho* 1998;56:203-7.
176. Suga S, Yoshikawa T, Asano Y, Nakashima T, Yazaki T, Fukuda M, et al. IgM neutralizing antibody responses to human herpesvirus-6 in patients with exanthem subitum or organ transplantation. *Microbiol Immunol* 1992;36:495-506.
177. Sumiyoshi Y, Kikuchi M, Ohshima K, Takeshita M, Eizuru Y, Minamishima Y. A case of human herpesvirus-6 lymphadenitis with infectious mononucleosis-like syndrome. *Pathol Int* 1995;45:947-51.
178. Takahashi K, Sonoda S, Higashi K, Kondo T, Takahashi H, Takahashi M, et al. Predominant CD4 T-lymphocyte tropism of human herpesvirus 6-related virus. *J Virol* 1989;63:3161-3.
179. Takeda K, Okuno T, Isegawa Y, Yamanishi K. Identification of a variant A-specific neutralizing epitope on glycoprotein B (gB) of human herpesvirus-6 (HHV-6). *Virology* 1996;222:176-83.
180. Tanaka-Taya K, Sashihara J, Kurahashi H, Amo K, Miyagawa H, Kondo K, et al. Human herpesvirus 6 (HHV-6) is transmitted from parent to child in an integrated form and characterization of cases with chromosomally integrated HHV-6 DNA. *J Med Virol* 2004;73:465-73.
181. Tanaka M, Taguchi J, Hyo R, Kawano T, Hashimoto C, Motomura S, et al. Human herpesvirus-6 encephalitis after unrelated cord blood transplantation. *Leuk Lymphoma* 2005;46:561-6.
182. Taniguchi T, Shimamoto T, Isegawa Y, Kondo K, Yamanishi K. Structure of transcripts and proteins encoded by U79-80 of human herpesvirus 6 and its subcellular localization in infected cells. *Virology* 2000;271:307-20.

183. Thomson BJ, Dewhurst S, Gray D. Structure and heterogeneity of the a sequences of human herpesvirus 6 strain variants U1102 and Z29 and identification of human telomeric repeat sequences at the genomic termini. *J Virol* 1994;68:3007-14.
184. Tacci E, Luppi M, Barozzi P, Gurdo G, Tabilio A, Ballanti S, et al. Fatal herpesvirus-6 encephalitis in a recipient of a T-cell-depleted peripheral blood stem cell transplant from a 3-loci mismatched related donor. *Haematologica* 2000;85:94-7.
185. Tokimasa S, Hara J, Osugi Y, Ohta H, Matsuda Y, Fujisaki H, et al. Ganciclovir is effective for prophylaxis and treatment of human herpesvirus-6 in allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002;29:595-8.
186. Torelli G, Barozzi P, Marasca R, Cocconcelli P, Merelli E, Ceccherini-Nelli L, et al. Targeted integration of human herpesvirus 6 in the p arm of chromosome 17 of human peripheral blood mononuclear cells in vivo. *J Med Virol* 1995;46:178-88.
187. Torre D, Mancuso R, Ferrante P. Pathogenic mechanisms of meningitis/encephalitis caused by human herpesvirus-6 in immunocompetent adult patients. *Clin Infect Dis* 2005;41:422-3.
188. Torrisi MR, Gentile M, Cardinali G, Cirone M, Zompetta C, Lotti LV, et al. Intracellular transport and maturation pathway of human herpesvirus 6. *Virology* 1999;257:460-71.
189. Ueda K, Kusuhara K, Hirose M, Okada K, Miyazaki C, Tokugawa K, et al. Exanthem subitum and antibody to human herpesvirus-6. *J Infect Dis* 1989;159:750-2.
190. van Loon NM, Gummuluru S, Sherwood DJ, Marentes R, Hall CB, Dewhurst S. Direct sequence analysis of human herpesvirus 6 (HHV-6) sequences from infants and comparison of HHV-6 sequences from mother/infant pairs. *Clin Infect Dis* 1995;21:1017-9.
191. Wang LR, Dong LJ, Lu DP. [Prevalence of human herpesvirus-6 in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients in correlation with cytomegalovirus infection]. *Zhongguo Shi Yan Xue Za Zhi* 2006;14:1204-9.
192. Wang LR, Dong LJ, Zhang MJ, Lu DP. Correlations of human herpesvirus 6B and CMV infection with acute GVHD in recipients of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2008;42:673-7.
193. Ward KN, Gray JJ. Primary human herpesvirus-6 infection is frequently overlooked as a cause of febrile fits in young children. *J Med Virol* 1994;42:119-23.
194. Ward KN, Leong HN, Nacheva EP, Howard J, Atkinson CE, Davies NW, et al. Human herpesvirus 6 chromosomal integration in immunocompetent patients results in high levels of viral DNA in blood, sera, and hair follicles. *J Clin Microbiol* 2006;44:1571-4.
195. Ward KN, Thiruchelvam AD, Couto-Parada X. Unexpected occasional persistence of high levels of HHV-6 DNA in sera: detection of variants A and B. *J Med Virol* 2005;76:563-70.
196. Wilborn F, Brinkmann V, Schmidt CA, Neipel F, Gelderblom H, Siegert W. Herpesvirus type 6 in patients undergoing bone marrow transplantation: serologic features and detection by polymerase chain reaction. *Blood* 1994;83:3052-8.
197. Wu Z, Mu G, Wang L. Seroprevalence of human herpesvirus-6 in healthy population in two provinces of north China. *Chin Med Sci J* 1997;12:111-4.
198. Yamane A, Mori T, Suzuki S, Mihara A, Yamazaki R, Aisa Y, et al. Risk factors for developing human herpesvirus 6 (HHV-6) reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and its association with central nervous system disorders. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13:100-6.
199. Yamanishi K, Okuno T, Shiraki K, Takahashi M, Kondo T, Asano Y, et al. Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet* 1988;1:1065-7.

200. Yoshida H, Matsunaga K, Ueda T, Yasumi M, Ishikawa J, Tomiyama Y, et al. Human herpesvirus 6 meningoencephalitis successfully treated with ganciclovir in a patient who underwent allogeneic bone marrow transplantation from an HLA-identical sibling. *Int J Hematol* 2002;75:421-5.
201. Yoshida M, Uno F, Bai ZL, Yamada M, Nii S, Sata T, et al. Electron microscopic study of a herpes-type virus isolated from an infant with exanthem subitum. *Microbiol Immunol* 1989;33:147-54.
202. Yoshikawa T. Human herpesvirus 6 infection in hematopoietic stem cell transplant patients. *Br J Haematol* 2004;124:421-32.
203. Yoshikawa T, Asano Y. Central nervous system complications in human herpesvirus-6 infection. *Brain Dev* 2000;22:307-14.
204. Yoshikawa T, Asano Y, Ihira M, Suzuki K, Ohashi M, Suga S, et al. Human herpesvirus 6 viremia in bone marrow transplant recipients: clinical features and risk factors. *J Infect Dis* 2002;185:847-53.
205. Yoshikawa T, Ihira M, Furukawa H, Suga S, Asonuma K, Tanaka K, et al. Four cases of human herpesvirus 6 variant B infection after pediatric liver transplantation. *Transplantation* 1998;65:1266-9.
206. Yoshikawa T, Suga S, Asano Y, Nakashima T, Yazaki T, Sobue R, et al. Human herpesvirus-6 infection in bone marrow transplantation. *Blood* 1991;78:1381-4.
207. Zerr DM, Corey L, Kim HW, Huang ML, Nguyen L, Boeckh M. Clinical outcomes of human herpesvirus 6 reactivation after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 2005;40:932-40.
208. Zerr DM, Gupta D, Huang ML, Carter R, Corey L. Effect of antivirals on human herpesvirus 6 replication in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002;34:309-17.
209. Zhao J, Fan H, Mu G, Shen X, Cheng X. Detection of human herpesvirus 6(HHV-6) DNA in salivary glands by the polymerase chain reaction. *Chin Med Sci J* 1997;12:126-8.

ANNEXES

Annexe 1: Analyse bibliographique comparative de la réactivation HHV-6 en post-allogreffe de CSH

Auteurs	Nombre de patients	Suivi post-greffe	Méthodes de détection virale	% réactivation	Facteurs de risque	Clinique
[de Pagter et al., 2008]	58	12	PCR (plasma) quantitative en temps réel hebdomadaire	67	NS	GVHA et GVHC
[de Pagter et al., 2008]	49	5	PCR (plasma) quantitative en temps réel hebdomadaire	56	Conditionnement myeloablatif	GVHA, mortalité
[Yamane et al., 2007]	46	5	PCR (plasma) quantitative en temps réel hebdomadaire	48	Greffon de sang de cordon, incompatibilité HLA donneur, prophylaxie par tacrolimus	Réactivation CMV
[Ogata et al., 2006]	50	7	PCR (plasma) quantitative en temps réel hebdomadaire	48	Incompatibilité HLA	Thrombopénie
[Wang et al., 2006]	72	12	PCR (PBMC) quantitative en temps réel hebdomadaire	49	NT	Rash cutané, réactivation CMV
[Hentrich et al., 2005]	228	20	PCR (lymphocytes) quantitative en temps réel hebdomadaire	42	Parenté du donneur	GVHD, réactivation EBV
[Sashihara et al., 2002]	27	17	PCR (PBMC) semi-quantitative hebdomadaire	59	Greffon de sang de cordon	NS
[Zerr et al., 2005]	110	13	PCR (plasma) en temps réel hebdomadaire	47	Différence sexe donneur/receveur, hémopathie maligne, jeune âge, corticoïdes	Thrombopénie, mortalité, sévérité GVHA, dysfonctionnement du SNC
[Miyoshi et al., 2001]	25	12	PCR (PBMC) semi-quantitative, sérologie	68	/	/
[Ljungman et al., 2000]	74	12	PCR (lymphocytes)	78	Parenté du donneur, SAL	thrombopénie

Auteurs	Nombre de patients	Suivi post-greffe	Méthodes de détection virale	% réactivation	Facteurs de risque	Clinique
[Imbert-Marcille et al., 2000]	28	13	PCR (PBMC) hebdomadaire	43	greffon	Fièvre, anémie, neutropénie et thrombopénie
[Yoshikawa et al., 1998]	30	8	PCR (PBMC), sérologie	57	/	/
[Chan et al., 1997]	43	12	PCR (lymphocytes)	26	NS	NS
[Wang et al., 1996]	37	52	PCR (leucocytes)	70	/	/
[Kadakia et al., 1996]	15	/	Isolement viral (PBMC), PCR, sérologie	87	CMV infection, sinusites	NS
[Appleton et al., 1995]	34	12	PCR (lymphocytes)	76	NT	GVHA
[Wilborn et al., 1994]	36	10	PCR (leucocytes), PCR (urines), PCR(lavages buccaux)	72	NS	GVHA
[Frenkel et al., 1994]	44	12	Isolement viral (PBMC)	41	/	/
[Drobyski et al., 1993]	16	14	Isolement viral (PBMC)	37	/	/
[Yoshikawa et al., 1991]	25	8	Isolement viral (PBMC), sérologie	48	/	/

NT Non Testé

NS Non Significatif

Annexe 2 : Protocole d'extraction de l'ADN à partir du sang total à l'aide du Kit Qiagen,
QIAamp® DNA Blood Mini Kit

❖ Dans un micro tube ajouter :

20 µL de protéase K
200 µL d'échantillon
200 µL de Buffer AL

Vortex 15 secondes
Incuber 10 minutes à 56°C
Centrifuger brièvement

❖ Ajouter 200 µL d'éthanol absolu (96-100%)

Vortex 15 secondes
Centrifuger brièvement

❖ Transférer le contenu de ce tube dans la colonne posée sur un tube

Bien fermer la colonne et centrifuger 6000g:1min
Jeter le tube

❖ Ajouter 500 µL AW1 Buffer dans la colonne

Centrifuger 6000g/1min/18°C
Jeter le tube

❖ Ajouter 500 µL AW2 Buffer dans la colonne

Centrifuger 20 000g/3min/18°C
Jeter le tube
Poser la colonne sur le tube final (tube Eppendorf 1,5 mL)

❖ Ajouter 200 µL Buffer AE chauffé au bain marie à 70°C 10 minutes

Incuber à température ambiante 1 minute
Centrifuger à 6000g/1min
L'ADN extrait est conservé à -80°C

Annexe 3 : Protocole d'extraction de l'ADN à partir d'une biopsie à l'aide du Kit Qiagen,
QIAamp® DNA Blood Mini Kit

❖ Dans un micro tube ajouter :

15 µL de protéase K

200 µL d'échantillon préalablement broyé dans 500 µL d'eau stérile

100 µL de Buffer AL

Incubation 3 heures minimum au bain-marie à 56°C

Le reste de l'échantillon est conservé à -80°C.

❖ Après les 3 heures d'incubation

Centrifugation courte

Ajouter 10 µL de contrôle interne (IC2)

Ajouter 200 µL de buffer AL

Vortex 15 secondes

Incubation 10 minutes à 70°C

Centrifugation courte

❖ Ajouter 200 µL d'éthanol absolu (96-100%)

Vortex 15 secondes

Centrifugation courte

❖ Transférer le contenu de ce tube dans la colonne posée sur un tube

Bien fermer la colonne et centrifuger 6000g:1min

Jeter le tube

❖ Ajouter 500 µL AW1 Buffer dans la colonne

Centrifuger 6000g/1min/18°C

Jeter le tube

❖ Ajouter 500 µL AW2 Buffer dans la colonne

Centrifuger 12000g/3min/18°C

Jeter le tube

Centrifuger à vide 12000g/1min/18°C

Poser la colonne sur le tube final (tube Eppendorf 1,5 mL)

❖ Ajouter 100 µL Buffer AE chauffé au bain marie à 70°C 10 minutes

Incuber à température ambiante 5 minutes

Centrifuger à 6000g/1min

L'ADN extrait est conservé à -80°C

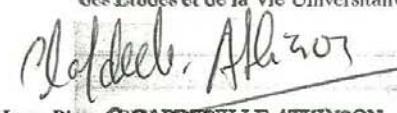
Annexe 4 : Extraction ADN sur MagNA pure LC®



- 1) L'échantillon est placé dans le puits adéquat
- 2) Ajout protéinase K, digestion des protéines
- 3) Ajout Lysis/Binding Bufferis, lyse cellulaire complète, libération de l'ADN, dénaturation des protéines
- 4) Ajouts des particules magnétiques (MGPs Magntic Glass Particles), les conditions induites par les agents chaotropiques, l'isopropanol et le pouvoir ionisant du Lysis/Binding Bufferis sont telles que l'ADN se fixe sur la silice présente à la surface de ces particules.
- 5) Séparation magnétique des MGPs avec l'ADN lié du reste du lysat
- 6) Purification de l'ADN lié et élimination des nucléases, membranes cellulaires, inhibiteurs de PCR et agents chaotropiques par une série de lavages successifs
- 7) Elimination du tampon de lavage
- 8) Elution de l'ADN purifié à 70°C

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 04/10/2010

<p>DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</p> <p>présenté par GUERY Matthieu</p> <p><u>Sujet :</u> "Incidence, facteurs de risque et diagnostic de l'infection à herpèsvirus humain 6 après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques à l'ère de la biologie moléculaire"</p> <p><u>Jury :</u></p> <p>Président : Pr GANTZER Christophe Professeur à la faculté de Pharmacie</p> <p>Directeur : Dr VENARD Véronique Maître de conférences</p> <p>Juges : Pr BORDIGONI Pierre Professeur à la faculté de Médecine Dr JEULIN Hélène Assistant hospitalo-universitaire Dr AGRINIER Nelly Assistant hospitalo-universitaire</p>	<p>Vu, Nancy, le 7/08/2010</p> <p>Le Président du Jury Le Directeur de Thèse</p> <p>M. GANTZER </p> <p>M. VENARD Véronique </p>
<p>Vu et approuvé, Nancy, le 13 SEP. 2010</p> <p>Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,</p> <p><i>Le Vice Doyen,</i>  Francine PAULUS</p>	<p>Vu, Nancy, le 28.09.2010</p> <p>Le Président de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1, Pour le Président et par Délegation, La Vice-Présidente du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire  Jean-Pierre CHAPTEAUX-ATKINSON</p>

N° d'enregistrement : 3413

N° d'identification :

TITRE

**INCIDENCE, FACTEURS DE RISQUES ET DIAGNOSTIC DES INFECTIONS A
HERPESVIRUS HUMAIN 6 APRES ALLOGREFFE DE CELLULES SOUCHES
HEMATOPOIETIQUES A L'ERE DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE**

Thèse soutenue le 04 Octobre 2010
par Matthieu GUERY

RESUME :

Comme tous les herpèsvirus, l'herpèsvirus humain 6 (HHV-6) reste à l'état latent dans l'organisme après la primo-infection. Les réactivations virales qui découlent de cette latence peuvent être potentiellement graves chez les patients immunodéprimés et nécessitent un suivi virologique régulier, assuré aujourd'hui par la biologie moléculaire. La découverte récente d'une autre forme de persistance de l'HHV-6 sous forme intégrée au génome cellulaire a perturbé le diagnostic moléculaire des infections à HHV-6. Cette étude a consisté en l'analyse des réactivations à HHV-6 au sein d'une population allogreffée de CSH de 390 patients. 57 patients ont eu au moins une charge virale positive dans le sang total (incidence cumulative: 14,7% à J150), 65% (37/57) ont été asymptomatiques, et 35% (20/57) ont présenté des symptômes: encéphalites (2), cytopénies (6), fièvres (3) et œsophagites (1). Les facteurs de risques associés à la réactivation HHV-6 ont été la greffe de sang de cordon ($p < 0,0001$) et la GVHA ≥ 2 ($p = 0,0152$). Trois cas d'intégration génomique de l'HHV-6 ont été décrits. Un algorithme biologique de prise en charge des infections à HHV-6 après allogreffe de CSH a été établi à partir de trois paramètres: charge virale HHV-6 $\geq 10^6$ copies/mL (1copie/cellule) ou $< 10^6$ copies/mL (1copie/cellule), présence ou absence de signes cliniques, test thérapeutique positif ou négatif.

MOTS CLES :

Herpèsvirus humain 6-Diagnostic moléculaire-Réactivation virale-Facteurs de risque-Intégration-Algorithme

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
<u>Dr VENARD Véronique</u>	<u>Laboratoire de virologie</u> <u>CHU Nancy</u>	Expérimentale X Bibliographique X
		Thème 5

Thèmes 1 – Sciences fondamentales 2 – Hygiène/Environnement
 3 – Médicament 4 – Alimentation – Nutrition
 5 - Biologie 6 – Pratique professionnelle