



HAL
open science

Etude de la localisation de l'herpèsvirus humain de type 6 (HHV-6) dans les tissus hodgkiniens : recherche de l'expression de l'oncogène viral DR7 et de ses conséquences pour la cellule

Aurélie Lacroix

► To cite this version:

Aurélie Lacroix. Etude de la localisation de l'herpèsvirus humain de type 6 (HHV-6) dans les tissus hodgkiniens : recherche de l'expression de l'oncogène viral DR7 et de ses conséquences pour la cellule. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Limoges, 2008. Français. ⟨NNT : 2008LIMO4001⟩. ⟨tel-05327627⟩

HAL Id: tel-05327627

<https://hal.science/tel-05327627v1>

Submitted on 23 Oct 2025

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

UNIVERSITE DE LIMOGES
ECOLE DOCTORALE Science-Technologie-Santé
FACULTE des Sciences et Techniques

Année : 2008

Thèse N°[02-2008]

Thèse

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie-Sciences-Santé

Présentée et soutenue par

Melle Aurélie LACROIX

Le 8 février 2008

Etude de la localisation de l'herpèsvirus humain de type 6 (HHV-6)
dans les tissus hodgkiniens :
recherche de l'expression de l'oncogène viral DR7
et de ses conséquences pour la cellule

Thèse dirigée par Madame le Professeur Sylvie RANGER-ROGEZ

JURY :

Président :

Mr Franck STURTZ

Professeur des Universités, LIMOGES

Rapporteurs :

Mr Henri AGUT

Professeur des Universités, PARIS

Mr Vincent MARECHAL

Professeur des Universités, PARIS

Examineurs :

Mme Dominique BORDESSOULE

Professeur des Universités, LIMOGES

Mme Irène JOAB

Directeur de Recherche INSERM, PARIS

Mme Sylvie RANGER-ROGEZ

Professeur des Universités, LIMOGES

Membre invité :

Mr Gilbert CATANZANO

**Président de la Ligue contre le Cancer
comité Haute-Vienne**

UNIVERSITE DE LIMOGES
ECOLE DOCTORALE Science-Technologie-Santé
FACULTE des Sciences et Techniques

Année : 2008

Thèse N°[02-2008]

Thèse

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie-Sciences-Santé

Présentée et soutenue par

Melle Aurélie LACROIX

Le 8 février 2008

Etude de la localisation de l'herpèsvirus humain de type 6 (HHV-6)
dans les tissus hodgkiniens :
recherche de l'expression de l'oncogène viral DR7
et de ses conséquences pour la cellule

Thèse dirigée par Madame le Professeur Sylvie RANGER-ROGEZ

JURY :

Président :

Mr Franck STURTZ

Professeur des Universités, LIMOGES

Rapporteurs :

Mr Henri AGUT

Professeur des Universités, PARIS

Mr Vincent MARECHAL

Professeur des Universités, PARIS

Examineurs :

Mme Dominique BORDESSOULE

Professeur des Universités, LIMOGES

Mme Irène JOAB

Directeur de Recherche INSERM, PARIS

Mme Sylvie RANGER-ROGEZ

Professeur des Universités, LIMOGES

Membre invité :

Mr Gilbert CATANZANO

**Président de la Ligue contre le Cancer
comité Haute-Vienne**

*A mes parents,
A mes grands-parents maternels*

*Beau mot que celui de chercheur,
et si préférable à celui de savant !
Il exprime la saine attitude de l'esprit devant la vérité :
le manque plus que l'avoir,
le désir plus que la possession,
l'appétit plus que la satiété.*

Jean ROSTAND

REMERCIEMENTS

A l'issue de l'ensemble de ce travail, je tiens à remercier en premier lieu l'ensemble du jury de ma thèse.

⊗ Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma gratitude à Monsieur le Professeur Franck Sturtz d'avoir accepté de présider cette thèse. Votre curiosité et votre savoir m'ont permis d'aller de l'avant dans de nombreuses et parfois complexes situations. Soyez ici remercié de toute l'aide que vous avez pu m'apporter.

⊗ A vous, Madame le Professeur Sylvie Ranger-Rogez, je voulais témoigner ma profonde reconnaissance. Vous m'avez accueilli il y a déjà de ça 6 ans même si j'ai l'impression que c'était hier et j'ai beaucoup appris à vos côtés. Votre gentillesse et votre présence dans les moments délicats m'ont réellement beaucoup touché. Soyez assurée de toute mon amitié.

⊗ Je voudrai dire à Monsieur le Professeur Henri Agut l'immense honneur qu'il me fait en rapportant ce travail de thèse. Trouvez ici l'assurance de tout mon respect.

⊗ Mes plus sincères remerciements vont à l'égard de Monsieur le Professeur Vincent Maréchal d'avoir accepté de rapporter cette thèse.

⊗ Je remercie Madame le Docteur Irène Joab d'avoir bien voulu examiner ce travail de thèse. Votre don de cellules BJAB m'aura été d'une très grande aide.

⊗ Je voudrai témoigner ma profonde considération à Madame le Professeur Dominique Bordessoule d'avoir accepté de participer au jugement de ce travail de thèse.

⊗ Je remercie en dernier lieu Monsieur le Professeur Gilbert Catanzano d'avoir bien voulu être présent parmi ce jury de thèse. Qu'il soit assuré de toute ma gratitude. Je tiens par ailleurs à lui dire merci en temps que Président de la Ligue Contre le Cancer Comité Haute-Vienne qui a assuré mon financement tout au long de ces difficiles années de thèse.

Par la suite, je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à l'ensemble des membres du personnel du service de Bactériologie-Virologie du CHU de Limoges. Vous m'avez appris de nombreuses choses depuis mes débuts dans la recherche. Votre sympathie et votre réconfort m'ont été très bénéfique. Je pense également à Karine et Sophie qui m'ont beaucoup aidé à mes débuts.

Je tiens à remercier le service d'hématologie clinique pour m'avoir permis de mener à bien ce travail sur le lymphome de Hodgkin.

Je remercie également le service d'Anatomo-Pathologie et notamment Madame le Docteur Barbara Petit pour son aide précieuse dans l'interprétation des résultats concernant les coupes des patients atteints de lymphome de Hodgkin ainsi que les techniciennes de ce service (plus particulièrement Brigitte et Pascale) pour leur disponibilité, leur patience et leur gentillesse.

Mes remerciements vont aussi au service de Virologie de la faculté de Médecine de Tours et notamment à Monsieur le Docteur Denys Brand ainsi que Madame Delphine Fouquet qui m'ont été d'une grande aide dans l'apprentissage de la technique utilisant le virus de la forêt Semliki.

Je remercie la Ligue Contre le Cancer Comité Haute-Vienne, tous ses adhérents si sympathiques et surtout sa secrétaire Carine. Vous m'avez tous soutenus et fait chaud au cœur.

Je tiens à remercier mon laboratoire d'accueil celui de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie et tous ses membres : à vous Monsieur le Professeur Gilles Dreyfuss pour qui j'ai un profond respect, à vous Madame le Docteur Sylvie Delebassée pour nos nombreuses et chaleureuses discussions, à vous Madame le Docteur Jeanne Cook-Moreau pour votre gentillesse et toute l'aide que vous m'avez apporté dans la langue anglaise et enfin à vous Madame Roselyne Mouzet pour toute votre sympathie. Je remercie tous les laboratoires du quatrième étage de la faculté de médecine-pharmacie c'est-à-dire le laboratoire de Parasitologie mais aussi de Bactériologie-Virologie pour leurs petits services quotidiens. A cette occasion, je tiens à témoigner ma sympathie à Madame Martine Gatet.

Et puis voici le moment le plus difficile remercier ses amis et ses proches surtout sans en oublier !!

Alors je voulais tout d'abord dire merci pour leur soutien de tous les jours à mes collègues de travail qui sont aussi mes copains : Laurent, Lynda, Ludo, David L., Mac, Patrice, Clémentine, Clémence, Yves, Carine, Nathalie... Je n'oublie surtout pas PO et Ninie, vous savez combien vous me manquez surtout toi ma petite Ninie à qui j'ai si souvent confié mes problèmes. Par ailleurs, je tenais spécialement à citer certains d'entre eux : Lynda qui fait partie non seulement de mes copains mais aussi de mes amis en dehors du cadre de la

faculté, Ludo et David vos discussions notamment celles concernant le foot m'ont beaucoup divertie, Patrice ta constante et très agréable bonne humeur m'ont été d'un grand réconfort et enfin je ne saurais terminer sans remercier Laurent, tout comme Lynda, tu fais parti des personnes que je conserverai au-delà de cette partie de ma vie; merci pour ton soutien, pour m'avoir changé les idées dans les moments difficiles et merci de m'avoir supporté ainsi que mon caractère si souvent difficile et incompris. Je voulais également dire merci à tous mes gentils stagiaires; vous êtes tellement nombreux que je ne vous citerai pas tous je fais juste une spéciale dédicace à Géraldine, Elodie et Tony.

Je n'oublie pas non plus mes trois amies les plus chères : à toi Sarah pour ton amitié qui a su perdurer au-delà de cette année de cohabitation pendant notre DEA à Tours, à toi Nasslie pour nos longues conversations philosophiques et ce soutien mutuel pendant nos thèses respectives et enfin à toi Corinne la plus importante dans mon cœur pour ton soutien, ta gentillesse, ton amitié durable, pour tous les gros coups durs qu'on a subi ensemble : je pense très fort à toi et ta famille en écrivant tous ces mots.

Je voulais dire un grand merci à mes grands-parents : tout d'abord à ma grand-mère paternelle pour son enthousiasme, je pense en ce jour à la mémoire de mon grand-père paternel qui aurait certainement été très fier de moi; et surtout à mes grands-parents maternels et à mon grand-oncle pour leur soutien indéfectible, papi et mamie vous avez été d'une très grande aide sans vous en rendre compte et je ne peux concevoir de soutenir cette thèse sans votre présence.

Je voulais terminer en remerciant mes parents sans qui ce jour n'aurait pu être possible. Je les remercie de leurs encouragements, de leur aide, de toute leur affection qui m'a aidé à tenir le cap dans les moments difficiles. Papa, tu m'as appris la valeur et la passion du travail. Les difficultés ne t'ont pas épargné maman mais elles nous ont papa et moi permis d'être plus solides. Aujourd'hui, je soutiens cette thèse en votre honneur à tous les deux. Je vous aime très fort !!

Merci à tous....

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	4
SOMMAIRE	7
SOMMAIRE DES FIGURES	9
SOMMAIRE DES TABLEAUX	10
ABREVIATIONS	11
INTRODUCTION GENERALE	14
ENVIRONNEMENT BIBLIOGRAPHIQUE	17
L'HERPESVIRUS HUMAIN DE TYPE 6	18
I. Historique.....	18
II. Morphologie du virus	19
II-1. Ultrastructure.....	19
III. Caractéristiques biologiques du virus HHV-6	25
III-1. Tropisme cellulaire	25
III-2. Cycle réplicatif.....	26
III-3. Effet du virus sur les cellules-hôtes	30
III-4. Les protéines transactivatrices de l'HHV-6.....	31
IV. Manifestations cliniques	34
IV-1. Epidémiologie et transmission.....	34
IV-2. Infections virales.....	35
V. Immunité et apoptose	41
VI. Diagnostic	42
VI-1. Diagnostic direct.....	43
VI-2. Diagnostic indirect.....	44
VII. Traitements	46
VII-1. Les analogues nucléosidiques	46
VII-2. Analogue nucléotidique.....	48
VII-3. Analogue du pyrophosphate.....	49
VII-4. Efficacité et Avenir	50
LE VIRUS D'EPSTEIN ET BARR	51
I. Introduction sur le virus d'Epstein et Barr.....	51
II. Caractéristiques générales du virus d'Epstein et Barr	54
III. Infection latente et cycle réplicatif	54
III-1. La protéine de latence EBNA1	56
III-2. La protéine de latence LMP1	56
IV. Les principales maladies associées	59
IV-1. Le lymphome de Burkitt.....	59
IV-2. Le carcinome du naso-pharynx.....	60

LE LYMPHOME DE HODGKIN.....	61
I. Historique.....	61
II. Histopathologie.....	62
III. Epidémiologie	65
IV. Manifestations cliniques	66
IV-1. Symptômes	66
IV-2. Diagnostic	67
V. Biologie des cellules HRS	69
V-1. Origine des cellules HRS : le centre germinale	69
V-2. Les cellules HRS	72
V-3. Les mécanismes de transformation	74
V-4. Les mécanismes anti-apoptotiques.....	76
V-5. Les dérégulations des cytokines, des chimiokines et des membres de la famille du récepteur au TNF.....	77
VI. Implication virale	81
VI-1. Le virus d'Epstein et Barr.....	81
VI-2. L'herpèsvirus humain de type 6	83
VI-3. Le VIH.....	86
VII. Traitements	86
VII-1. Les traitements classiques	86
VII-2. Les traitements alternatifs et d'avenir	89
TRAVAIL EXPERIMENTAL.....	91
ARTICLE 1.....	93
ARTICLE 2.....	107
ARTICLE 3.....	140
ARTICLE 4.....	154
CONCLUSIONS PERSPECTIVES	173
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	176
ANNEXE	225

SOMMAIRE DES FIGURES

FIGURE 1 : SYED ZAKI SALAHUDDIN	18
FIGURE 2 : ULTRASTRUCTURE DES HERPÈSVIRUS	20
FIGURE 3 : ORGANISATION GÉNOMIQUE DE L'HHV-6	24
FIGURE 4 : CYCLE RÉPLICATIF	29
FIGURE 5 : EFFET CYTOPATHOGÈNE D'HHV-6	30
FIGURE 6 : PROFIL D'HYDROPHILIE DE DR7A PUIS B PAR LA MÉTHODE DE KYTE ET DOOLITTLE	32
FIGURE 7 : HOMOLOGIE ENTRE DR7B ET DR7A BASÉE SUR L'ALIGNEMENT ALIGN	32
FIGURE 8 : <i>EXANTHÈME SUBIT</i> DU NOURRISSON.....	35
FIGURE 9 : LES ANALOGUES NUCLÉOSIDIQUES UTILISÉS DANS LE TRAITEMENT DES INFECTIONS À HHV-6	47
FIGURE 10 : L'ANALOGUE NUCLÉOTIDIQUE UTILISÉ DANS LE TRAITEMENT DES INFECTIONS À HHV-6	48
FIGURE 11 : L'ANALOGUE DE PYROPHOSPHATE UTILISÉ DANS LE TRAITEMENT DES INFECTIONS À HHV-6	49
FIGURE 12 : UN ANALOGUE NON-NUCLÉOSIDIQUE D'AVENIR	50
FIGURE 13 : GÉNOME DU VIRUS D'EPSTEIN ET BARR	53
FIGURE 14 : STRUCTURE ET FONCTIONS DE LMP1	58
FIGURE 15 : THOMAS HODGKIN	61
FIGURE 16 : LYMPHOME DE HODGKIN CLASSIQUE ET SA CELLULE CARACTÉRISTIQUE : LA	64
CELLULE DE REED-STERNBERG.....	64
FIGURE 17 : PARAGRANULOME NODULAIRE ET SA CELLULE CARACTÉRISTIQUE : LA CELLULE LYMPHOCYTIQUE ET HISTIOCYTIQUE	65
FIGURE 18 : GÉNÉRATION DES CELLULES DE REED-STERNBERG.....	71
FIGURE 19 : VOIES DE SIGNALISATION INTERNES À LA CELLULE HRS	75
FIGURE 20 : LES CARACTÉRISTIQUES DE LA CELLULE HRS ET SON ENVIRONNEMENT CELLULAIRE... ..	80
FIGURE 21 : MOLÉCULES CHIMIOTHÉRAPEUTIQUES UTILISÉES DANS LE TRAITEMENT DU LYMPHOME DE HODGKIN	89
FIGURE 22 : GAMME ÉTALON POUR L'AMPLIFICATION DU GÈNE EBNA-1 DE L'EBV.....	105
FIGURE 23 : GAMME ÉTALON POUR L'AMPLIFICATION DU GÈNE U22 DE L'HHV-6	105
FIGURE 24 : STRUCTURE GÉNOMIQUE DU SEMLIKI FOREST VIRUS.....	108
FIGURE 25 : SCHÉMA DU PSFV1	109
FIGURE 26 : SCHÉMA RÉCAPITULATIF DE L'UTILISATION DU SEMLIKI FOREST VIRUS AFIN DE PRODUIRE LA PROTÉINE DR7B, PUIS DE L'OBTENTION FINALE DE L'ANTICORPS ANTI-DR7	111
FIGURE 27 : IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE EN PRÉSENCE D'ANTICORPS PRIMAIRE ANTI-HIS ₆ PUIS D'ANTICORPS ANTI-SOURIS COUPLÉ AU FITC RÉVÉLANT LA PRÉSENCE DE DR7.....	112
FIGURE 28 : WESTERN-BLOT EN PRÉSENCE D'ANTICORPS PRIMAIRE ANTI-HIS ₄ PUIS D'ANTICORPS SECONDAIRE ANTI-SOURIS HRP RÉVÉLANT LA PRÉSENCE DE DR7.....	112
FIGURE 29 : IMMUNOFLUORESCENCE VISUALISANT L'ONCOPROTÉINE DR7B DE L'HHV-6 EN MICROSCOPIE CONFOCALE.....	138
FIGURE 30 : WESTERN-BLOT ANTI-DR7B SUR LES FRACTIONS NUCLÉAIRES ET CYTOPLASMIQUES DE L'HHV-6B HST	139
FIGURE 31 : STRUCTURE DU PLASMIDE PTRIN76	154
FIGURE 32 : STRUCTURE DE L'INHIBITEUR Id2 ET INTERACTION AVEC E2A.....	156
FIGURE 33 : GAMME ÉTALON POUR L'AMPLIFICATION DU GÈNE DR7 DE L'HHV-6 DE TYPE B.....	171
FIGURE 34 : GAMME ÉTALON POUR L'AMPLIFICATION DU GÈNE Id2.....	171
FIGURE 35 : GAMME ÉTALON POUR L'AMPLIFICATION DU GÈNE CELLULAIRE GAPDH.....	172
FIGURE 36 : WESTERN-BLOT CIBLANT LA PROTÉINE DR7 DE LA SOUCHE HHV-6B HST	175

SOMMAIRE DES TABLEAUX

TABLEAU I : CARACTÉRISTIQUES DES 8 HERPÈSVIRUS HUMAINS	15
TABLEAU II : LES DIFFÉRENTS GÈNES DE L'HHV-6B HST ET LEURS FONCTIONS	21
TABLEAU III: LES DIFFÉRENTES MÉTHODES PERMETTANT LE DIAGNOSTIC D'HHV-6, LEURS AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS	45
TABLEAU IV : PRÉVALENCE DE L'HHV-6 PAR TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE SUR DES ADÉNOPATHIES DE PATIENTS ATTEINTS DE LYMPHOME DE HODGKIN	85

ABREVIATIONS

AAV-2 : *adeno-associated virus de type 2*, adénovirus associé de type 2
AKT : ou PKB protéine kinase B
ALK : *anaplastic lymphoma kinase*, kinase du lymphome anaplasique
AP1 : *activator protein 1*, protéine activatrice 1
BARF : BamHI-A right frame
BAX : *BCL-2-associated protein*, protéine associée à BCL-2
BCL : *B cell lymphoma*, lymphome des cellules B
BCR : *B-cell receptor*, récepteur des cellules B
BHK : *baby hamster kidney*, cellules de rein de hamster nouveau-né
bHLH : domaine basique HLH
BJAB : *Burkitt's lymphoma B-cell line*, lignée cellulaire B de lymphome de Burkitt
BMT : *bone marrow transplantation*, receveur de moelle osseuse
CCL : *chemokine C-C motif ligand*, ligand de la chimiokine au motif C-C
CCR : *chemokine C-C motif receptor*, récepteur de la chimiokine au motif C-C
CD : cellule dendritique
cFLIP : *cellular-fllice like inhibitory proteins*
Cp ou Wp : promoteur de EBNA-LP, 2, 3A, 3B, 3C
CRE : *cyclic adenosine monophosphate-responsive element*, élément répondant à l'adénosine monophosphate cyclique
CTAR : *C-terminal activating region*, région activatrice C-terminale
CV-1 : cellules rénales de singe
CXCL : *chemokine C-X-C motif ligand*, ligand de la chimiokine au motif C-X-C
DIHS : *Drug-Induced Hypersensitivity Syndrome*, syndrome d'hypersensibilité induite par des drogues
DL et DR : régions conservées contenant les oriLyt de l'EBV
DRs : *direct repeats*, régions répétées et orientées
DRESS : *drug reaction with eosinophilia and systemics symptoms*, éosinophilie et symptômes systémiques de réaction aux drogues
E : *early*, précoce
EBER : *EBV-encoded small RNA*, petits ARNs codant l'EBV
EBF : *early B-cell factor*, facteur de cellule B précoce
EBNA : *EBV nuclear antigen*, antigène nucléaire de l'EBV
EBNA-LP : *EBV nuclear antigen leader protein*, protéine leader des EBNA
EBV : *Epstein-Barr virus*, virus d'Epstein et Barr
ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*
ERK : *extracellular signal-regulated kinase*, kinase régulée par un signal extracellulaire
FAM : *6-carboxyfluorescein*
GAPDH : glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
HBLV : *human B-lymphotropic virus*, virus humain B-lymphotrope
HCMV : *human cytomegalovirus*, cytomégalovirus humain
HHV : *human herpesvirus*, herpèsvirus humain
HLA : *human leucocyte antigen*, antigène leucocytaire humain
HLH : *Helix loop helix*, hélice boucle hélice
HRS : Hodgkin et Reed-Sternberg
HSV : *human simplexvirus*, herpès simplex virus humain
IAP : *inhibitor of apoptosis protein*, protéine inhibitrice de l'apoptose
ICAM : *inter cellular adhesion molecule*, molécule d'adhésion inter cellulaire
Id2 : inhibiteur de la différenciation
IE : *immediate early*, très précoce
IFN : interféron
IκBα : inhibiteur de NFκB
IKK : *IκB kinase*, kinase de IκB
interféron γ IP-10 : *interferon γ-inducible protein 10*, protéine 10 inductible à l'interféron γ
IR : régions internes répétées
IRES : segment d'entrée interne des ribosomes

Jak : *Janus kinase*
JNK : *Jun N terminal kinase*
L : *late*, tardive
L et H : lymphocytaire et histiocytaire
LFA : *leucocyte function associated*, fonction associée aux leucocytes
LH : lymphome de Hodgkin
LJ : *left junction*, segment de jonction gauche
LMP : *latent membrane protein*, protéine membranaire de latence
LT : *left terminal*, segment terminal gauche
LTR : *long terminal repeat*
LTs : *latency-associated transcripts*, transcrits associés à la latence
MALT : *mucosa associated lymphoid tissue*, tissu lymphoïde associé à la muqueuse
MDC : *macrophage derivated chemokine*, chimiokine dérivant du macrophage
MEK : *mitogen-activated or extracellular signal-regulated protein kinase*, protéine kinase régulée par un signal extracellulaire ou une activité mitogène
MDM2 : *Murine double minute protein 2*
MGB : *minor groove binding*
MMP-2 : métalloprotéinase de matrice 2
MUM-1 : *mutiple myeloma oncogene-1*, oncogène 1 du myélome multiple
MTT : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
Neo^R : gène de résistance à la néomycine
NFAT : *nuclear factor of activated T-cells*, facteur nucléaire des cellules T activées
NFκB : *nuclear factor kappa B*, facteur nucléaire kappa B
NIH3T3 : cellules fibroblastiques de souris
NK : *Natural Killer*
nsP : protéine non structurale
ori-lyt : origine de réplication lytique
ori P : origine de réplication latente
Pax-5 : *paired homeobox-5*
PI3 kinase : phosphoinositide 3-kinase
PBMCs : cellules mononucléées du sang périphérique
Qp : promoteur de EBNA1
R1, 2, 3 : répétitions internes 1, 2 et 3
RANK : *receptor activator of NFκB*, récepteur activateur de NFκB
REAL : *Revised European American Lymphoma*
RIP : *receptor interacting protein*, protéine interagissant avec le récepteur
RJ : *right junction*, segment de jonction droite
RS : Reed-Sternberg
RTS : *rapid translation system*
Sf9 : *Spodoptera frugiperda*
SFV : *Semliki forest virus*, virus de la forêt Semliki
SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise
SNC : système nerveux central
SOT : *solid organ transplantation*, receveurs d'organes solides
STAT : *signal transducers and activators of transcription*, transducteurs de signaux et activateurs de transcription
SV40 : *simian virus 40*
TAMRA : *6-carboxytetramethylrhodamine*
TARC : *thymus and activation-regulated chemokine*, chimiokine du thymus à activation régulée
TES : *transformation effector site*, site effecteur de la transformation
TGFβ : *transforming growth factor β*, facteur de croissance transformant β
TIMP1 : inhibiteur tissulaire de métalloprotéinase 1
TNF : *tumor necrosis factor*, facteur nécrosant les tumeurs
TNFR : *tumor necrosis factor receptor*, récepteur au TNF
TR : *terminal repeat*, région terminale répétée
TRADD : *TNFR associated death domain*, domaine de mort associé au TNFR
TRAF : *tumor necrosis factor receptor-associated factor*, facteur associé au récepteur au TNF
TRAIL : *TNF-related apoptosis-inducing ligand*, ligand induisant l'apoptose en rapport avec le TNF

TRIP : promoteur inductible et répressible à la tétracycline
ttA : protéine transactivatrice
U : région unique
UT : *untranslated*, non transcrites
VCA : *virus capsid antigen*, antigène viral de capside
VEGF : *vascular endothelial growth factor*, facteur de croissance endothélial vasculaire
VIH : virus de l'immunodéficience humaine
VZV : *varicella zoster virus*, virus de la varicelle et du zona
WHO : *World Health Organization*, organisation mondiale de la santé (OMS)
XIAP : *X-chromosome-linked IAP*, protéine inhibitrice de l'apoptose liée au chromosome X

INTRODUCTION GENERALE

Les herpèsvirus appartiennent à la famille des *Herpesviridae* regroupant plus de 100 virus connus, infectant les animaux ou les êtres humains (Braun et al., 1997). Parmi cette grande famille, il existe huit membres strictement humains. Il s'agit des deux herpès simplex virus (HSV-1 et HSV-2), du virus de la varicelle et du zona ou VZV (herpèsvirus humain de type 3 ou HHV-3), du virus d'Epstein et Barr ou EBV (herpèsvirus humain de type 4 ou HHV-4), du cytomégalovirus humain ou HCMV (herpèsvirus humain de type 5 ou HHV-5) et des herpèsvirus humains de type 6 (HHV-6), 7 (HHV-7) et 8 (HHV-8) (Tableau I). Leur regroupement en 3 sous-familles nommées α -, β - et γ -herpesvirinae est basé sur différents critères tels que la taille et la structure du génome, les caractéristiques de culture *in vitro*, la durée du cycle de réplication et enfin le site de latence *in vivo* (De Bolle et al., 2005). La caractéristique commune portée par l'ensemble de ces virus est une contamination lors d'une primo-infection qui est toujours suivie d'une phase de latence pouvant être entrecoupée de réactivations (Krueger et Ablashi, 2003).

L'herpèsvirus humain de type 6 a fait l'objet de ce travail de thèse. Il présente deux variants A et B tous deux ayant des caractères lymphotropiques. L'HHV-6B a été trouvé dans divers lymphomes (Razzaque, 1990; Salahuddin, 1992) et particulièrement dans le lymphome de Hodgkin (LH) (Torelli et al., 1991).

L'objectif de ce travail a été d'étudier la localisation de l'HHV-6 dans les tissus hodgkiniens, l'expression de l'oncoprotéine virale DR7 de l'HHV-6B et les conséquences qu'elle entraîne pour la cellule.

Après une revue de la littérature concernant l'HHV-6 puis le lymphome de Hodgkin ainsi que leur association, le travail de thèse à proprement parler sera présenté. Il sera globalement divisé en 2 parties :

<i>VIRUS</i>	<i>Sous-famille</i>	<i>% de la population adulte infectée</i>	<i>Taille du génome (kb)</i>	<i>% G+C</i>	<i>Culture in vitro</i>	<i>Site de latence</i>	<i>Principales pathologies associées</i>
<i>HSV-1</i>	α	70	152	67	Nombreux systèmes cellulaires	Ganglions sensitifs	- herpès labial - encéphalites sévères - kératites
<i>HSV-2</i>	α	20	152	69			- herpès génital - herpès néonatal disséminé
<i>VZV</i>	α	90	126	46			Fibroblastes humains - varicelle - zona
<i>HCMV</i>	β	40	229	57	Fibroblastes humains	Monocytes, lymphocytes, endothélium des vaisseaux	- syndromes mononucléosiques - maladie des inclusions cytomégaliqes - infections de l'immunodéprimé
<i>HHV-6 A</i>	β	> 95 après l'âge de 2 ans pour l'un ou les 2 virus	140-170	43	Lymphoblastes et lymphocytes humains		- pathologies neurologiques
<i>HHV-6 B</i>	β						- roséole infantile
<i>HHV-7</i>	β						> 85
<i>EBV</i>	γ	> 95	172	60	Lignées cellulaires de lymphocytes B	Lymphocytes B	- mononucléose infectieuse - lymphome de Burkitt - lymphome de Hodgkin (40% des cas) - carcinomes nasopharyngés
<i>HHV-8</i>	γ	< 5% jusqu'à 70% (dépend des régions du globe)	140	54		Lymphocytes	- sarcome de Kaposi associé au SIDA - maladie de Castleman multicentrique - lymphome des séreuses

Tableau I : Caractéristiques des 8 herpèsvirus humains

La première partie présente les résultats obtenus pour un panel de patients atteints de lymphome de Hodgkin.

✿ Tout d'abord, ce panel a été étudié par PCR quantitative en temps réel pour rechercher la positivité vis-à-vis de deux herpèsvirus, l'un connu comme impliqué dans le lymphome de Hodgkin, l'EBV, et l'autre dont le rôle dans cette pathologie est plus controversé dans la littérature : l'HHV-6.

✿ Seuls les échantillons présentant une positivité pour l'HHV-6 ont dans un deuxième temps été conservés afin de rechercher la présence du virus dans la cellule de Reed-Sternberg (RS), caractéristique du lymphome de Hodgkin, puis d'étudier l'expression de la protéine DR7 dans cette cellule. Pour ce dernier aspect un anticorps anti-DR7 a été produit et testé par immuno-histochimie sur les coupes anatomo-pathologiques des adénopathies des patients étudiés.

✿ Enfin, un double marquage pour révéler les oncogènes viraux DR7 du virus HHV-6 et LMP1 du virus EBV a été réalisé afin d'observer si ces protéines oncogéniques sont exprimées en même temps dans les mêmes cellules ou si à l'inverse elles sont trouvées dans des cellules différentes.

La seconde partie traite de l'importance des modifications cellulaires induites par l'expression de l'oncoprotéine DR7B. Cette étude a été réalisée grâce à l'obtention d'une lignée stable possédant le gène DR7B.

ENVIRONNEMENT
BIBLIOGRAPHIQUE

L'HERPESVIRUS HUMAIN DE TYPE 6

I. Historique



Figure 1 : Syed Zaki SALAHUDDIN

(D'après <http://www.cimm.net/zaki.htm>)

L'herpèsvirus humain de type 6 (HHV-6) a été isolé fortuitement en 1986, chez 6 patients atteints de syndromes lymphoprolifératifs, deux étant en outre porteurs du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), à partir de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMCs) stimulées par l'interleukine 2 [Salahuddin et al., 1986 (Figure 1)]. Les cultures de PBMCs ont en effet montré un effet cytopathogène inhabituel caractérisé par une ballonnisation des cellules et associé à la présence d'un herpèsvirus observé par microscopie électronique. Ce nouvel herpèsvirus a été initialement nommé HBLV (Human B-lymphotropic virus) (Josephs et al., 1986) du fait de son tropisme *in vitro* pour des cellules B fraîchement isolées. Mais différentes études postérieures ont démontré que des virus similaires infectaient et se répliquaient de façon importante au sein de lymphocytes appartenant à la lignée T (Lusso et al., 1988) d'où le changement d'appellation pour HHV-6 (Ablashi et al., 1987). La classification des isolats d'HHV-6 en deux groupes selon des propriétés génétiques et antigéniques a par la suite été réalisée (Aubin et al., 1991; Schirmer

et al., 1991). Ces 2 groupes différaient par leur épidémiologie, leurs propriétés de croissance, leur réactivité avec des panels d'anticorps monoclonaux, leurs profils de restriction et leurs séquences nucléotidiques (Ablashi et al., 1991). Nommés HHV-6A et HHV-6B, ces deux variants sont très proches, certains gènes présentant plus de 95% d'homologie (Ablashi et al., 1993). Des souches prototypes sont connues pour chaque variant : GS (isolée par Salahuddin et al., 1986) et U1102 (issue d'un patient Ougandais séropositif pour le VIH, Downing et al., 1987) pour le variant A, Z29 (patient originaire de Zambie et séropositif pour le VIH, (Lopez et al., 1988) et HST (patient japonais atteint d'exanthème subit, Yamanishi et al., 1988) pour le variant B. La recherche des maladies associées aux infections par HHV-6 fut compliquée du fait de la haute séroprévalence du virus dans la population générale mais le jeune âge de l'acquisition de l'infection a suggéré l'association de ce virus avec une maladie infantile connue. L'HHV-6 a par ailleurs été décrit comme un virus capable de réactiver, comme tous les herpesvirus, à la fois chez les personnes immunocompétentes et immunodéprimées.

II. Morphologie du virus

Faisant partie de la famille des *Herpesviridae*, l'HHV-6A et l'HHV-6B sont des membres de la sous-famille des *β -herpesvirinae* appartenant au genre *Roseolovirus* comme l'HHV-7 (Black et Pellett, 1999; Caserta et al., 2001). Cette classification est basée sur le haut niveau de conservation des séquences et la colinéarité génétique générale entre ces virus et le HCMV (Gompels et al., 1995).

II-1. Ultrastructure

L'HHV-6 comme tous les herpesvirus possède 4 éléments structuraux majeurs (Roizman et Pellet, 2001) (Figure 2) :

✧ **un noyau** d'environ 60 nm de diamètre, dense aux électrons, contenant le génome viral

✧ **une nucléocapside** à symétrie icosaédrique de 90 à 110 nm de diamètre contenant 162 capsomères

✧ **un tégument** protéique peu structuré, d'environ 40 nm d'épaisseur, occupant l'espace entre la nucléocapside et l'enveloppe

✧ **une enveloppe** ou bicouche lipidique dérivant des membranes cellulaires de la cellule-hôte où sont enchâssées les glycoprotéines virales

Les virions matures possèdent un diamètre de 200 nm (Biberfeld et al., 1987; Yoshida et al., 1989).

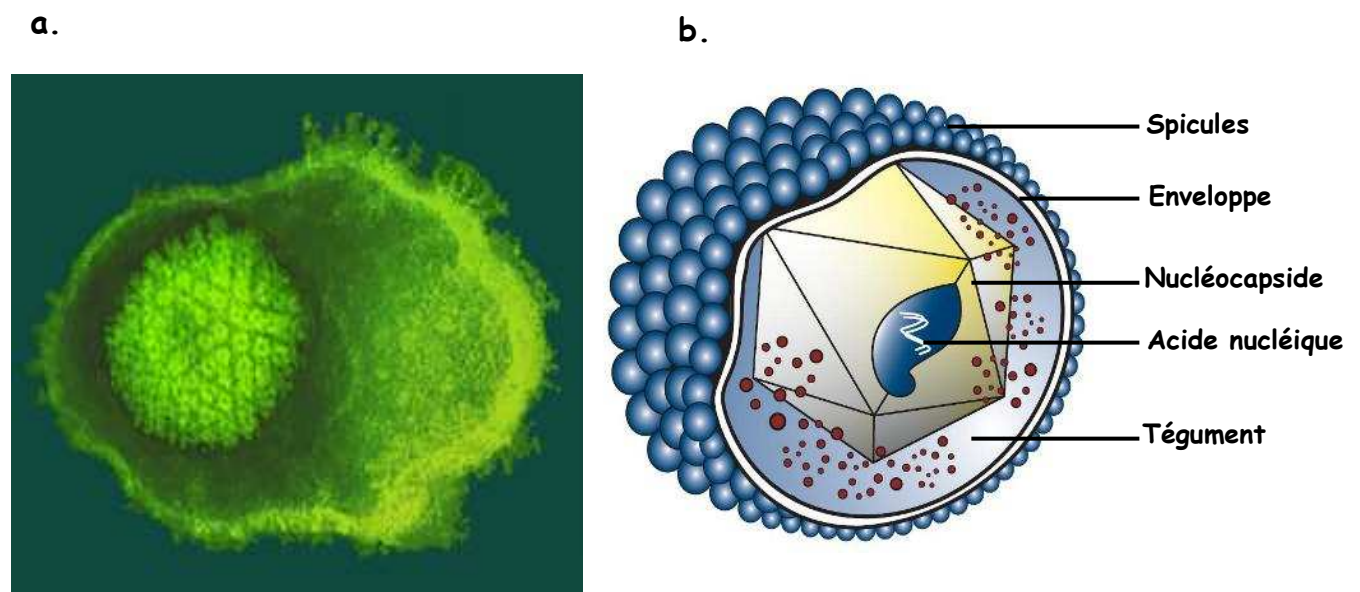


Figure 2 : Ultrastructure des herpèsvirus

Fig. 2a. Photographie en microscopie électronique
(<http://web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/hsv-3bc.gif>)

Fig. 2b. Représentation schématique
(http://www.nishikigoionline.com/phpbb2/album_pic.php?pic_id=13572)

II-2. Génome (Tableau II)

GENES DE L'HHV-6B HST	FONCTIONS ET/OU COMMENTAIRES	GENES DE L'HHV-6B HST	FONCTIONS ET/OU COMMENTAIRES
LT1	/	U48	gH, se complexe à gL et gO ou gQ
DR1	Famille des gènes US22 du HCMV	U49	Protéine de fusion
DR2	Famille des gènes US22 du HCMV	U50	Rôle dans l'empaquetage de l'ADN
DR3	/	U51	Homologue récepteur couplé aux protéines G, récepteur aux chimiokines
DR6	Famille des gènes US22 du HCMV	U52	/
DRHN1	/	U53	Protéase agit dans la maturation de la capsid, protéine de capsid
DR7	Famille des gènes US22 du HCMV, transformant, transactivateur	U54	Transactivateur du virion, pp65/72K
DRHN2	/	U55	UTPase
DR8	Domaine SR	U56	Protéine de capsid
LJ1	Jonction avec les répétitions télomériques	U57	Protéine majeure de capsid
U1	Domaine SR	U58	/
U2	Famille des gènes US22 du HCMV	U59	/
U3	Famille des gènes US22 du HCMV	U60	Transcrit tardif du gène U60/U66 pour l'empaquetage de l'ADN
U4	/	U61	/
U5	/	U62	/
U6	/	U63	/
U7	Famille des gènes US22 du HCMV	U64	Rôle dans l'empaquetage de l'ADN, protéine du tégument
U8	Famille des gènes US22 du HCMV	U65	Protéine du tégument
U9	/	U66	Transcrit tardif du gène U60/U66 pour l'empaquetage de l'ADN
U10	/	U67	/
U11	pp100, protéine structurale majeure antigénique	U68	/
U12EX	Récepteur CC-chimiokine, Exon1	U69	Kinase du ganciclovir, phosphotransférase conservée
U12	Récepteur CC-chimiokine, exon 2	U70	Déoxyribonucléase, rôle dans maturation/empaquetage de l'ADN
U13	/	U71	Protéine du tégument myristoylée
U14	Famille des gènes UL25/UL35 du HCMV	U72	Protéine intégrale de la membrane gM, se complexe avec gN, rôle dans l'enveloppement du virion et dans le trafic des protéines de membranes
U15	/	U73	Protéine de liaison à l'origine, hélicase
U16	IE-B, transactivateur, famille des gènes US22 du HCMV	U74	Complexe primase/hélicase
U17	IE-B	U75	/
U18	IE-B, homologue de la gp IE du HCMV	U76	Protéine mineure de la capsid, rôle dans l'empaquetage de l'ADN
U19	IE-B	U77	Complexe primase/hélicase, hélicase
U20	Gp	U79	Epissé, rôle probable dans la réplication de l'ADN
U21	Gp	U80	Epissé, rôle probable dans la réplication de l'ADN
U22	Gp	U81	Uracyl-ADN glycosylase
U23	Gp	U82	gL, se complexe avec gH
U24	Domaine hydrophobe	U83	Chimiokine
U25	Famille des gènes US22	U84	/
U26	/	U85	Homologue d'OX-2, gp
U27	pp41, transactivateur de la processivité de l'ADN pol	U86	IE-A, homologue IE-2 du HCMV
U28	Grande sous-unité de la ribonucléotide réductase	U89	IE-A, homologue de position de IE1 du HCMV, transactivateur
U29	Protéine mineure de la capsid	U90	IE-A, épissage de U86 et U89
U30	Protéine du tégument	HN1	IE-A, épissage de U90
U31	Protéine du tégument	U91	Probable gp de membrane
U32	Protéine de capsid	HN2	/
U33	Protéine du virion	U94	Transactivateur, inhibition de la réplication, gène de latence, protéine de liaison au simple brin d'ADN
U34	Phosphoprotéine liée à la membrane, rôle primaire dans l'enveloppement	U95	Famille des gènes US22 du HCMV
U35	Rôle dans l'empaquetage de l'ADN	U97	Epissage de la gp82/105
U36	Rôle dans l'empaquetage de l'ADN	HN3	Epissage de la gp82/105
U37	Rôle primaire dans l'enveloppement	U98	gp82/105
U38	Sous-unité catalytique de l'ADN pol	U99	gp82/105
U39	gB	U100	gQ, gp82/105
U40	Rôle dans l'empaquetage de l'ADN	RJ1	/
U41	Protéine majeure de liaison à l'ADN	DR1'	Famille des gènes US22 du HCMV
U42	Transactivateur conservé des herpesvirus	DR2'	Famille des gènes US22 du HCMV
U43	Complexe hélicase/primase	DR3'	/
U44	/	DR6'	Famille des gènes US22 du HCMV
U45	dUTPase putative	DRHN1'	/
U46	gp de membrane gN se complexe avec gM	DR7'	Famille des gènes US22 du HCMV, transformant, transactivateur
U47	gp de membrane gO se complexe avec gH/gL	DRHN2'	/

Tableau II : Les différents gènes de l'HHV-6B HST et leurs fonctions

(D'après *Gompels et Kasolo, 2006; Isegawa et al., 1999*)

Le génome de la souche U1102 de l'HHV-6A et des souches Z29 et HST ont entièrement été séquencés (Dominguez et al., 1999; Gompels et al., 1995; Isegawa et al., 1999). L'architecture du génome de l'HHV-6 (Figure 3) ressemble non seulement à celle du virus HHV-7 mais également à celle du virus du poisson chat (channel catfish virus). Le génome de l'HHV-6 est une molécule d'ADN double brin linéaire de 160 à 162 kb (Dockrell, 2003). Elle consiste en une région unique (U1-U100) de 143 à 145 kb flanquée de régions terminales de 8 à 9 kb répétées et orientées dans le même sens nommées DR (Direct Repeats) allant de DR1 à DR7. Les DRs contiennent des motifs de clivage et d'empaquetage nommés *pac-1* et *pac-2* ainsi qu'une répétition d'héxanucléotides (GGGTTA)_n (Thomson et al., 1994) qui est une séquence télomérique caractéristique des vertébrés (Meyne et al., 1989). Ces régions *pac-1* et *pac-2* ont un rôle dans la réplication de l'ADN et dans le maintien du génome viral dans les cellules infectées de façon latente (Gompels et Macaulay, 1995; Torelli et al., 1995). Les répétitions d'héxanucléotides pourraient quant à elles avoir un rôle dans l'intégration du virus (Daibata et al., 1999). En amont du DR_R, il est à noter que la région IEA (Immediate-early A) est interrompue par 3 régions intermédiaires répétées désignées R1, R2 et R3 (Clark, 2000). Le génome de l'HHV-6B contient par ailleurs 97 gènes codant 119 ORFs (cadres ouverts de lecture) dont 9 sont absents chez l'HHV-6A. Ces 9 ORFs uniques à l'HHV-6B sont répertoriées grâce à une appellation allant de B1 à B9. D'autre part, 9 ORFs de l'HHV-6A n'ont aucune correspondance dans le génome de l'HHV-6B (Gompels et al., 1995) soit par absence de codon initiateur, soit par la présence de délétions ou de mutations dans le cadre de lecture.

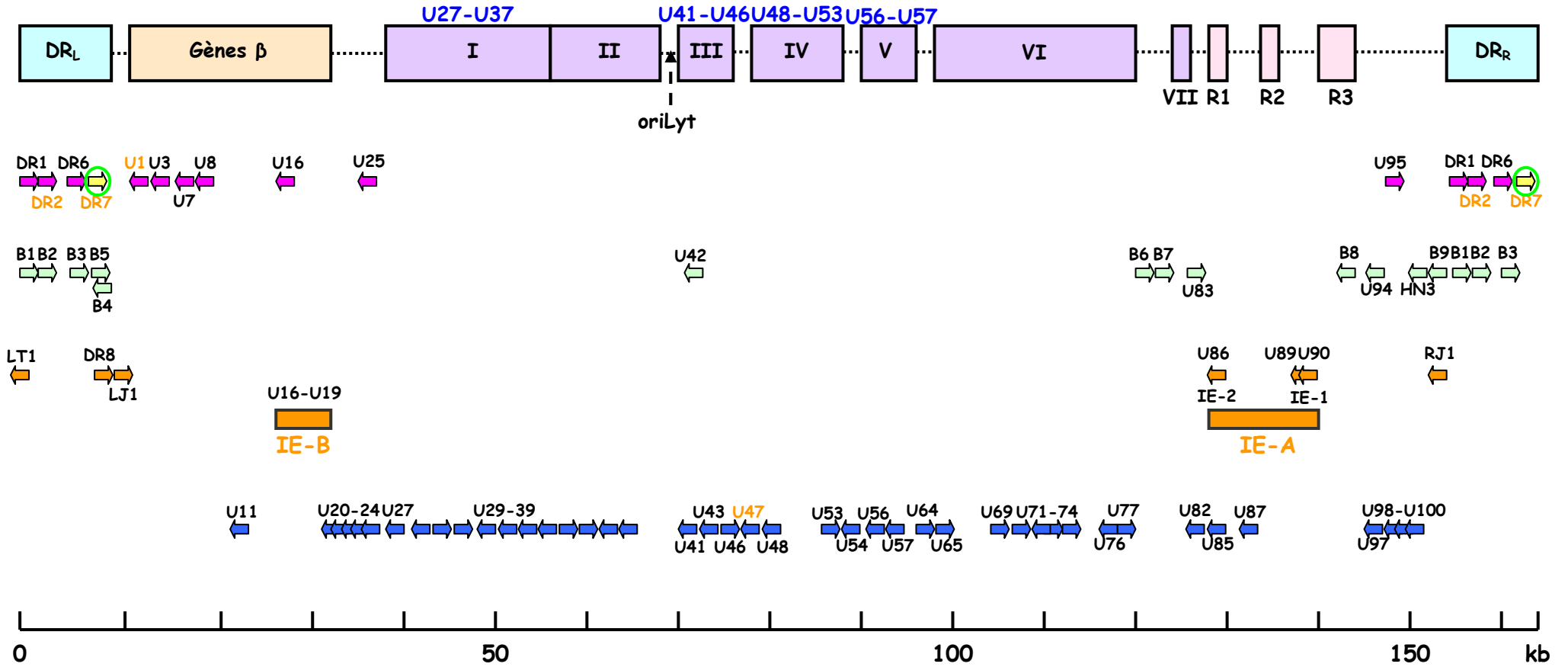
Les gènes codant les composants de la structure du virion, les enzymes requises pour le métabolisme nucléotidique et la réplication de l'ADN sont conservés au sein de tous les herpesvirus au travers de 7 blocs génomiques (I à VII) (Campadelli-Fiume et al., 1999). Un

ensemble de gènes est quant à lui seulement conservé au sein de la sous famille des *β-herpesvirinae* (U2 à U19) et appartient pour sa plus grande part à la famille de gènes US22 du HCMV. De nombreux membres de cette famille pourraient avoir des propriétés transactivatrices. Un certain nombre de gènes dont U83 et U94 sont uniques à l'HHV-6.

L'homologie de séquence globale entre les deux variants de l'HHV-6 est d'environ 90%. La plus forte homologie est présente au centre du génome avec un pourcentage pouvant aller de 95 à 98%. Celle-ci décroît en allant vers les DRs. Ces DRs sont par ailleurs les régions les plus hétérogènes au sein du même variant. En dehors des DRs, la région IE-A, qui comprend IE-1, est reconnue comme présentant le moins d'homologie entre les deux variants (31%). Cette région pourrait être responsable de certaines différences biologiques entre les deux variants comme leur pathogénicité par exemple. D'autre part, IE-1 est très conservée au sein des souches B. Toutefois, entre les souches HST et Z29, une ségrégation en deux groupes d'IE-1 est observée ([Stanton et al., 2003](#)). La partie distale allant de U97 à U100, très variable, pourrait en partie être responsable de la séparation en deux variants distincts de l'HHV-6. En effet, un exon de ce gène, HN3, est présent uniquement chez l'HHV-6 variant B. Certaines régions présentent une différence entre les variants A et B : LT1, DR2, DR7, DR8, LJ1, RJ1, U1 et U47, bien que l'ensemble du génome soit impliqué dans cette distinction.

Figure 3 : Organisation génomique de l'HHV-6

(D'après Pellet et Dominguez, 2001)



⇒ Famille de gènes transactivateurs homologues à la famille US22 du HCMV

⇒ Gènes variables entre les variants A et B de l'HHV-6

⇒ Principaux gènes structuraux

⇒ Gènes présentant une particularité

⇒ Gène étudié lors de ce travail de thèse

III. Caractéristiques biologiques du virus HHV-6

III-1. Tropisme cellulaire

In vitro, les 2 variants de l'HHV-6 se multiplient efficacement dans les lymphocytes T primaires activés (Yamanishi, 2001). Plusieurs isolats ont été adaptés à la culture sur lignées cellulaires T; avec toutefois une remarquable difficulté à cultiver ce virus *in vitro*. 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., 1997; Campadelli-Fiume et al., 1999; Clark, 2000). Les lignées T humaines sont les plus usitées pour la multiplication du virus; d'autres types cellulaires présentent des degrés de permissivité au virus variables mais toujours faibles (Ablashi et al., 1987; Chen et al., 1994; Kikuta et al., 1990; Simmons et al., 1992) comme les cellules neuronales, les cellules épithéliales, les fibroblastes, les cellules natural killer (NK), les hépatocytes, les cellules endothéliales, les astrocytes fœtaux, les oligodendrocytes, les cellules microgliales.

In vivo, l'HHV-6A ainsi que l'HHV-6B se multiplient de façon plus efficace dans les lymphocytes T CD4+ (Lusso et al., 1988; Lusso et Gallo, 1995; Takahashi et al., 1989). Les lymphocytes T CD8+ sont quant à eux seulement infectables par l'HHV-6A (Grivel et al., 2003). L'HHV-6 peut également se propager dans les PBMCs et les cellules du sang de cordon. *In vivo*, les types de cellules-hôtes sont beaucoup plus nombreux qu'*in vitro* (Hall et al., 1998) : les hépatocytes, les cellules NK, les cellules endothéliales tubulaires rénales, les

neurones et les oligodendrocytes du tissu cérébral, les lymphocytes du tissu des amygdales, les cellules épithéliales des glandes salivaires, les cellules endothéliales des vaisseaux. En outre les cellules progénitrices de la moelle osseuse semblent porter du virus à l'état de latence, virus pouvant dans certaines conditions être transmis à des cellules sanguines différenciées appartenant à diverses lignées. Ce fait est confirmé par la présence du virus au sein des monocytes/macrophages (Kondo et al., 1991) et des cellules dendritiques. Le virus HHV-6 est strictement humain, toutefois grâce à l'utilisation d'anticorps, des homologues au virus HHV-6 ont pu être découverts chez le chimpanzé (Lacoste et al., 2000 et 2005). En outre, des expérimentations d'infections avec de l'HHV-6 *in vitro* ont pu être réalisées avec succès sur des tissus issus de singe. Toutefois, la multiplication du virus HHV-6 dans les cellules simiennes est un événement difficile à reproduire et ayant une très faible efficacité.

III-2. Cycle répliatif (Figure 4)

a. Attachement, Pénétration et Décapsidation

Les deux variants de l'HHV-6 entrent dans la cellule en interagissant avec le récepteur CD46 (Santoro et al., 1999). Celui-ci est présent sur la membrane de toutes les cellules nucléées (Liszewski et al., 1991) et physiologiquement impliqué dans la régulation du complément par le clivage protéolytique des facteurs C3b et C4b intervenant dans son activation à l'aide d'un cofacteur membranaire. La nécessité de la présence d'un co-récepteur est évidente car sinon l'entrée du virus se ferait dans toutes les cellules; ce co-récepteur est encore inconnu. Le complexe gH-gL-gQ (glycoprotéines H, L et Q) codé respectivement par les gènes U48, U82 et U100 sert de ligand pour le récepteur CD46 (Mori et al., 2003a et b). Il existerait peut-être un autre récepteur non décrit à l'heure actuelle, car un autre complexe se forme, le complexe

gH-gL-gO (gène U47), qui ne se lie aucunement au CD46 mais certainement à un autre récepteur (Mori et al., 2003a et b; Pedersen et Hollsberg, 2006).

Après fusion de l'enveloppe virale à la membrane cellulaire, les nucléocapsides sont transportées au travers du cytoplasme vers le pore nucléaire en utilisant le réseau microtubulaire. Là, le génome viral est relargué dans le nucléoplasme.

b. Production de protéines virales et Réplication de l'ADN

Le virus utilise la machinerie cellulaire transcriptionnelle et traductionnelle afin de produire 3 classes de protéines virales :

↪ **les protéines IE (Immediate Early) très précoces** sont synthétisées quelques heures après l'infection (les ARNm sont détectés environ 3h post-infection) et régulent l'expression d'autres gènes (notamment ceux correspondant aux protéines E).

↪ **les protéines E (Early) précoces** sont impliquées dans le métabolisme et la réplication de l'ADN. Les protéines E régulent aussi l'expression des gènes tardifs; l'expression génique est détectée de 3 à 8h après l'infection.

↪ **les protéines L (Late) tardives** servent à l'assemblage du virion et sont des composants des particules virales matures; elles peuvent être glycosylées et les transcrits sont détectables de 8h jusqu'à 72h après l'infection.

La réplication de l'ADN requiert 7 facteurs codés par des gènes viraux. Tout d'abord, la protéine de liaison à l'origine, 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 à son entrée dans le noyau, ceci par juxtaposition des DRs. 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.

c. Assemblage, Maturation et Libération des virions

Les longs brins concatémériques sont clivés puis encapsidés par l'interaction de protéines de clivage et d'encapsidation grâce à des signaux spécifiques *pac* situés aux extrémités du génome viral. Les capsides matures sortent du noyau, où elles acquièrent de façon temporaire une membrane intermédiaire dépourvue de glycoprotéines, vers le cytoplasme. Dans ce compartiment cytoplasmique, au sein du tégusome qui est un compartiment sphérique d'origine cytoplasmique, le tégument peut être acquis. En outre, ces capsides tégumentées d'un diamètre approximatif de 165 nm sont enveloppées au niveau du complexe golgien où les glycoprotéines virales s'accumulent : c'est le bourgeonnement. Les glycoprotéines des capsides tégumentées et enveloppées sont séquentiellement glycosylées dans des vésicules de transport, au préalable de l'exocytose des particules virales dans l'espace extracellulaire. Le temps total depuis l'infection jusqu'à la libération de nouveaux virions dure approximativement 72h.

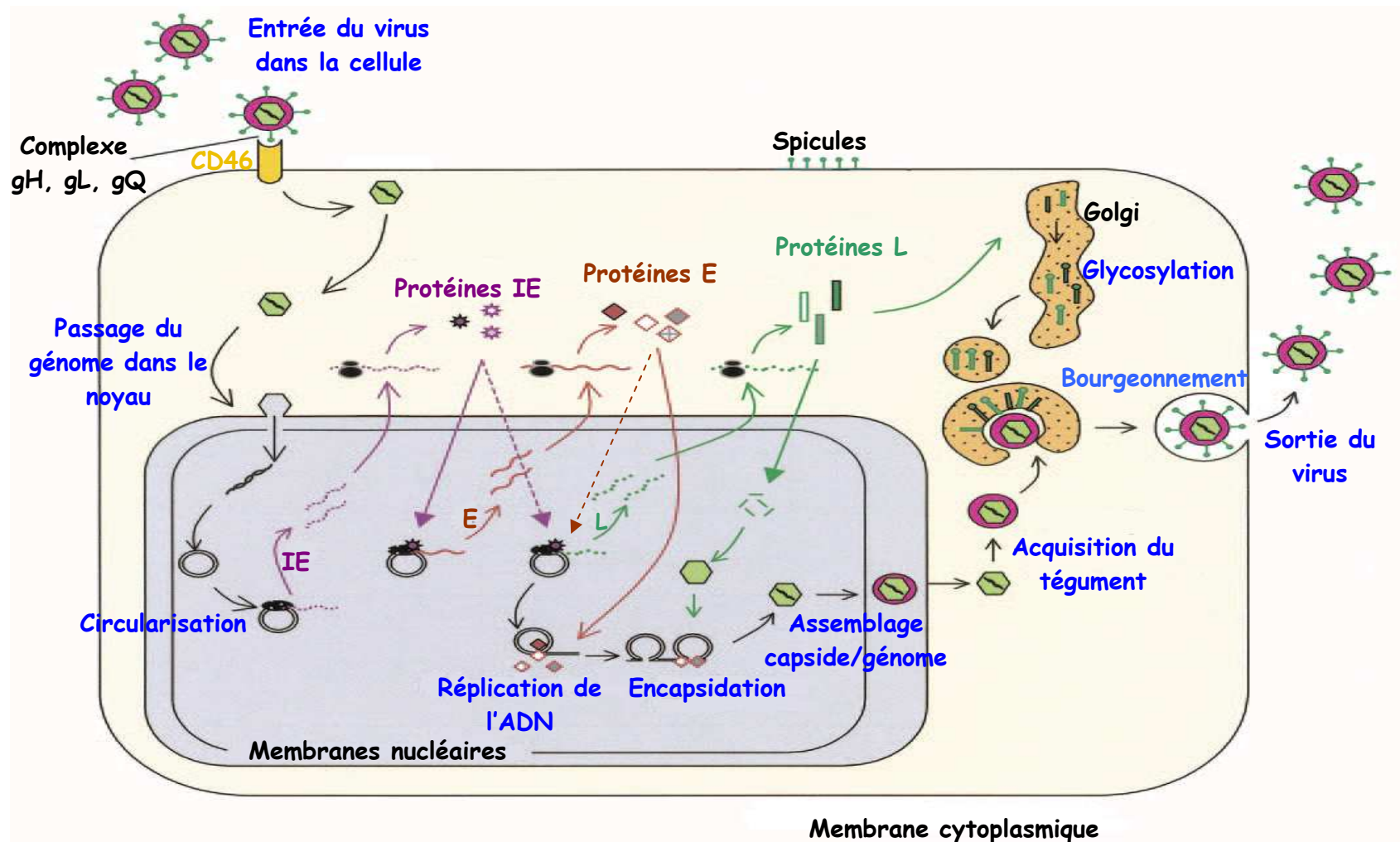


Figure 4 : Cycle répliatif
 (D'après *De Bolle et al., 2005*)

III-3. Effet du virus sur les cellules-hôtes

L'infection par les *Roseolovirus* provoque de profondes modifications sur les cellules-hôtes incluant une marginalisation de la chromatine (Nii et al., 1990), un arrêt de la synthèse d'ADN au sein de la cellule-hôte (Di Luca et al., 1990) et une stimulation généralisée de la synthèse protéique dans cette même cellule (Balachandran et al., 1989; Black et al., 1992). Ceci conduit au développement d'un effet cytopathogène (Figure 5) se manifestant par une ballonnisation provoquant la formation de cellules géantes multinucléées ou *syncytia* (Salahuddin et al., 1986; Taniguchi et al., 2000).

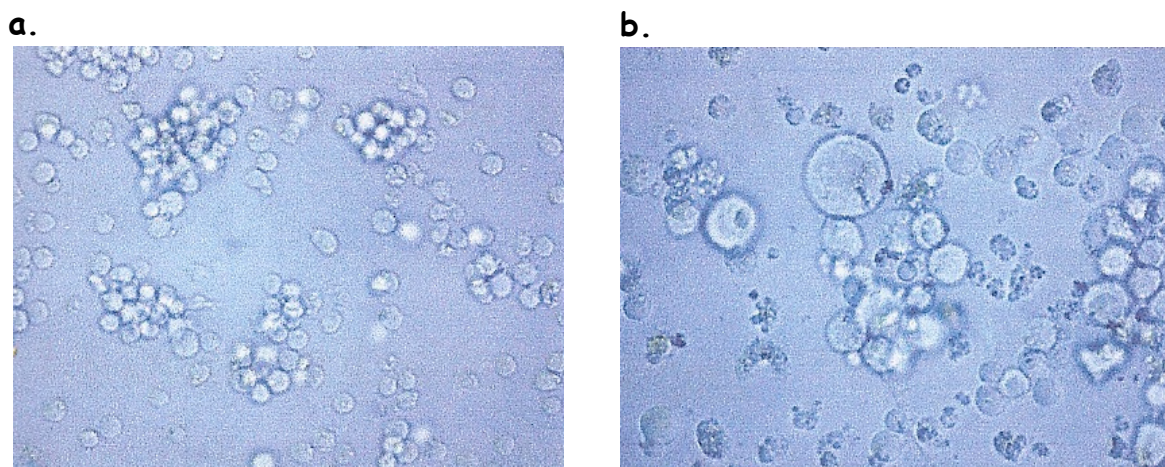


Figure 5 : Effet cytopathogène d'HHV-6

Fig. 5a. Cellules lymphoblastiques saines

Fig. 5b. Cellules infectées par HHV-6 (x200)

III-4. Les protéines transactivatrices de l'HHV-6

Les protéines transactivatrices par définition régulent quelques étapes dans l'expression de leurs gènes cibles par liaison aux éléments agissant en *cis*. La plupart des protéines transactivatrices sont des protéines très précoces (IE) ou précoces (E) de façon à contrôler temporellement l'expression de la cascade des gènes viraux. L'HHV-6 présente parmi ces transactivateurs onze membres homologues de protéines appartenant à la famille US22 du HCMV : DR1, DR2, DR6, DR7, U2, U3, U7, U8, U16, U25 et U95.

a. La protéine DR7

La restriction du génome de l'HHV-6A souche U1102 par l'enzyme SalI a pourvu de nombreux fragments. Le sixième a été nommé SalI-L. Sur celui-ci, sept ORFs sont présents, le premier d'entre eux a été appelé ORF-1 (Kashanchi et al., 1997). De façon plus récente, ORF-1 a été rebaptisé DR7 et code une protéine exprimée de 18h jusqu'à 48h après infection, suggérant que DR7 fasse partie des gènes précoces (Doniger et al., 1999). Cette protéine présente de nombreux domaines hydrophiles et hydrophobes ce qui peut être en faveur d'une association à la membrane (Figure 6). Par ailleurs cette protéine a la capacité de transformer les cellules fibroblastiques de souris NIH3T3, de transactiver le promoteur LTR (long terminal repeat) du VIH-1 et d'augmenter la réplication de ce virus (Kashanchi et al., 1994). Les cellules exprimant la protéine DR7 sont tumorigènes lorsqu'elles sont injectées à des souris nude alors que les cellules possédant une protéine DR7 tronquée ne le sont pas. Son potentiel oncogénique est associé à sa capacité de liaison et d'inhibition de l'activité transcriptionnelle de la protéine suppresseur de tumeur p53 (Kashanchi et al., 1997; Inoue, 1998). Cette liaison se fait plus particulièrement au niveau des sites de liaison attribués à l'antigène T du virus SV40 (Simian Virus) et de la séquence spécifique de liaison à l'ADN.

Le gène DR7 de l'HHV-6B a quant à lui été peu étudié jusqu'à lors; sa séquence nucléotidique est reconnue comme étant plus courte (212 aa) que celle du type A (363 aa). Ces deux séquences présentent seulement 42,2% d'homologie (Figure 7) (Isegawa et al., 1999).

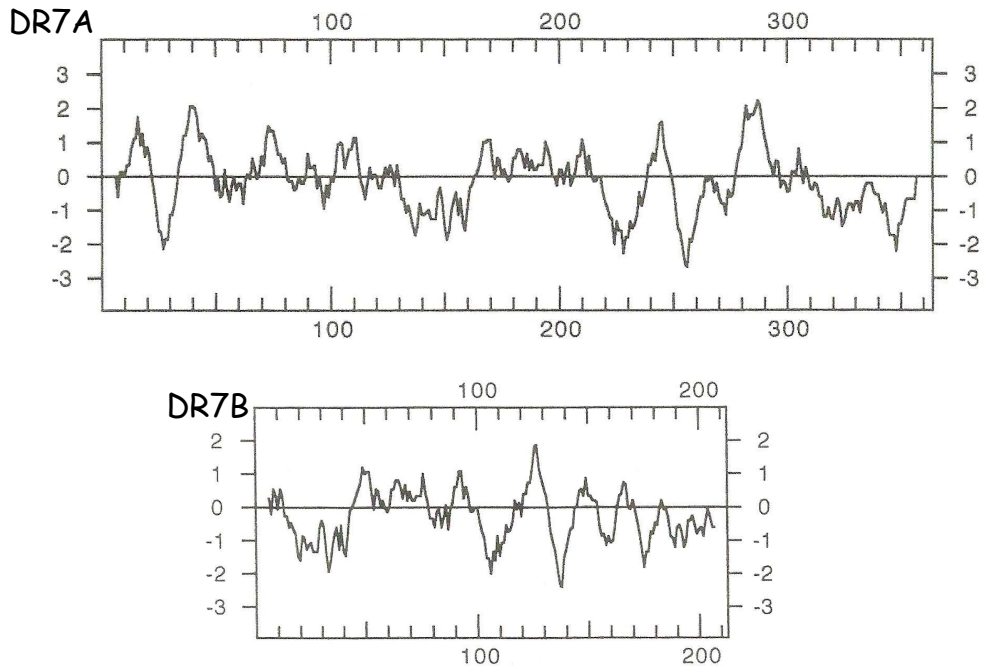


Figure 6 : Profil d'hydropathie de DR7A puis B par la méthode de Kyte et Doolittle
Les régions hydrophobes sont indiquées par des valeurs positives.

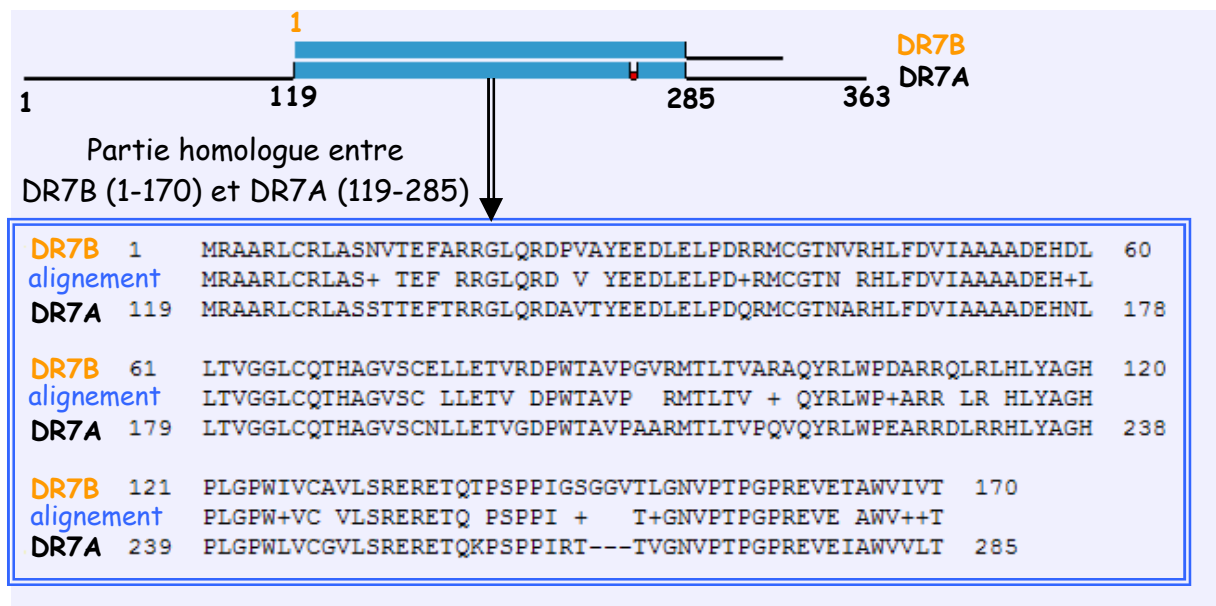


Figure 7 : Homologie entre DR7B et DR7A basée sur l'alignement ALIGN (NCBI)

La ligne entre la séquence de DR7B et de DR7A correspond à l'alignement entre DR7B et DR7A sur sa partie homologue avec les points communs et les différences observés entre les acides aminés.

b. Les autres protéines transactivatrices

✿ La protéine U3 et la protéine U27 : le gène U3 est un homologue de position du gène UL24 du HCMV alors que le gène U27 code pour le facteur de processivité de l'ADN polymérase. Les deux protéines correspondantes ont été décrites comme transactivant le promoteur LTR du VIH-1 dans les cellules rénales de singe CV-1 (Mori et al., 1998; Zhou et al., 1994).

✿ Les protéines IE-B : les gènes correspondants vont de U16 à U19 et partagent des similitudes avec les gènes IE allant de UL36 à UL38 du HCMV. Le produit de l'épissage des gènes U16/17, U18 et U19 donne des protéines dont chacune est capable de transactiver le promoteur LTR du VIH-1 *in vitro*.

✿ Les protéines IE-A : la région IE-A est homologue de position du locus IE du HCMV et code deux protéines IE-1 et IE-2 correspondant aux ORFs U89 et U86/87 respectivement. Tous deux contiennent un exon du gène U90 lors de leur épissage (Kondo et al., 2002). Il a été démontré que la protéine IE-1 de l'HHV-6A est capable de transactiver différents promoteurs dont celui du VIH-1, ce qui n'est pas le cas chez l'HHV-6B, lui conférant ainsi un rôle dans la régulation transcriptionnelle. IE-2, quant à elle, active de multiples promoteurs dont celui du VIH-1 mais aussi de NFκB (nuclear factor kappa B), de CRE (cyclic adenosine monophosphate-responsive element) et de NFAT (nuclear factor of activated T-cells) (Gravel et al., 2003). Ceci suggère que IE-2 pourrait jouer un rôle important dans le contrôle de l'expression des gènes viraux et cellulaires.

✿ La protéine U94 : le gène U94 est l'homologue du gène *rep* de l'AAV-2 (Adeno-associated virus de type 2) (Thomson et al., 1991). Il existe uniquement chez l'HHV-6 et n'a aucun homologue chez les autres herpèsvirus. La protéine agit comme transactivateur en se liant à un facteur de transcription, la protéine de liaison à la boîte TATA humaine (Mori et al.,

2000). Elle agit en activant le promoteur LTR du VIH-1 dans les cellules fibroblastiques et est capable de supprimer la transformation induite par la protéine oncogène humaine H-ras.

✿ La protéine U42 : cette protéine transactivatrice est conservée chez tous les herpèsvirus.

IV. Manifestations cliniques

IV-1. Épidémiologie et transmission

La séropositivité à l'HHV-6 dans la population adulte est estimée comme étant supérieure à 95% pour l'un et/ou l'autre des deux variants dans les pays développés. Les taux d'anticorps diminuent avec l'âge (Baillargeon et al., 2000). L'HHV-6 est un virus ubiquitaire dont la répartition générale présente des variations géographiques, les séroprévalences dans la population générale allant de 70 à 100% (Bhattarakosol et al., 2001; Ranger et al., 1991; Wu et al., 1997). Ce virus est généralement acquis entre 6 et 15 mois (Enders et al., 1990; Okuno et al., 1989) et la période d'incubation est de 1 à 2 semaines.

La principale voie de transmission est salivaire et la détection de l'ADN d'HHV-6 dans la salive et le tissu des glandes salivaires est fréquente (Collot et al., 2002; Di Luca et al., 1995; Fox et al., 1990; Zhao et al., 1997). Les glandes salivaires sont un site potentiel de persistance de l'HHV-6. La salive véhicule la transmission du virus aussi bien de la mère à l'enfant qu'entre enfants (Mukai et al., 1994; Van Loon et al., 1995). Tous les isolats issus de la salive appartiennent au variant B de l'HHV-6. La détection de l'ADN d'HHV-6 dans le sang de cordon de nouveaux-nés et chez des fœtus après une fausse-couche suggère la possibilité d'une transmission intra-utérine (Adams et al., 1998; Aubin et al., 1992). Des séquences d'ADN d'HHV-6B ont été trouvées dans le tractus génital de 20% des femmes enceintes mais une transmission périnatale semble peu probable (Maeda et al., 1997). Bien que l'HHV-6 ait

été détecté dans les selles d'enfants et de parents atteints d'*exanthème subit* (Suga et al., 1998), le mode de transmission oro-fécal n'a pas été suffisamment documenté pour y voir une quelconque importance.

IV-2. Infections virales

a. La primo-infection

La primo-infection par l'HHV-6 est très souvent asymptomatique. Sinon, elle se manifeste par une pathologie fébrile aiguë survenant habituellement chez des enfants de 6 mois à 2 ans (Asano et al., 1994). La fièvre est égale voire supérieure à 40°C et dure 3 jours après lesquels une défervescence brutale est observée. Un certain nombre d'enfants développent par la suite un rash cutané au niveau du tronc, du cou et du visage. Ce tableau clinique correspond à l'*exanthème subit* ou encore roséole infantile (Figure 8). Yamanishi et son équipe, en 1988 (Yamanishi et al., 1988), ont identifié l'HHV-6 B comme étant l'agent causal de l'*exanthème subit* (Dewhurst et al., 1993; Hall et al., 1994; Portolani et al., 1993) alors que l'HHV-6A n'avait aucune relation avec cette pathologie fébrile.



Figure 8 : *Exanthème subit* du nourrisson

(http://aapredbook.aappublications.org/week/063_03.jpg)

La plupart des primo-infections symptomatiques à HHV-6 sont bénignes et se résolvent d'elles-mêmes. Les complications les plus fréquentes sont une otite ou des symptômes touchant à la fois les tractus respiratoires et gastro-intestinaux (Asano et al., 1994; Barone et al., 1995; Hall et al., 1994; Kondo et al., 1993; Torre et al., 2005; Ward et Gray, 1994). Des complications plus sévères mais plus rares touchent le système nerveux central comme des méningites, des encéphalites ou des convulsions (Birnbaum et al., 2005; Kato et al., 2003; Yoshikawa et Asano, 2000). Des pathologies graves peuvent survenir comme des hépatites fulminantes, des thrombocytopenies ou des syndromes hémophagocytaires. La primo-infection chez l'adulte est très rare, mais souvent symptomatique, et se manifeste par des syndromes beaucoup plus sévères et même parfois fatals (Lau et al., 1998; Rossi et al., 2001). En effet, elle peut entraîner chez ces sujets immunocompétents un syndrome mononucléosique (Akashi et al., 1993; Goedhard et al., 1995; Sumiyoshi et al., 1995) ou encore une hépatite fulminante (Sobue et al., 1991). Des primo-infections ont également été décrites lors de l'introduction d'un greffon positif chez un sujet négatif pour l'HHV-6.

b. Latence, persistance et réactivation

Comme tous les autres herpèsvirus, à la suite de la primo-infection, l'HHV-6 reste dans l'hôte qu'il infecte durant toute une vie. Cet état est nommé persistance. L'infection persistante peut être individualisée en infection latente et en infection chronique. Pendant l'infection latente, aucun virus infectieux n'est produit. L'expression des gènes viraux se limite à celle des gènes requis pour le maintien de la latence. Alors que pendant la réplication chronique une production continue de particules infectieuses, même minime, est observée. Ces deux formes de persistance 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.

Divers transcrits sont associés à la latence. Bon nombre d'entre eux ont été découverts grâce à l'étude des ARN messagers de la région IE-A (Kondo et al., 2002). Cette dernière code deux protéines IE-1 et IE-2 correspondant respectivement aux ORF U90-89 et U90-86/87. Les transcrits issus de ces ORFs sont nommés LTs (latency-associated transcripts). Toutefois bien que ne faisant pas partie de cette région et étant exprimé à de faibles taux durant la réplication (Rapp et al., 2000), le transcrit majeur impliqué dans la latence est le transcrit du gène U94. 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).

c. Les maladies associées à la latence et/ou à la réactivation d'HHV-6

✿ Les atteintes du système nerveux central (SNC)

La forte fièvre qui accompagne la primo-infection à HHV-6 est souvent accompagnée de crises convulsives et la réactivation chez les patients immunodéficients peut s'accompagner d'encéphalites et/ou d'encéphalopathies sévères. Des atteintes sévères du système nerveux central ont été décrites aussi bien chez des adultes immunocompétents qu'immunodéprimés, pouvant se manifester par une démyélinisation multifocale. La neuro-invasion du virus a été mise en évidence par détection de l'ADN de l'HHV-6 dans différents sites du cerveau. Les deux variants de l'HHV-6 y ont été trouvés dans des proportions reflétant leur séroprévalence (3 fois plus de B que de A). Mais le virus de type A semble être toutefois le plus relié à ce caractère neurotrope (Virtanen et al., 2007). Le plus commun des syndromes démyélinisants

est la sclérose en plaques (Kimberlin, 1998). Elle est dans un premier temps caractérisée par une diminution de la myéline autour des axones neuronaux, puis par une destruction de la myéline par infiltration des macrophages et des cellules T, par la formation de cicatrices sur les astrocytes et dans un stade plus tardif par des dommages axonaux. En 1995, Challoner et son équipe (Challoner et al., 1995) ont rapporté l'association de cette maladie avec l'HHV-6; les oligodendrocytes y jouant un rôle primordial. Dans cette étude, l'HHV-6 a été trouvé dans les oligodendrocytes des plaques dues à la sclérose et pas dans les oligodendrocytes des régions non affectées du cerveau. Depuis cette publication, la littérature semble plutôt en faveur du rôle de l'HHV-6 dans un nombre limité de cas. De plus, il n'agirait vraisemblablement pas seul mais à l'aide de cofacteurs.

✿ Les désordres lymphoprolifératifs

L'HHV-6 est détecté fréquemment chez les patients atteints de désordres lymphoprolifératifs (Ranger-Rogez et al., 2006) :

✿ Le lymphome de Hodgkin qui sera développé dans la troisième partie de cette revue de la littérature semble être le désordre lymphoprolifératif majoritairement associé à HHV-6 chez les sujets immunocompétents.

✿ Le virus HHV-6 est aussi trouvé dans les lymphomes non-hodgkiniens chez des sujets immunocompétents. Les lymphomes non-hodgkiniens sont très divers, et la prévalence du virus HHV-6 y est très variable. En effet, les cellules à l'origine de la lymphoprolifération peuvent être des cellules B, des cellules T et dans de très rares cas des cellules NK. A titre d'exemple, dans une cohorte de patients souffrant de lymphomes non-hodgkiniens, l'ADN d'HHV-6 a été retrouvé dans 22,2% des lymphomes B et dans 23,1% des lymphomes T (Collot et al., 2002). Trois types de lymphomes B se sont révélés comme étant positifs pour

l'HHV-6, il s'agit des lymphomes B folliculaires (23,1%), des lymphomes diffus à grandes cellules B (30,8%) et des lymphomes de type MALT (Mucosa associated lymphoid tissue) (50%). Il en est de même pour les lymphomes T avec une positivité pour l'HHV-6 chez les patients atteints de lymphomes T angioimmunoblastiques (20%), de lymphomes T périphériques (25%) et de lymphomes T anaplasiques à grandes cellules (50%). Dans le contexte d'immunodépression, les lymphomes non-hodgkiniens peuvent notamment survenir après une transplantation (Lin et al., 1999), quand le patient est sidéen (Asou et al., 2000; Fillet et al., 1995) ou au cours d'une autre hémopathie (Jarrett et al., 1988).

✿ Les transplantés

Les infections à HHV-6 sont plus fréquentes chez les receveurs de moelle osseuse (BMT) (Dockrell et Paya, 2001) que chez les receveurs d'organes solides (SOT) (50% versus 20-30%) (Caselli et Di Luca, 2007). Les receveurs de moelle ou d'organes présentent des manifestations cliniques multiples. Certaines manifestations peuvent être trouvées chez tous les transplantés. La leucopénie est le symptôme le plus observé ainsi que la fièvre, plus rarement des rash cutanés et des encéphalites ont été rapportés. De nombreuses anomalies liées au greffon ont été décrites (retard dans sa prise, dysfonctionnement, réaction du greffon contre l'hôte, rejet). D'autres sont plus particulièrement associées à certains types de transplantations. Dans le cadre d'une greffe de moelle, des pneumopathies (Carrigan et al., 1991), des suppressions médullaires, des fièvres, des colites ainsi que des dommages de l'endothélium vasculaire peuvent être observés; chez les transplantés hépatiques, des hépatites ont été rapportées (Paterson et al., 1999; Singh et Paterson, 2000).

✿ Le SIDA

L'infection active à HHV-6 chez les patients présentant le VIH est fréquemment détectée mais le rôle de l'HHV-6 est incertain. De plus, même si la réactivation de l'HHV-6 est très fréquente dans ce contexte, elle est assez peu symptomatique. Dans des cas isolés, la réactivation d'HHV-6 chez des patients sidéens a été rapportée 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).

✿ Les syndromes d'hypersensibilité induite par des drogues DIHS (Drug-Induced Hypersensitivity Syndrome)

La réactivation de l'HHV-6B peut survenir chez certains patients après prise médicamenteuse et être à l'origine de DRESS (drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms) (Hashimoto et al., 2003) pathologie récemment décrite. Cette pathologie se caractérise notamment par une forte fièvre, une éosinophilie, une éruption cutanée importante et peut s'accompagner d'atteintes viscérales sévères. Les premières drogues reconnues comme étant à l'origine de DRESS appartenaient à la famille des anti-convulsivants. Le valproate de sodium utilisé dans le traitement de l'épilepsie, a été montré comme associé de façon directe à une augmentation de la réplication de l'HHV-6 *in vitro* (Mardivirin et al., 2007).

Par la suite, d'autres classes de molécules ont aussi été associées au DRESS, telles que certains anti-épileptiques ou certains antibiotiques (Tamagawa-Mineoka et al., 2007). Très récemment, les DRESS associés à une réactivation d'HHV-6, de par leurs caractéristiques, ont été individualisés en DIHS (Tohyama et al., 2007), le terme de DRESS étant réservé aux syndromes non associés à l'HHV-6.

d. Intégration chromosomique de l'HHV-6

L'intégration dans les chromosomes de la cellule-hôte, bien qu'étant un épiphénomène, semble probablement associée à la latence de l'HHV-6. L'intégration du virus entier pourrait se faire *via* les DRs et notamment grâce à leurs séquences télomériques répétées (GGGTTA)_n. Ce fait a été montré par [Morris et al., 1999](#) en 17p13.3. Toutefois, l'intégration d'HHV-6 est peu décrite et les sites d'intégration sont très variables : 1q44 ([Daibata et al., 1998a](#)), 22q13 ([Daibata et al., 1998b](#); [Tanaka-Taya et al., 2004](#)) et 11p15.5 ([Clark et al., 2006](#)). La protéine U94 (homologue de *rep* chez l'AAV-2) pourrait permettre une intégration site-spécifique de l'ADN dans la cellule-hôte, comme le font les protéines *rep* de l'AAV au niveau du site AAVS1 du chromosome 19. En effet, en leur présence, il semble y avoir une augmentation de l'efficacité de l'intégration ([Surosky et al., 1997](#)).

V. Immunité et apoptose

La réponse immunitaire B à une primo-infection par HHV-6 consiste tout d'abord en l'apparition d'un pic d'IgM qui apparaît dans la deuxième semaine suivant l'infection et qui reste détectable pendant environ deux mois, ces chiffres variant selon les individus ([Dockrell et al., 1999](#)). Les IgG s'élèvent à la fin de la deuxième semaine post-infection et restent détectables toute la vie dans plus de 90% des cas ([Robinson, 1994](#)). Une des énigmes de l'HHV-6 est son habileté à échapper aux défenses immunitaires. En effet, l'HHV-6 induit une déplétion des lymphocytes T CD4 positifs. Cette déplétion lymphocytaire T a été attribuée à deux phénomènes dans la littérature. Elle pourrait être due à un effet direct des deux variants de l'HHV-6 comme il a été montré dans un modèle animal ceci en affectant le développement lymphocytaire T ([Gobbi et al., 1999](#)) ou encore à un phénomène indirect d'induction de

l'apoptose (Inoue et al., 1997). En effet, les deux variants de l'HHV-6 peuvent infecter *in vitro* la lignée cellulaire T CD4 positive J JHAN, ce qui se traduit dans les deux cas par une augmentation de l'expression de récepteurs au TNF- α (Tumor Necrosis Factor). Le degré d'apoptose augmente avec le TNF- α et l'anticorps anti-Fas. Toutefois, la majorité des cellules apoptotiques ne sont pas infectées et l'induction de l'apoptose est indépendante de la réplication virale. Inversement, l'induction de l'apoptose dans les lymphocytes de sang de cordon CD4 positifs apparaît directement après infection (Ichimi et al., 1999). Ce phénomène direct d'induction de l'apoptose a été démontré *in vivo* sur des lymphocytes CD4 positifs récoltés à partir de patients durant l'infection aiguë à HHV-6 (Yasukawa et al., 1998) et dans les lymphocytes et macrophages de patients atteints du syndrome de Kikuchi-Fujimoto (Krueger et al., 2001). L'augmentation de PBMCs apoptotiques après infection par HHV-6 (notamment par HHV-6A) pourrait être reliée à une forte et précoce augmentation de la p53 (De Bolle et al., 2004). Il est à noter que les données mentionnées sur la dépression immunitaire et l'apoptose induites par l'HHV-6 proviennent essentiellement d'expériences *in vitro*. *In vivo*, chez l'homme infecté, de tels effets n'ont été que très rarement décrits.

VI. Diagnostic

L'ensemble des avantages et des inconvénients des diagnostics directs et indirects utilisés pour mettre en évidence une infection par HHV-6 est présenté dans le [Tableau III](#).

VI-1. Diagnostic direct

La méthode d'isolement du virus par culture a été décrite à partir du sang périphérique (Yamanishi et al., 1988). L'HHV-6 peut être cultivé en co-culture avec des lymphocytes de sang de cordon négatifs pour l'HHV-6, ou avec des lymphocytes issus du sang périphérique d'un patient négatif pour l'HHV-6. Ces derniers, contrairement aux lymphocytes de sang de cordon, devront être activés soit avec de la phytohémagglutinine, soit avec un anticorps dirigé contre le CD3, et maintenus grâce à de l'interleukine-2. La réplication virale est observable après 7 à 10 jours par l'apparition d'un effet cytopathogène se manifestant par une ballonnisation des cellules et l'apparition de *syncytia*. L'identification du virus en cause est ensuite réalisée par immunofluorescence par exemple à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre l'HHV-6 (Singh et Carrigan, 1996).

L'antigénémie, très peu utilisée en pratique, permet la mise en évidence du virus à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques directement à partir de prélèvements sanguins. Les PBMCs, après récupération sur gradient de Ficoll-Hypaque et dépôt sur lame, sont marqués par immunofluorescence indirecte à l'aide d'anticorps dirigés contre l'HHV-6 : l'un dirigé contre une protéine précoce présente chez les deux variants et un spécifique du variant B ciblant la protéine p101. A l'aide d'anticorps adaptés à la technique d'immuno-histochimie les protéines de l'HHV-6 peuvent être détectées sur des coupes de biopsies tissulaires (Lautenschlager et al., 2000).

Le diagnostic d'infection par l'HHV-6 est également basé sur des méthodes de PCR. Ces techniques sont rapides et sensibles, tout particulièrement chez les personnes immunodéprimées. Du fait de la forte prévalence de l'HHV-6 dans la population de manière

latente, la PCR qualitative n'a qu'une faible valeur. De ce fait, de nombreuses techniques de PCR quantitative ont vu le jour afin de déterminer la charge virale. La détection de l'ADN d'HHV-6 dans le sang total pourrait permettre de diagnostiquer la primo-infection chez des enfants. Toutefois, cette détection n'a qu'une valeur prédictive de 57%. La présence de l'ADN d'HHV-6 dans le plasma ou dans le sérum, ou une forte charge virale dans le sang total sont synonymes d'infection active (Chiu et al., 1998). Une forte charge virale dans les PBMCs ou encore la combinaison d'ADN d'HHV-6 dans les PBMCs avec l'absence de celui-ci dans la salive suggèrent la primo-infection (Clark et al., 1997). Ces différentes techniques de PCR quantitatives se montrent extrêmement sensibles, reproductibles et sont particulièrement utilisées à l'heure actuelle (Aritaki et al., 2001; Collot et al., 2002; Gautheret-Dejean et al., 2002; Locatelli et al., 2000; Nitsche et al., 2001; Reddy et Manna, 2005; Safronetz et al., 2003; Sashira et al., 2002).

VI-2. Diagnostic indirect

La technique de culture étant longue et difficile les diagnostics sérologiques lui sont préférés comme les tests utilisant l'immunofluorescence (Briggs et al., 1988; Krueger et al., 1991) ou encore les tests ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (Nigro et al., 1995; Parker et Weber, 1993). Ces deux tests permettent la détection des IgG et également des IgM et permettent d'établir le diagnostic de primo-infection par mise en évidence de séroconversion des IgG. En effet, le diagnostic ne peut reposer sur la seule mise en évidence des IgM qui sont présents au cours des primo-infections mais réapparaissent ensuite régulièrement.

MÉTHODES DE DETECTION	TECHNIQUES	AVANTAGES	INCONVENIENTS
DIRECTE	CULTURE	-Positivité représentative d'une infection active ou d'une réplication -Distinction entre variant A et B	-Technique délicate -Longue durée avant l'obtention des résultats
	Sang	-Appréciation semi-quantitative dans l'infection active	-Ne permet pas de savoir quel organe est touché -Ne permet pas de différencier primo-infection et réactivation
	Tissu	-Technique rapide	-Technique invasive
	DETECTION D'ANTIGENES Plasma PBMC	-Distinction entre variant A et B -Positivité représentative d'une infection active ou d'une réplication -Distinction entre variant A et B	-Difficulté de distinction entre infection latente et active
	RT-PCR (peu utilisée)	-Positivité représentative d'une infection active ou d'une réplication	
PCR quantitative	-Distinction entre variant A et B -Simple -Non subjectif		
INDIRECTE	PCR IMMUNOFLUORESCENCE (IgG+M)	-Diagnostic possible même si prélèvement tardif -Peu invasif en comparaison de la biopsie tissulaire	-Pas de distinction entre variant A et B -Taux d'anticorps non significatif chez les immunodéprimés -IgM pas caractéristiques de la primo-infection -Taux d'IgG pas toujours en rapport avec la gravité des symptômes
	ELISA (IgG+M)		

Tableau III: Les différentes méthodes permettant le diagnostic d'HHV-6, leurs avantages et inconvénients

(D'après Zerr, 2006)

VII. Traitements

Les infections à HHV-6 sont soit asymptomatiques soit de nature limitée chez les enfants immunocompétents et ne nécessitent donc pas de traitement. Chez les individus immunodéprimés, la réactivation peut être à l'origine de complications sévères. Comme aucun vaccin n'est disponible, la chimiothérapie anti-HHV-6 est nécessaire (Gravel et al., 2007). Aucun des médicaments utilisés dans le traitement des infections à HHV-6 n'est spécifique à ce virus et les produits utilisés sont les mêmes que ceux permettant le traitement de l'infection à HCMV.

VII-1. Les analogues nucléosidiques

Les analogues nucléosidiques utilisés dans le traitement des infections à HHV-6 comprennent le ganciclovir et sa prodrogue le valganciclovir (Figure 9). Ces analogues acycliques ciblent l'ADN polymérase virale et leurs métabolites triphosphates inhibent la fonction de cette enzyme par compétition avec son substrat naturel : le dGTP. Pour ce faire, les analogues triphosphates s'incorporent dans la chaîne en cours de croissance et arrêtent l'élongation de la chaîne en formation. Leur sélectivité est liée au fait qu'ils possèdent une affinité plus importante pour les ADN polymérases virales que pour les ADN polymérases cellulaires. Cette sélectivité est également associée à une phosphorylation sélective par une kinase virale. Les *β -herpesvirinae* ne possèdent pas, contrairement aux autres herpèsvirus, de thymidine kinase mais une phosphotransférase capable de convertir les analogues nucléosidiques en leurs dérivés monophosphates. Les deux phosphorylations suivantes permettant d'obtenir le dérivé triphosphate actif sont assurées premièrement par les dGMP kinases cellulaires puis, pour la deuxième phosphorylation, par la nucléoside diphosphate kinase cellulaire. La kinase

homologue de la phosphotransférase pUL97 du HCMV nommée pU69 chez l'HHV-6 catalyse la conversion du ganciclovir en son dérivé monophosphate (Ansari et Emery, 1999). Toutefois, la phosphorylation par la kinase pU69 se montre dix fois moins sensible que celle effectuée par la phosphotransférase pUL97. Le ganciclovir est très utilisé et donne de bons résultats mais cette molécule est très toxique et peut notamment provoquer des neutropénies et des thrombocytopénies en fonction de la dose administrée. L'aciclovir et sa prodrogue le valaciclovir ne sont pas des molécules efficaces contre l'HHV-6 que ce soit dans les tests *in vitro* réalisés ou dans les situations cliniques où ces deux molécules ont été administrées.

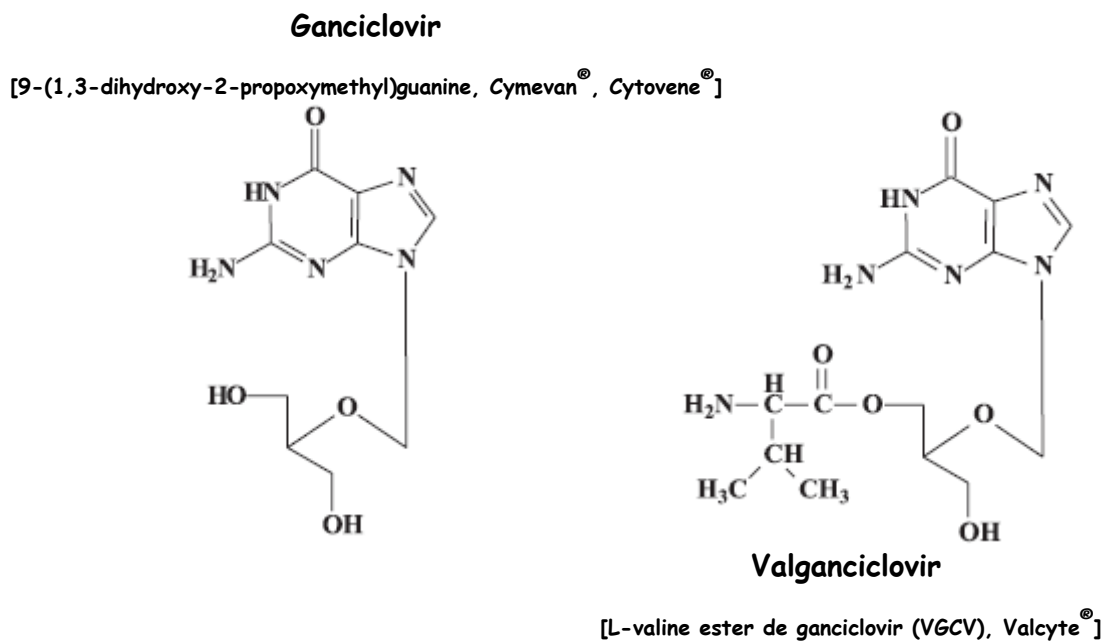
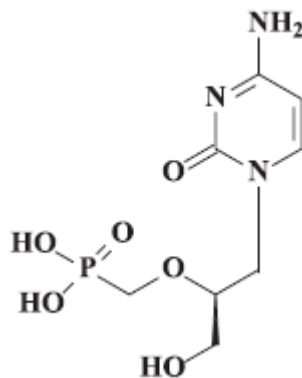


Figure 9 : Les analogues nucléosidiques utilisés dans le traitement des infections à HHV-6

VII-2. Analogue nucléotidique

Le cidofovir (Figure 10) est un nucléoside acyclique phosphonate analogue du dCMP. Il a un spectre d'action très large dirigé contre de nombreux virus à ADN. Cet analogue ne requiert aucune métabolisation par une enzyme virale. La présence du phosphonate assure la phosphorylation par deux enzymes cellulaires : la première étant la pyrimidine nucléoside monophosphate kinase et la seconde étant soit la nucléoside diphosphate kinase soit la pyruvate kinase soit la créatine kinase, ces dernières étant classées par efficacité décroissante. Ceci conduit à un état activé. Le cidofovir sous sa forme diphosphate est un compétiteur du dCTP et donc un substrat alternatif de l'ADN polymérase. Toutefois, son incorporation n'entraîne pas directement l'arrêt de la chaîne. Comme le ganciclovir, le cidofovir sous sa forme diphosphate présente une haute affinité pour l'ADN polymérase virale et moindre pour l'ADN polymérase cellulaire. Ce composé n'est utilisé qu'en seconde ligne de thérapie pour des souches virales résistantes aux traitements par le ganciclovir car il présente des risques importants de néphrotoxicité.



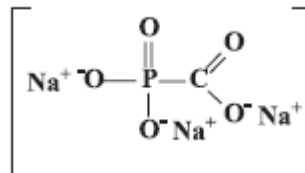
Cidofovir

[(S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine, HPMP, Vistide®]

Figure 10 : L'analogue nucléotidique utilisé dans le traitement des infections à HHV-6

VII-3. Analogue du pyrophosphate

Le foscarnet, un analogue du pyrophosphate, est aussi utilisé dans le traitement des infections à HHV-6 (Figure 11). Il possède un large spectre d'activité dirigé contre le VIH mais aussi et notamment contre tous les herpèsvirus. Il a également pour cible l'ADN polymérase mais cette fois-ci de façon directe. En effet, contrairement aux analogues précédents qui requièrent l'action d'enzymes cellulaires ou virales, son action se réalise grâce à une liaison réversible au niveau du site de liaison du pyrophosphate sur l'ADN polymérase. De ce fait, le clivage du pyrophosphate par les déoxynucléosides triphosphates est interrompu résultant en une inhibition du relargage de pyrophosphate ou en la terminaison de la chaîne. Il présente une néphrotoxicité dose dépendante réversible conduisant à une utilisation préférentielle du ganciclovir ou de sa prodrogue.



Foscarnet

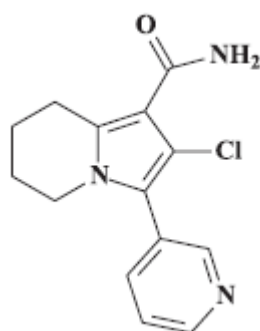
[trisodium phosphonoformate, foscarnet sodium, Foscavir®]

Figure 11 : L'analogue de pyrophosphate utilisé dans le traitement des infections à HHV-6

VII-4. Efficacité et Avenir

Dans une évaluation comparative de l'activité *in vitro* de l'acyclovir, du ganciclovir, du cidofovir et du foscarnet contre le virus HHV-6, le cidofovir s'est montré le meilleur candidat, avec le plus grand potentiel et le plus sélectif, sur des lymphocytes du sang de cordon infectés par l'HHV-6A (De Bolle et al., 2004). Lorsque ces composés ont été testés sur des lignées cellulaires T infectées par les deux variants de l'HHV-6, la réponse la plus importante a été atteinte par le foscarnet.

Le choix des composés retenus pour le futur se base sur l'analogie supposée de l'action sur le HCMV et l'HHV-6. Dans une étude récente plus de 20 composés allant des analogues nucléotidiques, nucléosidiques aux analogues non-nucléosidiques ont été testés. Un membre de cette étude semble retenir l'attention. Il s'agit du CMV423 (Figure 12). Ce composé fait partie des analogues non-nucléosidiques. Il se montre actif contre les *β-herpesvirinae* mais pas contre les autres sous-familles. Il est beaucoup plus sélectif dans son activité mais aussi moins toxique que le foscarnet, le ganciclovir, l'acyclovir et le cidofovir (De Clercq et Naesens, 2006). Le CMV423 inhibe le processus cellulaire impliquant l'activité de la tyrosine kinase intervenant à un stade précoce de la réplication virale.



CMV423

2-Chloro-3-pyridin-3-yl-5,6,7,8-tetrahydroindolizine-1-carboxamide

Figure 12 : Un analogue non-nucléosidique d'avenir

LE VIRUS D'EPSTEIN ET BARR

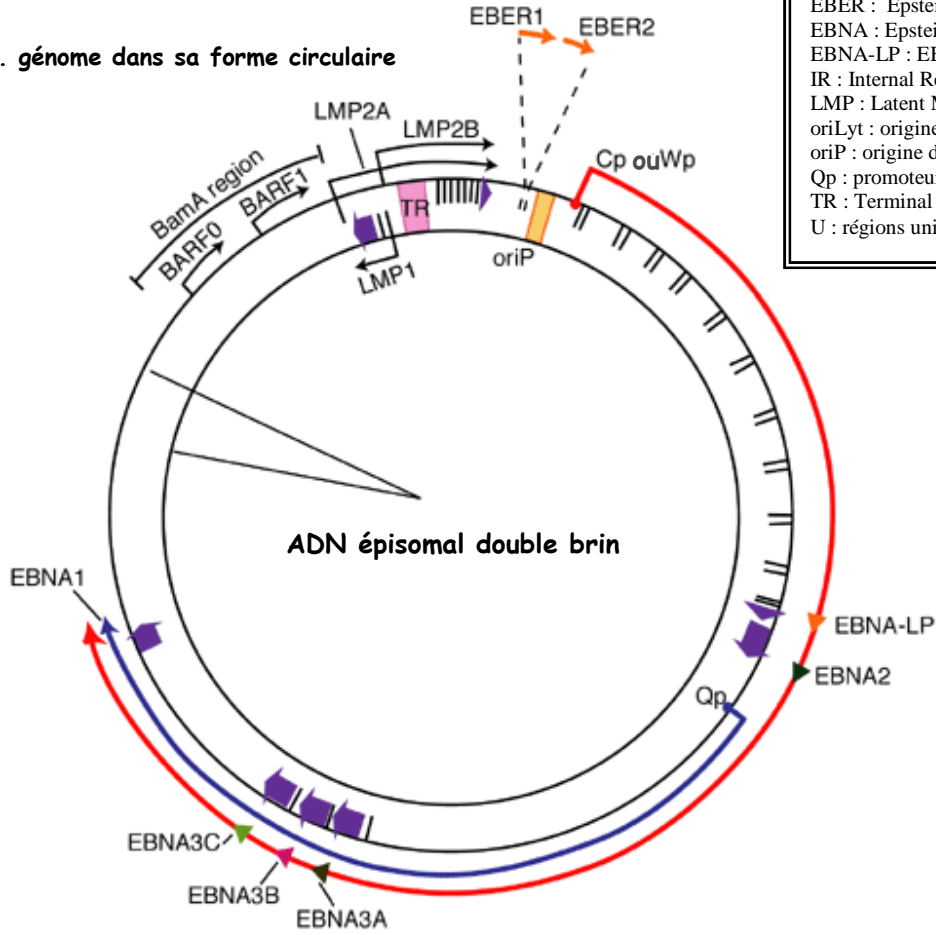
Ce chapitre de la thèse relate des informations contenues dans la littérature, seuls les aspects les plus essentiels et aidant à la compréhension de notre manuscrit ont été retenus car ce virus ne représente pas l'objectif premier de notre travail.

I. Introduction sur le virus d'Epstein et Barr

La découverte en 1964 du virus d'Epstein et Barr est issue d'un isolat de ce virus dans des lignées cellulaires établies à partir d'un lymphome de Burkitt ([Epstein, 1970](#)). Ce lymphome a été décrit pour la première fois en 1958 par Denis Burkitt dans une région de l'Est africain touchée par la malaria. Il provoque une atteinte de la mâchoire ainsi que des lésions abdominales. Cette pathologie survient généralement chez des enfants âgés de 7 à 9 ans. Les conditions environnementales telles que la pluviométrie ou la température semblent jouer un rôle et le lymphome de Burkitt survient dans des zones impaludées laissant penser que cette infection agirait comme cofacteur. Il existe deux types d'EBV nommés EBV-1, présent dans les pays développés, et EBV-2 trouvé majoritairement en Afrique. L'EBV, dix ans après sa découverte, a été démontré comme étant l'agent étiologique de la mononucléose infectieuse. Puis son caractère immortalisant des lymphocytes en culture ([Epstein, 2001](#)) et son oncogénicité ([Thompson et Kurzrock, 2004](#); [Young et Murray, 2003](#)) ont été mis en évidence. Plus tardivement, son implication dans des pathologies cancéreuses ([Ambinder, 2003](#)) telles que le lymphome de Burkitt, les carcinomes nasopharyngés, les lymphomes B, les désordres lymphoprolifératifs liés au chromosome X, le lymphome de Hodgkin, les tumeurs touchant les lymphocytes T périphériques ou encore les cancers gastro-intestinaux ([Macswen et Crawford, 2003](#)) a été étudiée. Comme tous les herpèsvirus, l'EBV est capable de rester à

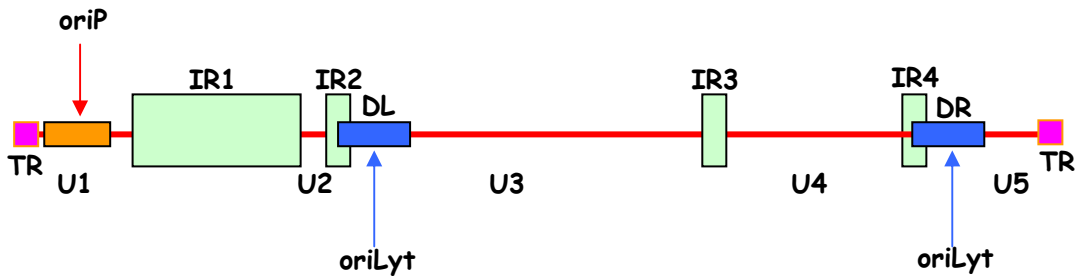
l'état de latence dans l'organisme qu'il a infecté mais également de réactiver. La transmission de ce virus s'effectue principalement par la salive. Son tropisme est limité aux lymphocytes B, aux cellules épithéliales de l'oropharynx. Comme l'HHV-6, l'EBV est un virus très répandu. En effet, plus de 90% de la population adulte est séropositive pour cet herpesvirus (Nicolas et al., 1997). La primo-infection, surtout lorsqu'elle survient dans la petite enfance, est très souvent asymptomatique sauf dans de rares cas où elle se manifeste par la mononucléose infectieuse (Young et Rickinson, 2004) qui survient chez l'adolescent et l'adulte jeune. Une hyperleucocytose associée à des lymphocytes T CD8+ activés est observée (Williams et Crawford, 2006). Les symptômes majeurs de cette infection sont une angine importante souvent très douloureuse, et la présence d'adénopathies multiples touchant de nombreux territoires, le tout pouvant s'accompagner d'une hépatomégalie et d'une splénomégalie.

a. génome dans sa forme circulaire



BARF : BamHI-A right frame
 Cp ou Wp : promoteur de EBNA-LP, 2, 3A, 3B, 3C
 DR et DL : régions conservées contenant les oriLyt
 EBER : Epstein Barr Encoded small RNA
 EBNA : Epstein Barr Nuclear Antigen
 EBNA-LP : EBNA-Leader Protein
 IR : Internal Repeat
 LMP : Latent Membran Protein
 oriLyt : origine de réplcation lytique
 oriP : origine de réplcation la tente
 Qp : promoteur de EBNA1
 TR : Terminal Repeat
 U : régions uniques

b. génome dans sa forme linéaire : représentation des régions uniques et des régions répétées



c. génome dans sa forme linéaire : représentation des sites de coupures par l'enzyme BamHI et des protéines de latence

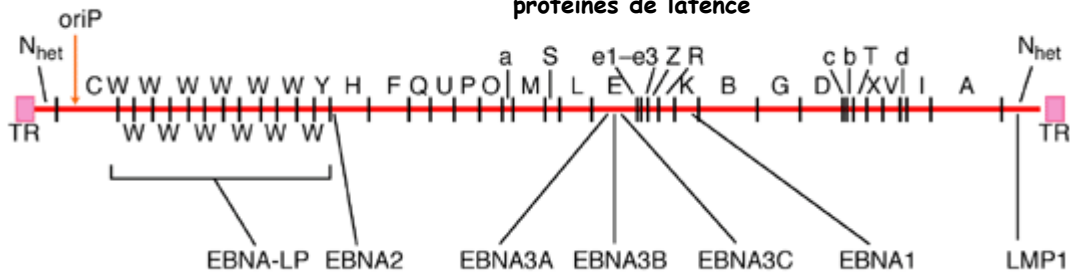


Figure 13 : Génome du virus d'Epstein et Barr

(D'après Murray et Young, 2001; Bornkamm et Hammerschmidt, 2001)

II. Caractéristiques générales du virus d'Epstein et Barr

Dans la famille des *Herpesviridae*, l'EBV fait partie de la sous-famille des *γ -herpesvirinae* et du genre *Lymphocryptovirus*, et possède les caractéristiques générales de l'ensemble des herpesvirus. Le génome de l'EBV (Figure 13) est une molécule d'ADN double brin linéaire de 175 kpb. Les régions terminales (TR) servant à la circularisation sont des répétitions en tandem d'environ 540 pb. Quatre régions internes répétées (IR1 à 4) sont réparties le long du génome sur une longueur de 3,1 kpb individualisant des régions uniques au nombre de cinq. Le virus possède également une origine de réplication latente (OriP) et selon les lignées une ou deux origines de réplication lytique (Orilyt), hautement conservées, de 1 kpb chacune, et situées dans les séquences DR et DL. Le génome persiste dans son intégralité dans les lymphocytes en prolifération sous forme épisomale circulaire (Fennewald et al., 1984; Kieff et Leibowitz, 1990; Reisinger et al., 2006). Il se réplique au moment de la division cellulaire.

III. Infection latente et cycle réplicatif

Le virus de l'EBV initie, établit et maintient son infection en utilisant la biologie des cellules B. L'EBV transmis par la salive, pénètre dans l'organisme au niveau de l'oro-pharynx et est capté par les amygdales où il infecte les cellules B naïves. Il y a alors expression de 9 protéines de latence que sont les 6 EBNA (1, 2, 3A, 3B, 3C, LP) et les 3 protéines membranaires de latence LMP1, 2A et 2B. Ces protéines présentent toutes les capacités nécessaires pour pousser la cellule B à devenir un lymphoblaste activé sans l'intervention d'un signal extérieur. Les lymphocytes infectés migrent dans le follicule ganglionnaire où ils prolifèrent. Il est à noter que, comme lors de la prolifération des cellules B normales, un contrôle des lymphocytes T helper se met en place afin de limiter cette prolifération. A cette étape, le programme de transcription viral change. Seules trois protéines sont exprimées il

s'agit de EBNA1, LMP1 et LMP2. LMP2 pousse les cellules B à former le centre germinale alors que LMP1 dérégule l'expression du facteur de transcription BCL6 (B cell lymphoma), celui-ci servant de signal aux cellules mémoires pour sortir du centre germinale. L'action combinée de ces deux protéines de latence conduit aux réarrangements des gènes des immunoglobulines. Les cellules B infectées de manière latente passent alors dans la circulation sanguine et se comportent comme des cellules B mémoires classiques. Ces cellules peuvent ne présenter aucune expression virale hormis celle de la protéine EBNA1 au moment de la division cellulaire. Lors de la primo-infection, on estime à 50% le nombre de cellules mémoires infectées, ce nombre diminue ensuite progressivement ([Thorley-Lawson, 2005](#)).

Lors d'une stimulation antigénique, les cellules B mémoires se différencient en plasmocytes, ce qui s'accompagne d'une réactivation virale avec entrée du virus dans un cycle lytique permettant la libération de virions et l'éventuelle transmission à un nouvel hôte.

Les cellules de l'épithélium oro-pharyngé, notamment des glandes salivaires, ne sont infectées que secondairement, après les cellules B naïves. Au niveau de ces cellules épithéliales le virus reste répliatif et non latent, ce qui correspond à la persistance de ce virus. Le rôle des protéines de latence EBNA1, dont le gène a servi à la quantification du virus lors de notre premier article, ainsi que celui de LMP1, ciblée dans les trois premiers articles vont être plus particulièrement décrits.

III-1. La protéine de latence EBNA1

Le produit du gène EBNA1 est une protéine nucléaire du même nom qui est associée à la chromatine. Elle présente une longue demi-vie et est très répandue dans les cellules normales et tumorales. C'est une phosphoprotéine qui se lie à l'ADN du virus au niveau de structures répétitives de OriP. Elle est nécessaire à la réplication et au maintien du génome sous forme épisomale et joue un rôle dans la ségrégation des épisomes viraux lors de la mitose. Elle est très exprimée au cours de la latence qu'elle contrôle. Elle a un rôle de transactivateur transcriptionnel et active le promoteur Cp ainsi que le promoteur de LMP1. Son expression semblerait être toxique dans certaines lignées puisqu'elle affecterait l'origine de réplication de certains gènes cellulaires. En outre, elle présente un rôle direct dans l'oncogenèse puisque son expression dans les cellules B de souris transgéniques conduit à un lymphome B : elle contribue à l'immortalisation des cellules-hôtes de l'EBV (Cohen, 2000).

III-2. La protéine de latence LMP1

La protéine LMP1 est issue du gène BNLF1 (Knecht et al., 1999). LMP1 est une protéine transmembranaire ayant des caractéristiques proches d'un récepteur cellulaire. Elle possède une demi-vie courte. Cette protéine est constituée d'un court domaine N-terminal intra-cytoplasmique de 24 acides aminés, de six domaines transmembranaires et d'un domaine C-terminal intra-cytoplasmique de 180 acides aminés (Bornkamm et Hammerschmidt, 2001). Elle est regroupée en amas dans la membrane cellulaire. LMP1 joue un rôle majeur dans les processus d'immortalisation et de transformation cellulaire. Dans des lignées B dérivées de lymphomes de Burkitt négatifs pour l'EBV, la seule expression de LMP1 après transfection s'accompagne de modifications phénotypiques [comme l'augmentation de l'IL-10 (Interleukine-10) par exemple] comparables à celles observées lors de la transformation

lymphocytaire B par l'EBV. L'expression de cette protéine dans des lignées fibroblastiques de rongeurs induit toutes les modifications propres aux oncogènes telles que la perte du phénomène d'inhibition de contact, la croissance indépendante d'un ancrage et la tumorigénicité dans les souris nude (Baichwal et Sugden, 1988; Wang et al., 1985). Par ailleurs, des souris transgéniques exprimant LMP1 sous la dépendance d'un promoteur B développent des lymphomes (Kulwichit et al., 1998). Par la création de virus EBV recombinants spécifiquement mutés pour LMP1, il a été montré que cette protéine, et en particulier sa portion C-terminale, joue un rôle indispensable dans la transformation cellulaire B par l'EBV (Kaye et al., 1993). Cette portion carboxy-terminale possède deux domaines, appelés CTAR1 (C-terminal activating region 1) ou TES1 (transformation effector site 1) et CTAR2 ou TES2, impliqués dans la fonction activatrice et transformante de LMP1. LMP1 (Figure 14) fonctionne comme un CD40 (TNFR, récepteur au TNF) constitutivement activé c'est-à-dire qui n'a pas besoin de ligand (Meyer et al., 2004; Uchida et al., 1999) En effet, CTAR1/TES1 contient un site de fixation des TRAFs (TNF receptor-associated factor), molécules adaptatrices impliquées dans la transduction de signal par les TNFR (Devergne et al., 1996; Mosialos et al., 1995). Le deuxième domaine, CTAR2/TES2, se lie directement aux molécules TRADD (TNFR associated death domain) et RIP (receptor interacting protein) également impliquées dans la transduction de signal par les TNFR (Izumi et al., 1997; Izumi et al., 1999b). Via ces interactions, LMP1 active les voies NFκB et c-jun N-terminal kinase (JNK)/AP1 (activator protein 1). L'activation de NFκB est essentielle à la survie des lignées transformées par l'EBV (Cahir-McFarland et al., 2000). Une étude a suggéré que LMP1 activerait également la voie Jak (Janus kinase)-STAT (signal transducers and activators of transcription) par interaction avec Jak3 (Gires et al., 1999). Toutefois, cette interaction n'a pas été observée par d'autres (Higuchi et al., 2002) et ne joue pas un rôle essentiel dans la transformation (Izumi et al., 1999a). LMP1 entraîne l'expression de molécules d'adhésion

[LFA1 (leucocyte function associated), LFA3, ICAM1 (inter cellular adhesion molecule)]. Elle stimule également la production de cytokines [IL-6, IL-8 et TGF- β (transforming growth factor β)] et augmente la production de molécules de survie (BCL2 et A20) (Thompson et Kurzrock, 2004; Young et Murray, 2003).

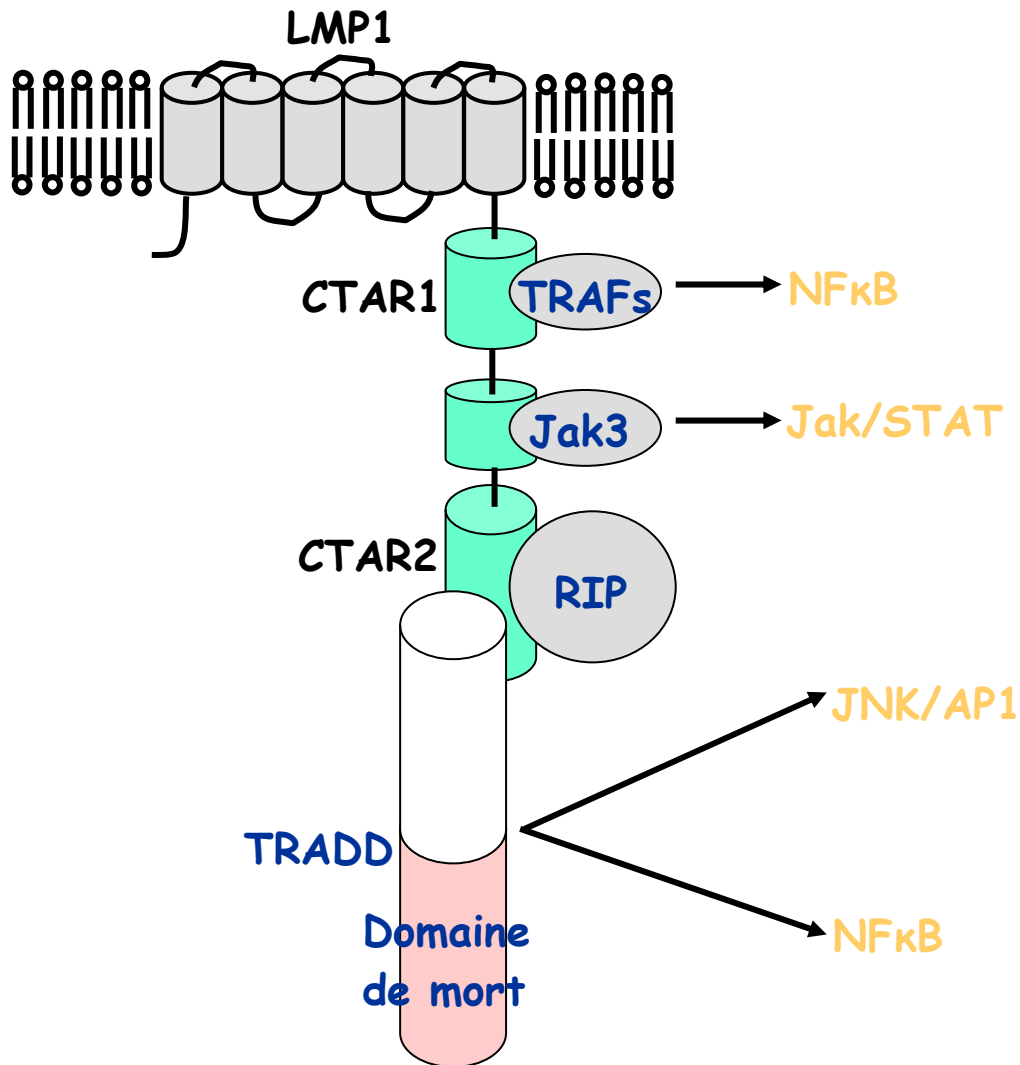


Figure 14 : Structure et fonctions de LMP1

(www3.gsf.de/GENV/Sig_tr/pics/lmp1_features.jpg)

IV. Les principales maladies associées

Outre le lymphome de Hodgkin dont les caractéristiques et l'association avec l'EBV seront décrites dans le chapitre suivant, deux autres pathologies sont fréquemment associées à cet herpesvirus.

IV-1. Le lymphome de Burkitt

Le lymphome de Burkitt est une tumeur du tissu lymphatique développée à partir de cellules B du centre germinatif. Il en existe deux formes. La forme endémique, qui est la forme associée à l'EBV, est présente en Afrique équatoriale et tropicale (surtout en Nouvelle-Guinée). Elle calque la répartition du paludisme et y serait associée. La forme non-endémique est présente dans les pays occidentaux et plus fréquente chez les malades atteints de SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise). Le lymphome de Burkitt est caractérisé par une expression anormale, à la fois en quantité et dans le temps, de l'oncogène *c-myc* suite à une translocation chromosomique entre les chromosomes 8 et les chromosomes 2, 14 ou 22; la plus fréquente étant la translocation t (8, 14). La mutation du gène p53 est également très fréquente dans le lymphome de Burkitt ([Bell et Rickinson, 2003](#)).

IV-2. Le carcinome du naso-pharynx

Le carcinome du naso-pharynx est un carcinome indifférencié avec la présence de cellules épithéliales transformées. C'est cette pathologie qui est le plus constamment associée à la présence de l'EBV. On trouve ce carcinome, essentiellement en Chine et en Asie du Sud-Est. Il semble exister une prédisposition génétique puisqu'une incidence élevée est retrouvée chez les descendants chinois (région de Canton) quel que soit leur lieu d'habitation. Ce carcinome est par ailleurs associé à des cofacteurs environnementaux tels que l'alimentation et notamment l'ingestion de poisson salé. En effet, l'EBV n'infecte normalement pas la muqueuse naso-pharyngée mais seulement les cellules épithéliales sensibilisées après l'exposition à des carcinogènes environnementaux comme ceux trouvés dans les poissons salés. Dans ces cellules, les protéines LMP1 et LMP2 sont présentes ce qui n'est pas le cas dans les cellules du lymphome de Burkitt.

LE LYMPHOME DE HODGKIN

I. Historique



Figure 15 : Thomas HODGKIN (1798-1866)

(D'après *Diehl et al., 2004*)

Le lymphome de Hodgkin est décrit comme une prolifération maligne ganglionnaire caractérisée par la présence de cellules de grande taille pathognomoniques nommées cellules de Hodgkin et cellules de Reed-Sternberg (HRS). En 1832, Thomas Hodgkin ([Figure 15](#)) fut le premier à décrire des cas de lésions lymphoïdes qui ont par la suite été nommées lymphome de Hodgkin ([Hodgkin, 1832](#)). Avec Thomas Hodgkin, Carl Sternberg en 1898 ([Sternberg, 1898](#)) et Dorothy Reed en 1902 ([Sternberg, 1902](#)) ont décrit des cellules particulières infiltrées au sein des tissus hodgkiniens. Elles ont été nommées cellules de Hodgkin lorsqu'elles étaient mononucléées et cellules de Reed-Sternberg lorsqu'elles étaient multinucléées. Les cellules de RS sont de très grandes cellules bi ou multinucléées mais au noyau multilobé qui peuvent atteindre un diamètre de plus de 50 μm et qui ont un cytoplasme de taille modérée et amphophile, chacune contenant un grand nucléole entouré d'un halo clair de nucléoplasme avec une chromatine finement réticulée ([Weiss et al., 1999](#)). Le diagnostic

de lymphome de Hodgkin repose sur la mise en évidence de cellules RS dont la présence est indispensable au diagnostic de cette pathologie alors que les cellules de Hodgkin moins caractéristiques sont insuffisantes au rendu de ce résultat. Cette maladie est longtemps restée énigmatique. En effet, les cellules caractéristiques du lymphome sont très rares dans le tissu concerné et ces cellules possèdent un phénotype très différent de celui observé habituellement pour tous les types de cellules hématopoïétiques normales. De plus, très peu de lignées cellulaires ont pu être établies (Drexler, 1993; Wolf et al., 1996) ce qui a beaucoup compliqué les études à ce sujet. Seules des techniques d'immuno-histochimie étaient utilisables et il a fallu attendre les techniques actuelles de biologie moléculaire pour découvrir un plus grand nombre de choses concernant cette pathologie.

II. Histopathologie

La caractéristique du lymphome de Hodgkin est le faible nombre de cellules typiques HRS dans un important infiltrat cellulaire composé de nombreux types cellulaires (Hansman et al., 1999; Weiss et al., 1999). Cet infiltrat différencie par ailleurs le lymphome de Hodgkin de la plupart des lymphomes non-hodgkiniens. Habituellement, les cellules HRS constituent moins de 1% des cellules composant le tissu hodgkinien. L'infiltrat cellulaire est essentiellement composé d'éléments réactifs non-néoplasiques incluant des cellules T, des cellules B, des plasmocytes, des histiocytes, des polynucléaires éosinophiles et neutrophiles (Chan, 2001). Les différences de composition cellulaire observées après biopsie ont abouti à une classification réalisée selon la REAL : Revised European American Lymphoma et la WHO : World Health Organization, classification qui répertorie les tumeurs malignes hématologiques. Le lymphome de Hodgkin à prédominance lymphocytaire récemment nommé paragranulome nodulaire (Fraga et Forteza, 2007), ainsi que 4 sous-types au sein du

lymphome de Hodgkin dit "classique" ont ainsi pu être individualisés (Harris et al., 2000; Weiss et al., 1999).

✂ Les 4 sous-types de la forme dite "classique" sont nommés et décrits de la façon suivante (Figure 16) :

☞ la forme riche en lymphocytes (type 1 selon la REAL) montre une prédominance des lymphocytes B. L'image histologique est semblable à celle observée dans le sous-type à prédominance lymphocytaire mais se distingue par le phénotype et la morphologie des cellules HRS qui sont similaires à ceux rencontrés lors des deux premières formes citées (Anagnostopoulos et al., 2000). Dans le monde, elle constitue 15 à 20% des cas.

☞ la forme scléro-nodulaire (type 2) est la plus fréquente puisqu'elle représente 50 à 60% des cas rencontrés dans le monde. Elle est caractérisée par des aires nodulaires qui sont séparées de bandes sclérotiques.

☞ la forme à cellularité mixte (type 3) montre une distribution plus diffuse des cellules et une sclérose quasi-absente. Elle compte environ 15% des cas mondiaux.

Il est à noter que dans les deux sous-types précédemment cités, les cellules T prédominent dans l'infiltrat lymphocytaire.

☞ la forme à déplétion lymphocytaire (type 4) est rare puisqu'elle constitue moins de 1% des cas. Elle se caractérise par une distribution diffuse des cellules, une petite infiltration lymphocytaire, et la présence d'aires nécrotiques aussi bien que d'aires sclérotiques.

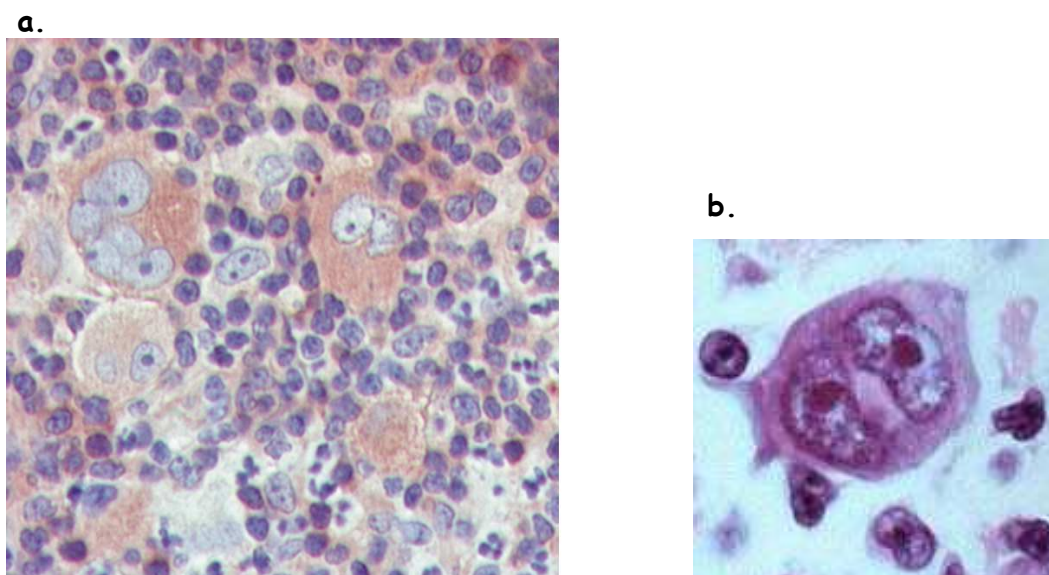


Figure 16 : Lymphome de Hodgkin classique (a) et sa cellule caractéristique (b) : la cellule de Reed-Sternberg

(D'après *Thomas et al., 2004*;

www.lymphome.de/InfoLymphome/HodgkinLymphome/HodgkinZelle.jpg)

✂ Le lymphome de Hodgkin à prédominance lymphocytaire ou paragranulome nodulaire (Figure 17) compte 5% des cas de lymphome de Hodgkin (Tsai et Mauch, 2007). Dans ce type, les lymphocytes et plus particulièrement les lymphocytes B prédominent dans l'infiltrat cellulaire et les cellules tumorales sont nommées cellules lymphocytiques et histiocytiques (L et H) (Hansmann et al., 1999). Les cellules L et H ne sont pas d'aussi grande taille que les cellules HRS caractéristiques du lymphome de Hodgkin "classique". De plus, elles présentent un nucléole moins marqué et sont, dans de rares cas, multinucléées.

Il existe dans le diagnostic une distinction phénotypique entre les cellules HRS du lymphome de Hodgkin "classique" et les cellules L et H du lymphome de Hodgkin à prédominance lymphocytaire. En effet, les cellules HRS du LH expriment à leur surface un membre de la famille des récepteurs au TNF, le CD30, et souvent le CD15, mais pas le CD20, qui est un marqueur des cellules B. Les cellules L et H sont, quant à elles, et contrairement aux cellules HRS, CD20 positives et CD30 ainsi que CD15 négatives.

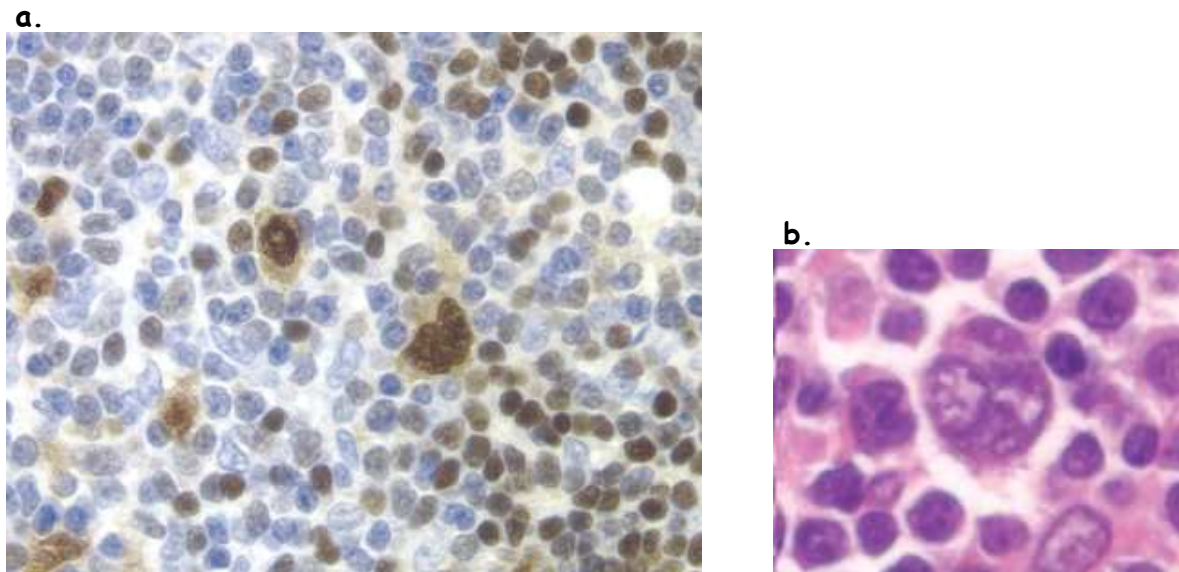


Figure 17 : Paragranulome nodulaire (a) et sa cellule caractéristique (b) : la cellule lymphocytaire et histiocytique

(D'après *Fraga et Forteza, 2007*)

III. Epidémiologie

Le lymphome de Hodgkin est moins commun que les lymphomes non-hodgkiniens. En effet, pour environ 7 cas de lymphomes non-hodgkiniens il y a seulement 1 cas de lymphome de Hodgkin. Toutefois, le lymphome de Hodgkin est un des lymphomes les plus fréquents avec un taux d'incidence annuel de 3 ou 4 nouveaux cas pour 100 000 personnes dans le monde occidental (*Kuppers et al., 2006*). Au niveau mondial, le lymphome de Hodgkin affecte environ 62 000 personnes par an et cause environ 25 000 décès par an (*Parkin et al., 2001*). Les facteurs de risque sont : le sexe masculin, une classe sociale élevée, la notion de mononucléose infectieuse fortement symptomatique, un passé familial incluant des lymphomes ou une infection par le VIH (*Glaser et Jarrett, 1996*). La prévalence chez les femmes avait augmenté ces dernières années, mais elle tend à décroître alors que chez les hommes, le taux reste constant et plus élevé que chez les femmes (*Cartwright et al., 1999*).

Parmi les facteurs de risque, il faut aussi compter des facteurs infectieux (EBV notamment et HHV-6 probablement), génétiques et immunologiques. Par ailleurs, le risque de souffrir d'un LH est encore plus important lorsque les patients présentent à la fois des défauts dans le fonctionnement des cellules T et des anomalies génétiques. Ce risque peut également être augmenté en cas d'immunodéficience congénitale ou dans des conditions autoimmunes particulières telles une immunosuppression iatrogénique incluant une transplantation de moelle osseuse allogénique ou encore un traitement au méthotrexate (Said, 2007).

L'incidence est bimodale avec un premier pic dans la tranche d'âge 15-34 ans et un second pic de moindre intensité après l'âge de 60 ans (Cartwright et Watkins, 2004; Tsang et al., 2006; Young et Iland, 2007). Le taux d'incidence après 60 ans atteint des chiffres de 6 cas pour 100 000 personnes et par an. Le taux de survie relative après 5 ans a très fortement augmenté puisqu'il était environ de 71% dans les années 1975 alors qu'il atteint 85% dans les années 2000.

IV. Manifestations cliniques

IV-1. Symptômes

Des ganglions lymphatiques gonflés mais indolores sont le signe le plus fréquent de la maladie de Hodgkin. Environ un tiers des malades présentent aussi des symptômes systémiques tels qu'un amaigrissement de plus de 10% de la masse corporelle en 6 mois, une sensation de fatigue, de la fièvre supérieure à 38°C, des sueurs nocturnes abondantes ainsi qu'un prurit isolé. Ces symptômes permettent eux aussi d'orienter le diagnostic.

Les adénopathies sont superficielles dans 80% des cas au moment du diagnostic alors que seuls 10 à 15% des cas présentent des adénopathies médiastinales isolées. La localisation

ganglionnaire la plus fréquente est cervicale ou sus-claviculaire, moins souvent axillaire et rarement inguinale. L'extension de la maladie se fait de proche en proche par voie lymphatique. Il existe parallèlement une dissémination par voie sanguine à l'origine des localisations viscérales de la maladie et notamment de l'atteinte splénique qui est présente dans la moitié des cas.

Chaque sous-type présente ses propres manifestations cliniques (Ekstrand et Horning, 2002). La forme scléro-nodulaire atteint préférentiellement les adolescents et les jeunes adultes et présente un syndrome localisé au niveau cervical bas, supra-claviculaire et médiastinal. La forme à cellularité mixte est la plus prévalente au niveau des enfants et des personnes âgées et est souvent associée à un stade avancé de la maladie et un mauvais pronostic. La forme à déplétion lymphocytaire est souvent présente chez les personnes âgées mais sans adénopathies périphériques significatives. Cette forme est souvent associée au VIH. La forme riche en lymphocytes du lymphome de Hodgkin "classique" apparaît le plus souvent chez les hommes âgés et touche la région cervicale. La forme à prédominance lymphocytaire du lymphome de Hodgkin non "classique" présente les mêmes caractéristiques que la précédente mais les patients atteints sont moins âgés.

IV-2. Diagnostic

Le diagnostic peut être fait à l'aide d'une biopsie ganglionnaire qui montre une ou plusieurs cellules caractéristiques du lymphome de Hodgkin : les cellules de Reed-Sternberg. La biopsie ganglionnaire est indispensable dans tous les cas. Elle doit être faite sur une adénopathie aussi typique que possible. L'examen anatomo-pathologique permet alors d'affirmer le diagnostic et de préciser le type histologique.

Par la suite un bilan d'extension est réalisé. En effet, l'hématologue doit déterminer le stade de la maladie et les aires corporelles touchées. Une radiologie ainsi qu'un scanner des zones

thoraciques et pelviennes sont réalisés et complétés par une analyse de sang et une biopsie ostéoméduillaire. Selon les résultats, le patient sera classé grâce à la classification d'Ann Arbor ([Connors, 2005](#); [Ekstrand et Horning, 2002](#); [Yung et Linch, 2003](#)) dans l'un des quatre stades suivants :

⊗Stade I : envahissement d'un seul ganglion ou d'une seule région extra-lymphatique (I_e)

⊗Stade II : implication de deux ou plusieurs zones ganglionnaires situées du même côté du diaphragme ou d'une ou plusieurs autres régions ganglionnaires avec une zone extra-lymphatique contiguë (II_e)

⊗Stade III : atteinte de régions ganglionnaires de part et d'autre du diaphragme qui peut inclure la rate (III_s), être limitée à une région ou un organe extra-lymphatique contigu (III_e) ou atteindre les deux (III_{s+e})

⊗Stade IV : invasion d'un ou plusieurs organes extralymphatiques.

Par ailleurs, l'absence de signes systémiques généraux (fièvre, amaigrissement, sueurs nocturnes) est notifiée en ajoutant la lettre A au numéro du stade alors que la présence de ceux-ci est notée B. Un X peut être également ajouté lors de ganglions présentant un diamètre supérieur à 10 cm ou plus, ou encore d'une masse médiastinale égalant ou dépassant le tiers du diamètre transversal du thorax. Un pronostic défavorable de survie est associé à la présence de sept facteurs : un âge supérieur ou égal à 45 ans, le stade IV de la maladie, une hémoglobine inférieure à 10,5 mg/dl, un nombre de lymphocytes inférieur à 8%, des leucocytes sanguins, le sexe masculin, une albumine inférieure à 4 mg/dl et un nombre de globules blancs supérieur ou égal à 15 000 par µl. Sous traitement classique, en présence de l'ensemble de ces facteurs, la survie à 5 ans est de 84% alors qu'elle est seulement de 72% pour les patients ayant moins de 5 facteurs sur 7.

V. Biologie des cellules HRS

Depuis peu, les cellules HRS ont été reconnues comme appartenant à la lignée lymphocytaire B mature avec toutefois de nombreuses modifications.

V-1. Origine des cellules HRS : le centre germinal (Figure 18)

Pour définir leur appartenance, les cellules HRS ont été isolées par micromanipulation à partir de tissus ou de suspensions cellulaires pour analyser les réarrangements des gènes constituant les immunoglobulines (Kuppers et al., 2002). Mais avant tout, la connaissance du développement et de la différenciation des cellules B normales qui se passe dans le centre germinal sont nécessaires à la compréhension de l'origine et du caractère transformé des cellules HRS.

Les cellules B normales sont générées dans la moelle osseuse à partir de précurseurs hématopoïétiques. Dans leur développement, des segments de gènes (V, D et J pour la chaîne lourde des Ig; V et J pour les chaînes légères κ et λ) codant pour la région variable des Ig sont assemblés. Le nombre des segments pour la recombinaison ainsi que la diversité des sites de liaison entre chacun d'entre eux pourvoit une cellule B équipée d'un récepteur unique BCR (B-cell receptor). Cette cellule est alors activée à la rencontre d'un antigène connu et migre dans le follicule. Le BCR peut alors servir de marqueur pour l'expansion clonale. Les cellules B exprimant un BCR fonctionnel sont ensuite relarguées vers la périphérie du follicule et constituent les cellules B naïves. Si une cellule B naïve mature rencontre un antigène pouvant se lier spécifiquement au BCR, elle est alors activée et peut participer à la réponse immune dirigée contre l'antigène (Rajewski, 1996). Cette cellule migre dans le centre germinal où elle prolifère. Ces cellules B prolifératives du centre germinal sont appelées centroblastes et sont

concentrées dans la zone sombre du centre germinal. Dans ces cellules un processus d'hypermutations somatiques est activé et modifie la région V de la chaîne lourde de l'Ig (Berek et al., 1991; Jacob et al., 1991; Kuppers et al., 1993). Ceci augmente le nombre de variants par rapport au BCR original. Les cellules B ayant gagné de l'affinité avec l'augmentation des mutations sont sélectionnées positivement. Ce processus de sélection implique également deux autres constituants de la zone claire du centre germinal : les cellules T helper et les cellules dendritiques (CD) folliculaires (MacLennan, 1994). Les cellules B montrent dès lors une activité proliférative moindre et sont appelées centrocytes. Puis des cycles de prolifération, mutation et sélection se répètent pour chacune des cellules. Enfin les cellules B se différencient en cellules B mémoires ou en précurseurs de plasmocytes et quittent le centre germinal (Arpin et al., 1995). Dans une voie opposée, un grand nombre de mutations somatiques peuvent se montrer désavantageuses pour les cellules B du centre germinal (Wiens et al., 1997). En effet, les mutations d'acides aminés peuvent diminuer l'affinité abolissant ainsi la liaison avec l'antigène ou encore interférer dans le repliement des chaînes lourdes et légères et ainsi empêcher l'expression du récepteur à la surface de la cellule. Ces mutations peuvent également entraîner l'apparition d'un codon stop ou aboutir à la délétion ou la duplication de nucléotides qui changent le cadre de lecture classique. Un programme apoptotique apparaît lors de ces mutations désavantageuses (Liu et al., 1989). Seules les cellules B du centre germinal ayant acquis une affinité suffisante et n'ayant pas de mutations peuvent interagir avec les cellules T et les cellules dendritiques folliculaires du centre germinal. Elles reçoivent par ces cellules des signaux de survie et échappent ainsi à la voie apoptotique. C'est à partir de ces cellules normales que se formeront les cellules HRS, après quelques transformations additionnelles.

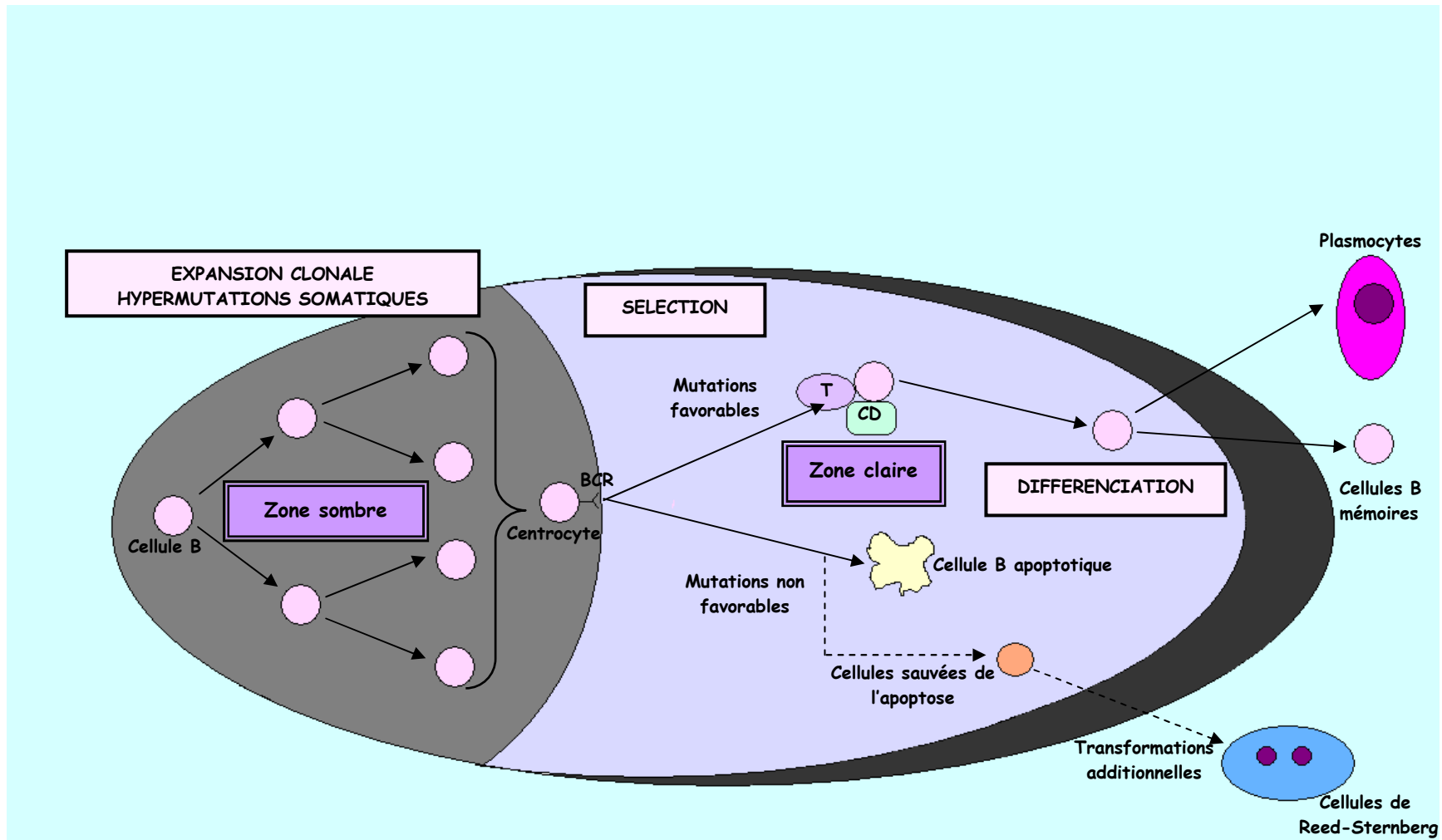


Figure 18 : Génération des cellules de Reed-Sternberg

(D'après *Thomas et al., 2004; Kupperts, 2002*)

V-2. Les cellules HRS

Les cellules HRS ne ressemblent à aucune cellule normale du système hématopoïétique (Figure 20). Ces cellules co-expriment des marqueurs de différents types cellulaires (Re et al., 2005a; Younes et Carbone, 2003):

- ✂ marqueurs des cellules dendritiques : fascine, TARC (Thymus and activation-regulated chemokine)

- ✂ marqueurs des granulocytes

- ✂ marqueurs des monocytes (CD15 inconstamment exprimé)

- ✂ marqueurs des cellules B (Pax-5 ou paired homeobox-5, E2A, EBF ou early B-cell factor)

- ✂ marqueurs des plasmocytes (MUM-1 ou multiple myeloma oncogene-1, CD138)

- ✂ marqueurs des lymphocytes : CD30

- ✂ dans certains cas, d'autres marqueurs des cellules B (CD20) et des cellules T (CD3, granzyme B et perforine) sont exprimés.

En immuno-histochimie, les cellules tumorales sont caractérisées par la présence de marqueurs d'activation tels que le CD30 (Ki-1) précédemment cité qui est prépondérant et qui appartient à la superfamille des récepteurs au TNF, le CD25 qui est le récepteur à l'interleukine 2, le CD71 qui est le récepteur à la transferrine et le HLA-DR (Human leucocyte antigen). Il n'y a, par ailleurs, pas d'expression d'ALK (anaplastic lymphoma kinase) ni de CD45 ce qui peut servir à différencier les cellules de RS d'autres cellules lymphomateuses.

On observe globalement dans les cellules HRS une perte du phénotype B classique. La dérégulation négative de ce phénotype affecte surtout les molécules de surface (CD22, CD52)

et les composants de certaines voies de signalisation (Syk, Blk) et des facteurs de transcription (Spi-B, A-myb). Il existe également une dérégulation négative de certains facteurs de transcription spécifiques aux cellules B (Oct2, Bob1 et Pu1) (Re et al., 2001; Stein et al., 1997). La dérégulation négative dans les cellules HRS des molécules appartenant aux cellules B normales n'est pas encore bien connue.

De façon intéressante, le facteur de transcription Notch-1 qui n'est normalement pas exprimé dans les cellules B et arrête la différenciation des cellules B en faveur des cellules T dans les précurseurs lymphoïdes, est exprimé dans les cellules HRS (Jundt et al., 1999). Cette expression aberrante pourrait avoir un rôle dans la perte du phénotype B des cellules HRS.

Certains aspects de la morphologie et de l'immunophénotype des cellules HRS pourraient être dûs à la régulation négative de l'expression de CD99 dans ces cellules. CD99 est une protéine transmembranaire glycosylée qui est exprimée dans de nombreux types cellulaires (Dworzak et al., 1994; Gelin et al., 1989). La répression de l'expression de CD99 dans les cellules B entraîne l'apparition de cellules multinucléées ressemblant aux cellules HRS (Lee et al., 2001) et qui expriment partiellement CD15 (Kim et al., 1998).

Cette perte du phénotype B pourrait également être due à l'expression aberrante de certains inhibiteurs de marqueurs présents à la surface des cellules B. L'exemple le plus marquant semble être celui du facteur de transcription E2A qui est régulé négativement par interaction directe avec l'inhibiteur de la différenciation Id2 (Janz et al., 2006; Kuppers et Brauning, 2006; Mathas et al., 2006; Renne et al., 2006). Par ailleurs, la présence de E2A confère aux cellules une résistance à l'apoptose (Lietz et al., 2007).

V-3. Les mécanismes de transformation (Figure 19)

Les cellules HRS présentent des défauts chromosomiques dans presque tous les cas. Ceux-ci sont plutôt d'ordre numériques, ce qui indique une instabilité chromosomique des cellules HRS. Des études cytogénétiques ont montré que les cellules HRS portaient des translocations chromosomiques mais les proto-oncogènes BCL-2, BCL-6, C-MYC, MALT1, très souvent impliqués dans les lymphomes non-hodgkiniens affectant la cellule B, ne sont affectés que de façon très rare au sein de la cellule de RS typique du LH (Martin-Subero et al., 2004).

Les mutations dans les gènes suppresseurs de tumeurs comme p53, CD95 ou encore le proto-oncogène n-ras sont absentes (Kuppers, 2002).

Le facteur de transcription NF κ B, dans les cellules HRS du LH classique, présente une activation constitutive jouant un rôle important dans le signal de survie de ces cellules (Jost et Ruland, 2007). Cette activité est due en partie aux différents membres de la famille du récepteur au tumor necrosis factor (CD30 et CD40) qui s'activent de façon autonome. Elle pourrait également être due à des mutations somatiques de I κ B α , inhibiteur de NF κ B, qui pourraient apparaître dans 30% des cas (Cabannes et al., 1999).

De plus, des amplifications génomiques de c-Rel, de Jak2 et de MDM2 (Murine double minute protein 2) sont fréquemment présentes dans les cellules HRS (Joos et al., 2000; Kupper et al., 2001; Martin-Subero et al., 2002). c-Rel est un composant de NF κ B, Jak2 intervient dans la voie de signalisation cytokinique Jak/STAT comme un transducteur du signal et MDM2 est un inhibiteur de la p53.

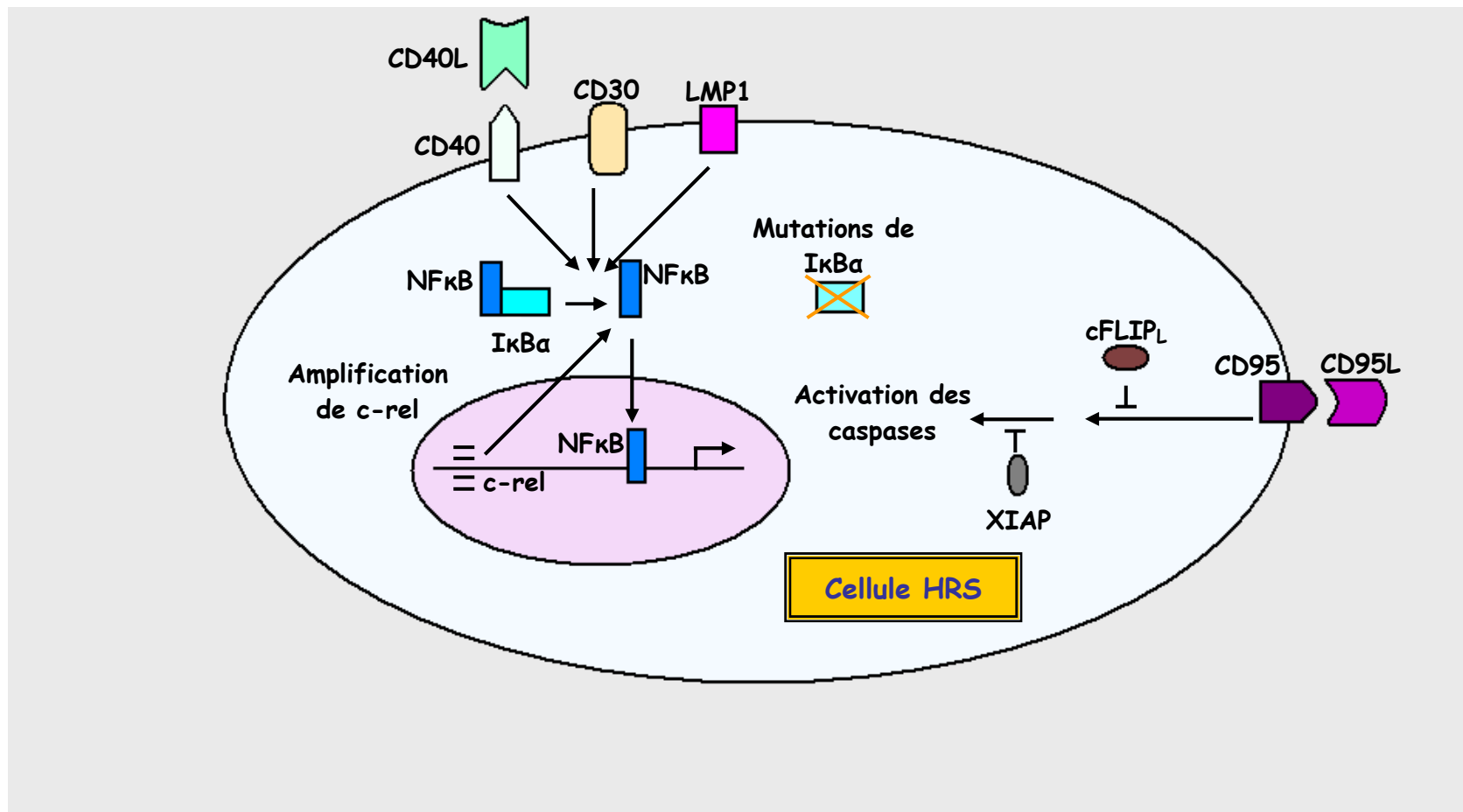


Figure 19 : Voies de signalisation internes à la cellule HRS

(D'après *Kuppers et Hansmann, 2005; Brauning et al., 2006*)

Tous ces mécanismes de transformation ont été décrits dans la forme classique de la maladie. La forme à prédominance lymphocytaire est moins décrite et seule une translocation chromosomique du gène BCL-6 a été décrite (Wlodarska et al., 2003).

V-4. Les mécanismes anti-apoptotiques (Figure 19)

L'apoptose est définie comme une mort cellulaire médiée par les caspases dont la caspase centrale est la caspase-3. Cette dernière est exprimée par les cellules HRS mais pas par les cellules L et H (Izban et al., 1999). Les analyses fonctionnelles montrent toutefois que bien qu'exprimée, elle est inactive. De plus, des molécules empêchent l'activation de la caspase 3 dans les cellules HRS. Ce sont c-FLIP (cible de NFκB, cellular-fllice like inhibitory proteins) (Thomas et al., 2002) et XIAP (un inhibiteur de l'apoptose lié au chromosome X) (Kashkar et al., 2003). L'expression de c-FLIP inhibe deux intervenants dans l'induction de l'apoptose que sont TRAIL (TNF related apoptosis-inducing ligand) et CD95. Les cellules HRS sont résistantes à l'apoptose médiée par CD95 et présentent également des mutations somatiques de ce gène qui causent probablement des pertes dans la fonctionnalité de CD95. Ces intervenants font partie de la voie extrinsèque de l'apoptose.

La voie intrinsèque dépend quant à elle des protéines de la famille BCL-2. Le défaut de la protéine BAX (BCL-2 associated protein) a été associé à la résistance apoptotique des cellules HRS (Kashkar et al., 2002). Les membres de la famille IAP (inhibitor of apoptosis protein), dont XIAP fait partie, possèdent le même rôle.

Vue l'action de c-FLIP et de XIAP, qui sont des cibles de NFκB, l'activité de NFκB pourrait être considérée comme conférant aux cellules HRS un phénotype résistant à l'apoptose.

Les autres voies connues comme étant dérégulées dans les cellules HRS sont la voie MEK/ERK (mitogen activated or extracellular signal regulated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase) (Zheng et al., 2003), la voie AP1 (Mathas et al., 2002), la cascade de signalisation PI3 kinase (phosphoinositide 3-kinase) (Georgakis et al., 2004). Ces voies contribuent à la résistance des cellules HRS au phénomène d'apoptose.

V-5. Les dérégulations des cytokines, des chimiokines et des membres de la famille du récepteur au TNF (Figure 20)

a. Les cytokines

Ce sont des protéines de bas poids moléculaire qui régulent de nombreux processus biologiques.

Le réseau de cytokines est important à la fois dans la prolifération des cellules HRS avec l'IL-13 et dans le maintien d'un environnement favorable caractérisé par des cellules immunitaires spécifiques comme les éosinophiles avec l'IL-5 et les cellules T régulatrices avec la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 ou le TGF β . Les interleukines 4, 6, 7, 9, 15 sont également exprimées et influent sur la survie des cellules HRS (Maggio et al., 2002). L'IL-13 aurait par ailleurs un rôle important de facteur de croissance autocrine des cellules HRS. Il est à noter que son récepteur est également présent au sein des cellules HRS (Kapp et al., 1999; Ohshima et al., 2001; Skinnider et al., 2001).

b. Les chimiokines

Ce sont des cytokines particulières impliquées spécifiquement dans la migration des leucocytes. Les différents sous-types de lymphome de Hodgkin ont un environnement composé de chimiokines différentes. TARC nommée encore CCL17 (chemokine C-C motif ligand 17) et la protéine inductible à l'interféron (IFN) γ IP-10 (interferon-inducible protein 10) ou CXCL10 (chemokine C-X-C motif ligand 10) sont seulement trouvées dans le lymphome de Hodgkin classique alors que MDC (Macrophage derived chemokine) appelée aussi CCL22 une chimiokine dérivant du macrophage est trouvé dans les deux types de lymphome de Hodgkin. TARC est connue pour attirer les lymphocytes T CD4+ ([Peh et al., 2001](#); [Van Den Berg et al., 1999](#)).

Les cellules HRS sécrétant des chimiokines sont également impliquées dans l'attraction d'éosinophiles et de plasmocytes. L'éotaxine ou CCL11 exprimée par les fibroblastes est une chimiokine potentiellement attractive d'éosinophiles notamment dans le sous-type scléro-nodulaire du lymphome de Hodgkin classique ([Jundt et al., 1999](#)). Elle pourrait également être attractive de lymphocytes T CD4+. Par ailleurs, CCL28 qui attire les éosinophiles via CCR3 (chemokine C-C motif receptor 17) et les plasmocytes via CCR10 et CCR3 est exprimée dans les cellules HRS ce qui fournit une explication à la présence de plasmocytes dans les tissus infectés par le lymphome de Hodgkin ([Hanamoto et al., 2004](#)).

c. La famille des récepteurs au TNF

Ils jouent un rôle de co-stimulation des cellules lymphatiques pendant la réponse inflammatoire. Cette famille est la plus importante dans la pathogénèse du lymphome de Hodgkin.

Les cellules HRS expriment à la fois le récepteur CD30 et son ligand le CD30L autrement nommé CD153. Ceci suggère un mécanisme autocrine de prolifération des cellules HRS. L'activité NFκB et celle du récepteur CD30 sont des processus indépendants du CD30L.

CD40 et RANK (receptor activator of NFκB) sont également exprimés à la surface des cellules HRS. Le ligand CD40L induit la prolifération des lignées cellulaires HRS ([Carbone et al., 1995a et b](#)) et protège ces mêmes cellules de l'apoptose induite par CD95 ([Metkar et al., 1998](#)). La co-expression du ligand de RANK, ainsi que de ses récepteurs RANK et ostéoprotégérine dans les lignées HRS, indique la formation d'une boucle autocrine dans cette voie. L'activation de RANK contribue à l'activation de NFκB et induit la production de cytokines comme IFN-γ ou l'IL-13. Ces dernières participent au maintien d'un environnement inflammatoire dans le lymphome de Hodgkin.

Le TNFα, l'un des médiateurs les plus importants de l'inflammation est présent dans les tissus hodgkiniens ([Kretschmer et al., 1990](#)) et stimule notamment les fibroblastes.

Les cellules stromales dendritiques du réticulum situées autour des cellules HRS produisent un facteur de croissance hépatocytaire qui se lie à la tyrosine kinase transmembranaire c-met influençant ainsi l'adhésion et la survie des cellules HRS ([Teofili et al., 2001](#)).

L'interaction des cellules HRS avec d'autres cellules de l'environnement est influencée par l'expression de l'inhibiteur tissulaire de métalloprotéinase TIMP-1 et la métalloprotéinase de matrice MMP-2, expliquant ainsi certaines propriétés immunosuppressives et adhésives.

Le facteur de croissance endothélial VEGF (vascular endothelial growth factor), joue un rôle important dans le maintien du réseau cellulaire et est exprimé dans 70% des cas au sein du lymphome de Hodgkin. Sa présence semble être un facteur défavorable dans le pronostic du lymphome de Hodgkin.

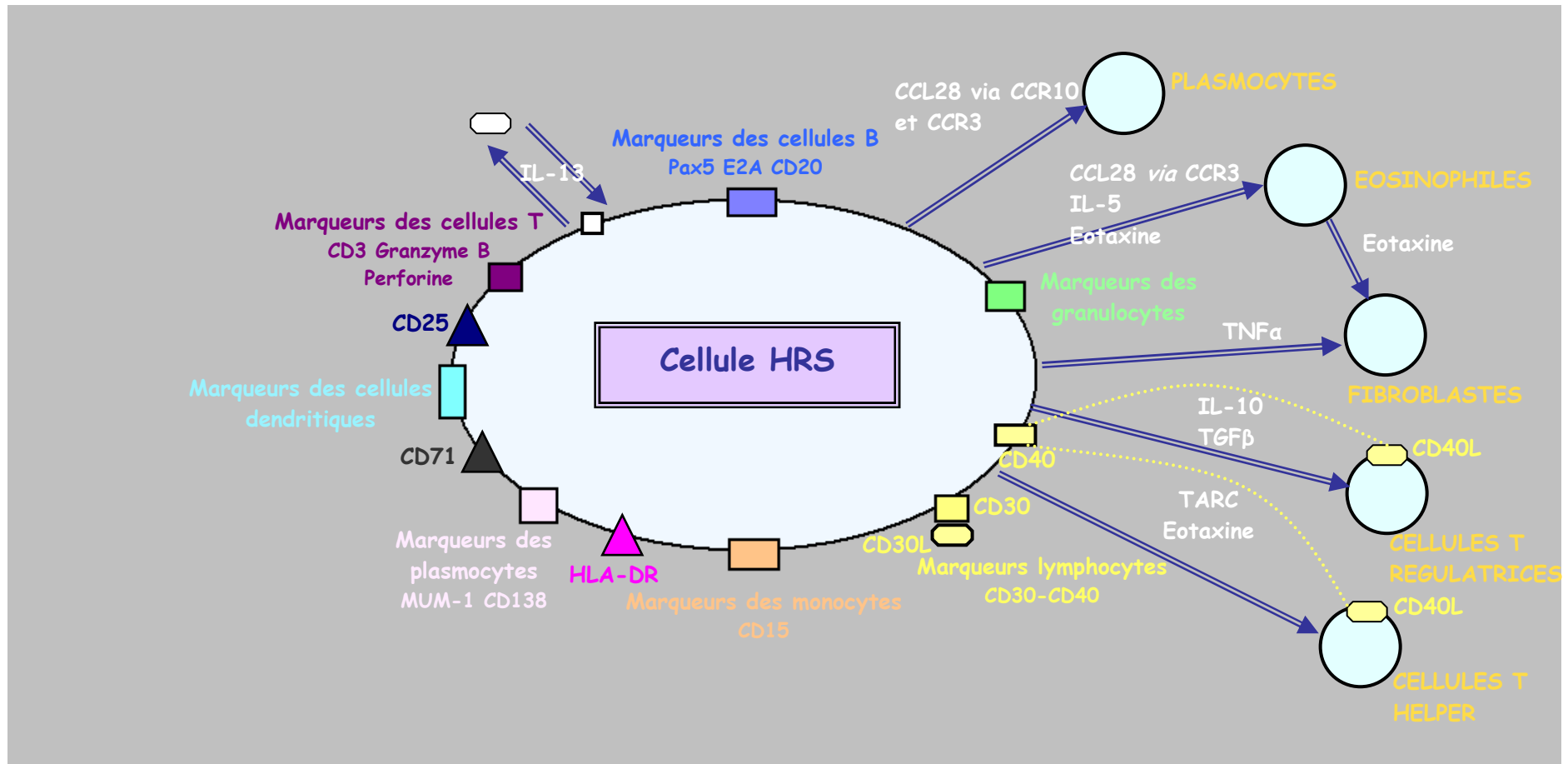


Figure 20 : Les caractéristiques de la cellule HRS et son environnement cellulaire

(D'après *Kuppers, 2002*)

VI. Implication virale

Le LH a souvent été relié à la présence d'un agent infectieux (Jarrett, 2002) avec, de façon prépondérante dans la littérature, l'association de cette pathologie au virus d'Epstein et Barr. La présence d'autres herpèsvirus, tels que l'herpèsvirus humain de type 6, est en règle générale plus controversée.

VI-1. Le virus d'Epstein et Barr

Le premier argument en faveur de l'implication du virus EBV dans le lymphome de Hodgkin a été la détection de forts taux d'anticorps dirigés contre des antigènes de ce virus chez des patients atteints de LH en comparaison avec des patients atteints d'autres lymphomes (Levine et al., 1971). De plus, la détection de ces taux précédait l'apparition de la maladie de plusieurs années (Mueller et al., 1989). Aujourd'hui, le virus d'Epstein et Barr est trouvé dans 40% à 50% des cas de lymphome de Hodgkin classique (Brousset et al., 1993). Il est préférentiellement associé à la forme à cellularité mixte du lymphome de Hodgkin classique (Rezk et Weiss, 2007) et est plus fréquent chez les hommes que chez les femmes. Il est surtout trouvé chez les patients âgés de plus de 55 ans et les enfants de moins de 10 ans (Armstrong et al., 1998). Les patients ayant eu une mononucléose infectieuse ont un risque accru de développer un lymphome de Hodgkin plus tard dans leur vie (Alexander et al., 2000; Hjalgrim et al., 2000; Munoz et al., 1978; Rosdahl et al., 1974). L'EBV est présent au niveau des cellules HRS (Jarrett et MacKenzie, 1999) mais n'est pas rencontré dans les cellules L et H du paragranelome nodulaire. La première démonstration de la présence d'ADN de l'EBV a été réalisée grâce à une sonde correspondant à un fragment d'EBV afin de réaliser une hybridation *in situ* (Weiss et al., 1991). Par la suite des sondes dirigées contre les nombreux

ARNs EBERs (EBV-encoded small RNA) ont été réalisées et sont toujours utilisées afin de détecter la présence de l'EBV (Wu et al., 1990). De nombreuses études ont par ailleurs montré la clonalité de l'EBV dans les tissus hodgkiniens (Anagnostopoulos et al., 1989; Weiss et al., 1989). Dans les cellules HRS, le virus est présent sous sa forme latente, et seulement trois des neuf gènes de latence sont exprimés. Il s'agit de EBNA1 (EBV nuclear antigen 1) et de LMP1 et LMP2a (latent membrane protein 1 et 2a) (Young et al., 2000). Des techniques d'immuno-histochimie et d'analyse transcriptionnelle sur des biopsies de patients ont démontré l'expression des protéines LMP1 et LMP2a à de forts taux en l'absence de leur régulateur *in vitro*, EBNA2 (Deacon et al., 1993; Murray et al., 1992; Pallesen et al., 1991). Par ailleurs, un promoteur alternatif de LMP1 a été identifié et sa transcription est activée par STAT3 (Chen et Greene, 2003). L'EBV utilise donc l'activité de STAT dans les cellules HRS pour l'expression de LMP1, ceci en l'absence de EBNA2.

L'implication prépondérante de LMP1 dans la pathologie hodgkinienne est la plus décrite et la mieux connue. Toutefois, LMP2a est également très importante puisqu'en sa présence les cellules HRS, bien que ne possédant pas d'immunoglobulines fonctionnelles, ne subissent pas le phénomène d'apoptose. En effet, LMP2a fournit un signal s'associant à l'expression des Ig et empêche l'apoptose des cellules ayant un défaut en Ig (Portis et al., 2003).

Les lymphomes de Hodgkin associés à l'EBV semblent à l'origine d'une survie plus longue chez les jeunes patients et d'une survie moins longue chez les patients plus âgés, que les lymphomes de Hodgkin non associés à l'EBV, notamment dans le groupe scléro-nodulaire, groupe le plus représenté du lymphome de Hodgkin classique (Keegan et al., 2005).

VI-2. L'herpèsvirus humain de type 6

Les premières études concernant la présence de l'HHV-6 dans le lymphome de Hodgkin consistaient en la recherche d'anticorps dans le sérum des patients grâce à la technique d'immunofluorescence. Une augmentation de la prévalence des IgG et une augmentation des titres d'anti-HHV-6 étaient observables chez les sujets atteints de LH par rapport aux témoins sains (Berrington de Gonzalez et al., 2006; Shanavas et al., 1992; Torelli et al., 1992). Une augmentation du taux d'anticorps sérique a même été observée pendant la rechute de certains patients atteints de LH alors que d'autres présentaient à la fois une rémission et une décroissance de leur taux d'anticorps dans le sérum (Levine et al., 1992). Pour ces auteurs, ceci suggère une valeur pronostique du taux d'anticorps sériques à HHV-6 dans le LH. La détection d'anticorps dirigés contre les protéines p38 et p41, dans le sérum des patients a pu être réalisée par technique ELISA (Iyengar et al., 1991). D'après les auteurs, cette approche a permis de dire que le virus se répliquait activement chez ces patients.

Les différentes techniques de biologie moléculaire employées par la suite ont été l'hybridation *in situ* ainsi que la PCR voire même la PCR quantitative (Secchiero et al., 1995) ou encore la PCR quantitative en temps réel (Collot et al., 2002). Celles-ci permettent la détection et/ou l'amplification de séquences virales au sein des tissus des patients atteints de lymphome de Hodgkin. Les PCR quantitatives comme leur nom l'indique permettent la quantification du nombre de copies du génome d'HHV-6. Un grand nombre d'études ont ainsi été effectuées et ont présenté des résultats variables et discordants. En effet, les résultats pouvaient aller de l'absence de détection d'HHV-6 (par PCR; Gledhill et al., 1991; Shiramizu et al., 2001) à plus de la moitié des patients atteints (Sumiyoshi et al., 1993) voire même jusqu'à plus de 80% de patients positifs (par hybridation *in situ* et PCR; Valente et al., 1996). Les variations dans les résultats obtenus peuvent être imputés à la variété des techniques utilisées et des populations

étudiées. Il existe certaines études présentant un faible nombre de patients positifs pour l'HHV-6 c'est-à-dire environ 10% (Schmidt et al., 2000; Torelli et al., 1991; Torelli et al., 1992). La moyenne de l'ensemble des études semble plutôt se situer vers 30% à 40% de patients positifs pour HHV-6 et présentant le lymphome de Hodgkin (Collot et al., 2002; Di Luca et al., 1994; Hernandez-Losa et al., 2005; Tailor et al., 2004). Au vu de la variabilité des différents résultats, des diverses techniques et du panel variable de patients étudiés, un tableau regroupant les principales études a été réalisé (Tableau IV). En outre, l'HHV-6 de type B est beaucoup plus souvent détecté dans ce type de pathologie (environ neuf fois sur dix) (Collot et al., 2002; Tailor et al., 2004; Valente et al., 1996). L'HHV-6 contrairement à l'EBV semble être présent chez les patients jeunes et de sous-type scléro-nodulaire (Torelli et al., 1992).

Il a également été trouvé de façon simultanée à l'EBV avec un rôle de celui-ci mis en exergue (Krueger et al., 2001; Schmidt et al., 2000; Torelli et al., 1992; Valente et al., 1996). Grâce à des techniques d'immuno-histochimie, l'HHV-6 a été trouvé dans l'infiltrat cellulaire entourant les cellules HRS et notamment au niveau des lymphocytes (Alexander et al., 1995; Krueger et al., 1994; Krueger et al., 2001; Rojo et al., 1994). L'HHV-6 a même été trouvé dans un type particulier de cellules HRS que sont les cellules momifiées qui présentent un phénomène apoptotique mais qui ne vont pas jusqu'au bout de celui-ci (Lorenzen et al., 1997). En effet, l'HHV-6 pourrait induire un mécanisme de rétention de la p53 dans le cytoplasme et ainsi protéger les cellules infectées de l'apoptose (Takemoto et al., 2004). Selon une étude, le fait que le virus HHV-6 n'ait jusqu'alors pas été trouvé dans les cellules RS, ou seulement dans des cas isolés semble avoir peu de poids auprès de la communauté scientifique. L'HHV-6 a seulement été trouvé dans les cellules momifiées ce qui semblerait vouloir dire qu'il n'est pas impliqué dans la lymphomagenèse du lymphome de Hodgkin (Luppi et al., 1998).

REFERENCES	TECHNIQUE UTILISÉE	NOMBRE DE PATIENTS POSITIFS/ NOMBRE TOTAL DE PATIENTS TESTES %
Valente et al., 1996	Hybridation <i>in situ</i>	47/52 82,4%
Torelli et al., 1991	Southern-Blot	3/25 12%
Gledhill et al., 1991	PCR	0/35 0%
Torelli et al., 1992	PCR	3/39 8%
Sumiyoshi et al., 1993	PCR	9/14 64%
Valente et al., 1996	PCR	38/52 73%
Shiramizu et al., 2001	PCR	0/47 0%
Taylor et al., 2004	PCR	15/39 39%
Di Luca et al., 1994	Nested-PCR	13/45 29%
Schmidt et al., 2000	Nested-PCR	11/88 13%
Collot et al., 2002	PCR quantitative	13/37 35,1%
Hernandez-Losa et al., 2005	PCR quantitative	8/20 40%

Tableau IV : Prévalence de l'HHV-6 par techniques de biologie moléculaire sur des adénopathies de patients atteints de lymphome de Hodgkin

(D'après *Ranger-Rogez et al., 2006*)

VI-3. Le VIH

Les patients positifs pour le VIH ont un risque accru de présenter un lymphome de Hodgkin, risque évalué entre 5 à 15 fois supérieur à la population saine. Dans ce contexte, les patients présentent le plus souvent des sous-types à cellularité mixte (54%). Le type scléro-nodulaire est plus faiblement représenté dans cette population (37%). De plus dans ce sous-type, les cellules HRS sont négatives pour l'EBV. Les stades avancés sont présents chez plus de 80% des patients. Le risque est maximal lorsque le patient HIV positif présente une immunosuppression modérée et diminue lorsque celle-ci est sévère. Ce fait est particulièrement vrai pour le sous-type scléro-nodulaire et aucun patient présentant ce sous-type n'est observé en cas d'immunosuppression sévère (Said, 2007).

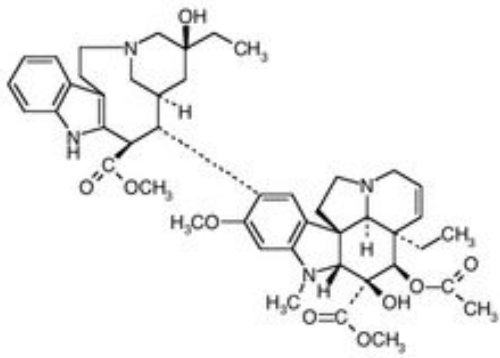
Le lymphome de Hodgkin atteint les nodules, la moelle osseuse et des sites extra-nodulaires chez les patients positifs pour le HIV (Connors, 2005).

VII. Traitements

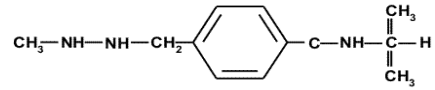
VII-1. Les traitements classiques (Figure 21)

Avant l'introduction de la radiothérapie et le développement d'associations de molécules dans des protocoles de chimiothérapie comme MOPP (chlorméthine, vincristine, procarbazine, prednisone) et ABVD (adriamycine, bléomycine, vinblastine, dacarbazine) dans les années 1970, le lymphome de Hodgkin était une pathologie souvent fatale. Puis la dernière génération de poly-chimiothérapies intensives a fait son apparition en 1990 pour traiter les stades avancés de lymphome de Hodgkin; les stades les moins avancés étant souvent uniquement traités avec de la radiothérapie. La plus courante de ces associations est

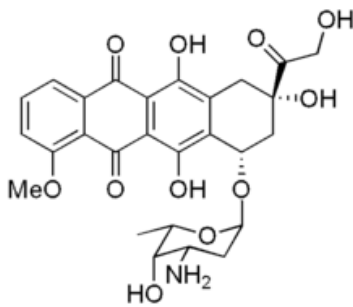
BEACOPP (Diehl et al., 2003) : bléomycine, étoposide, doxorubicine, cyclophosphamide, vincristine, procarbazine et prednisone. Cette association ainsi que de nombreuses autres ont démontré de très bons résultats dans la guérison des stades avancés de lymphome de Hodgkin. La rémission peut également être obtenue en utilisant une forte dose de chimiothérapie ainsi qu'une transplantation autologue de cellules souches hématopoïétiques (Schmitz et al., 2002). Le lymphome de Hodgkin est une des pathologies malignes avec le taux curatif le plus fort qui peut atteindre 90%. Toutefois, un risque subsiste : celui de la toxicité tardive des traitements utilisés. Cette toxicité augmente, bien entendu, avec le nombre de cures mais également avec l'âge. Apparemment après 20 ou 30 ans, le risque de décès lié à cette toxicité est bien plus élevé (Aleman et al., 2003). Les conséquences de cette toxicité peuvent être : une lymphopénie persistant plusieurs années après la radiothérapie, l'installation progressive d'une insuffisance thyroïdienne, des pathologies malignes secondaires comme une leucémie, un cancer du sein ou un cancer du poumon, ainsi que des maladies cardiovasculaires, des troubles de la croissance chez les sujets jeunes, la stérilité qui touche plus particulièrement le sujet masculin.



Vinblastine

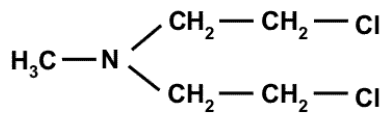


Procarbazine

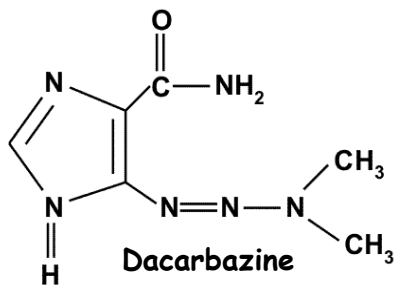
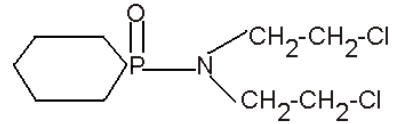


**Doxorubicine ou
Adriamycine**

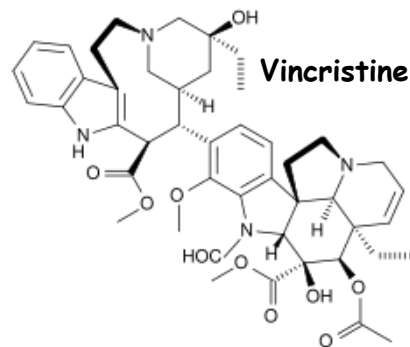
Chlorméthine



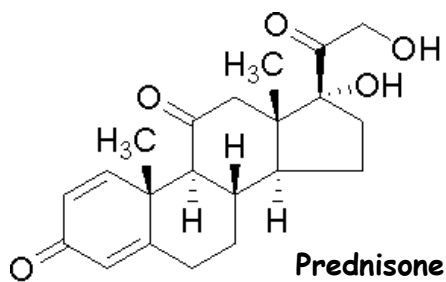
Cyclophosphamide



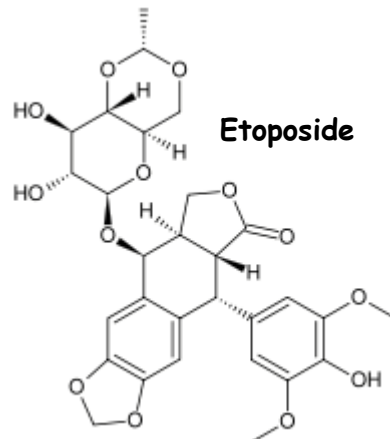
Dacarbazine



Vincristine



Prednisone



Etoposide

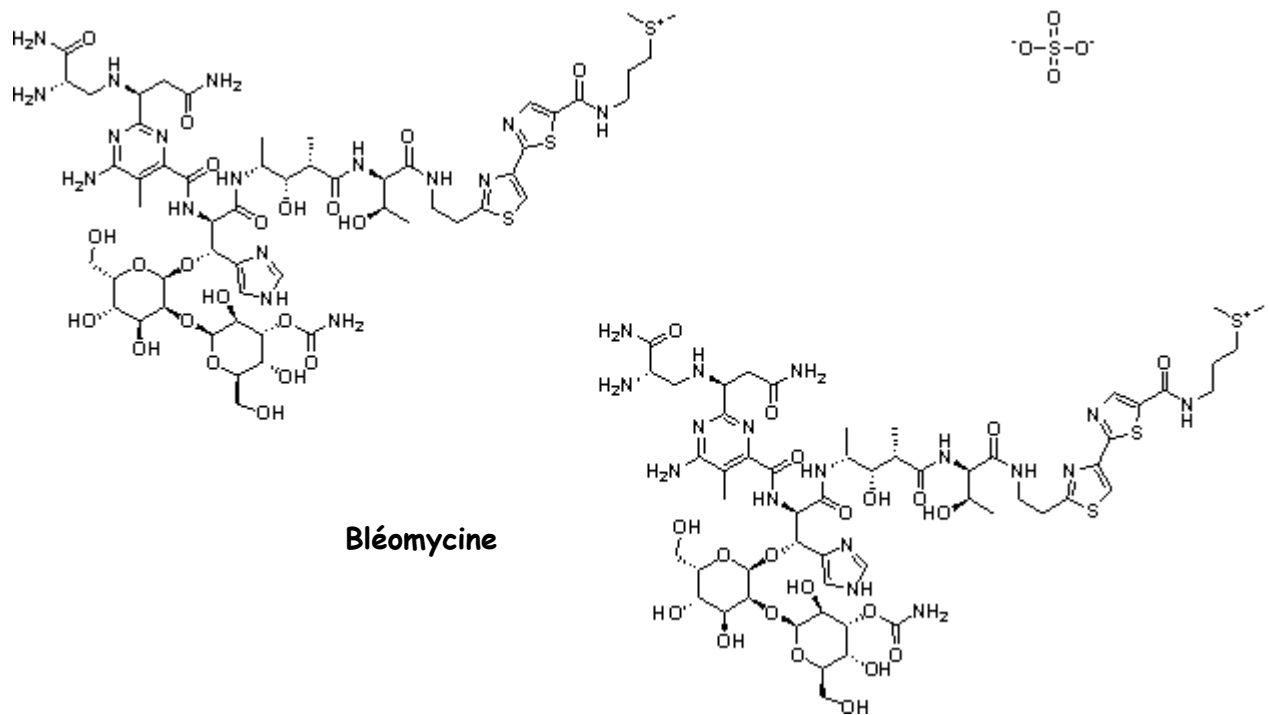


Figure 21 : Molécules chimiothérapeutiques utilisées dans le traitement du lymphome de Hodgkin

VII-2. Les traitements alternatifs et d'avenir

Deux types de cibles sont actuellement à l'étude : des cibles extracellulaires et intracellulaires (Re et al., 2005b). Les cibles extracellulaires peuvent être atteintes grâce à des anticorps dirigés contre des récepteurs présents à la surface des cellules. Au contraire, l'approche intracellulaire inclut l'administration de petites molécules qui modulent la fonction protéique des cibles par interaction directe. D'autres technologies peuvent être utilisées dans cette dernière approche comme l'utilisation d'ARNs interférence qui peuvent inhiber l'expression d'une protéine.

☞ Les cibles extracellulaires sont les récepteurs CD20, CD30, CD40. L'anticorps anti-CD30 en est encore à l'étape des essais cliniques ainsi que l'anticorps anti-CD40, seul l'anticorps anti-CD20 ou rituximab ou Mabthéra® (Roche) a donné des résultats très satisfaisants avec des taux de réponse au traitement allant de 86 à 100%. Il donne notamment satisfaction dans le traitement des paragranulomes nodulaires qui sont tous CD20 positifs et dans de rares cas de LH CD20 positifs. C'est ainsi que son utilisation dans les lymphomes non-hodgkiniens est prépondérante au vu du faible nombre de cas potentiellement traitables dans le LH.

☞ Les cibles intracellulaires sont très nombreuses. Il y a tout d'abord la cascade IKK-I κ B α -NF κ B et plus particulièrement les inhibiteurs de IKK (I κ B kinase) et les inhibiteurs directs de NF κ B. De façon alternative, les voies impliquant TRAF ou encore MEK/ERK ou PI3K/AKT (ou PKB protéine kinase B) sont étudiées. L'induction de l'apoptose des cellules HRS est également une cible d'étude avec des molécules STAT. La molécule anti-sens STAT3 est d'ailleurs une des plus prometteuse dans cette stratégie curative du lymphome de Hodgkin. Des molécules encore à l'étude ciblent également XIAP, cFLIP, les membres de la famille BCL-2 mais aussi TRAIL.

☞ Enfin, il existe une dernière approche dite immunologique due au potentiel transformant de l'EBV et à l'expression de EBNA1, LMP1 et LMP2 dans les cellules HRS dans environ 40% des cas. La production de molécules dirigées contre ces cibles est donc apparue comme importante. Malheureusement, cette technique a un grand défaut celui d'être seulement applicable aux patients EBV positifs atteints de lymphome de Hodgkin.

En dernier lieu, il serait envisageable de prévenir de l'infection par l'EBV par l'utilisation d'un vaccin, mais ceci n'est pas encore à l'ordre du jour.

TRAVAIL EXPERIMENTAL

Après avoir présenté l'environnement bibliographique relatif à notre sujet, nous allons dès lors développer le travail expérimental qui a été réalisé tout au long de cette thèse. Cette partie s'articulera autour des articles qui ont été écrits à partir des différentes expérimentations réalisées.

⊗ Le premier article s'intitule "HHV-6 and EBV DNA quantitation in lymph nodes of 86 patients with Hodgkin's lymphoma" et il est paru dans Journal of Medical Virology en Septembre 2007.

⊗ Le second article est intitulé "Detection of the DR7 oncoprotein from HHV-6 variant B in Reed-Sternberg cells in classical Hodgkin's lymphoma" et il est actuellement en "review" à Haematologica.

⊗ Le troisième article s'intitule "Colocalization of HHV-6B DR7 and LMP1 oncoproteins in nodular-sclerosis Hodgkin lymphoma" et est actuellement soumis à Blood.

⊗ Le quatrième article est intitulé "HHV-6B DR7 oncoprotein stimulates Id2 expression in BJAB cell line" et sera soumis à British Journal of Haematology également après acceptation du deuxième article et/ou du troisième article.

⊗ Une partie annexe clôt cette thèse et évoque le chapitre "HHV-6 and the Lympho-Hematopoietic System" du livre nommé "Human Herpesvirus-6", Second Edition, General Virology, Epidemiology and Clinical Pathology de Gerhard Krueger et Dharam Ablashi (Perspectives in Medical Virology, 12). Ce chapitre réalisé par nos soins (S. Ranger-Rogez et al., 2006; p185-200) regroupe nos travaux les plus récents et une revue complète de la littérature concernant les lymphoproliférations associées à HHV-6.

Cette thèse débute par une recherche clinico-biologique à partir d'un panel de 86 patients atteints de lymphome de Hodgkin en y mêlant un aspect fondamental. Ce travail fondamental devient ensuite prépondérant dans les derniers travaux de la thèse. La cinquième partie clôture l'ensemble de ce travail en alliant bibliographie et travaux expérimentaux et complète bien cette thèse.

ARTICLE 1

L'HHV-6 et l'EBV sont deux herpèsvirus humains qui, bien qu'appartenant à deux sous-familles différentes, β - et γ -herpesvirinae respectivement, partagent de nombreuses caractéristiques. En effet, ces deux virus ont notamment été trouvés dans les adénopathies de patients atteints de lymphome de Hodgkin. Toutefois, l'EBV a été abondamment décrit dans la littérature comme impliqué dans cette pathologie alors que le rôle de l'HHV-6, est beaucoup plus controversé, comme il a été mentionné dans l'environnement bibliographique. L'intérêt de détecter ces deux virus sur les mêmes biopsies d'un panel de patients hodgkiniens nous a semblé important afin d'observer la distribution des virus et les caractéristiques des patients infectés de par leurs dossiers médicaux.

L'objectif de notre travail était double lors de ce premier article. En premier lieu, il consistait à observer la présence ou l'absence de deux herpèsvirus l'HHV-6 et l'EBV dans les adénopathies provenant de patients atteints de lymphome de Hodgkin. Le deuxième objectif était en cas de présence de l'un et/ou l'autre des virus d'obtenir la valeur quantitative correspondante. Pour ce faire, afin de détecter et de quantifier indépendamment l'HHV-6 et l'EBV, deux PCR quantitatives en temps réel ont été réalisées. Pour l'EBV, la méthode quantitative ciblant le gène EBNA-1 a été complétée par une recherche en immunohistochimie de la protéine LMP1 technique classiquement utilisée au cours du diagnostic du lymphome de Hodgkin. Pour l'HHV-6, la méthode quantitative ciblant le gène U22 a été suivie d'un typage lors de sa positivité chez chacun des patients afin d'observer si l'un des deux variants prédomine dans ce type de pathologie. Les données cliniques de chacun des patients ont été confrontées aux résultats expérimentaux.

Les deux techniques de PCR quantitative en temps réel ont utilisé la chimie Taqman et chacune a été validée après observation des critères de spécificité, sensibilité et reproductibilité. La première, qui concerne l'EBV, amplifie un fragment de 68 pb du gène EBNA-1 (Figure 22) du virus d'Epstein et Barr. Etant donnée la petite taille de l'amplifiât, la particularité de ce système est l'utilisation d'une sonde marquée en 3' par la molécule MGB (Minor Groove Binding) qui permet un alourdissement de la structure. En 5', cette sonde est classiquement marquée par la molécule FAM (6-carboxyfluorescein). La sonde du système correspondant à l'amplification du gène U22 de l'HHV-6 (Figure 23) est, elle, classiquement marquée par les molécules FAM-TAMRA (6-carboxytetramethylrhodamine), respectivement en 5' et en 3'. Le produit obtenu grâce au système utilisé est de 99 pb. Chacun de ces deux gènes a été soigneusement choisi. Le gène U22 fait partie des gènes des régions uniques de l'HHV-6 et représente un gène de structure de ce virus, donc très conservé. De plus, U22, tout comme le gène EBNA1, sont spécifiques de chacun des herpèsvirus dont ils sont issus et n'ont pas d'homologues chez les autres herpèsvirus. La technique de PCR quantitative ciblant le gène EBNA1 a été effectuée parallèlement à la technique immuno-histochimique mettant en évidence la protéine LMP1 de l'EBV. Cette technique classique a été réalisée sur des coupes paraffinées issues des mêmes adénopathies que celles testées en PCR quantitative en temps réel. Bien que ce soit une approche totalement différente, cette technique utilisée classiquement en diagnostic, a servi de point de comparaison avec la technique de PCR quantitative en temps réel. Le typage de l'HHV-6 ainsi que les données cliniques recueillies pour chacun des patients ont permis de compléter cette étude conduite sur 86 patients atteints de lymphome de Hodgkin. Les résultats les plus éloquents ont été confirmés à l'aide de tests statistiques et sont présentés ci-dessous.

Ce travail fait office de précurseur en la matière puisqu'aucun des deux virus n'a été détecté et quantifié à la fois sur le même panel de patients atteints de lymphome de Hodgkin.

En premier lieu, les patients ont été testés pour leur positivité dans leurs adénopathies pour chacun des deux virus étudiés. Les patients présentant le virus EBV constituaient 61,6% de la population alors que ceux présentant le virus HHV-6 constituaient une part encore plus importante s'élevant à 79,1% de cette même population. Chacune de ces deux prévalences est corroborée par la littérature qui lui correspond. En effet, la prévalence du virus EBV dans le LH dans les pays industrialisés est de 40 à 60% (Jarrett, 2002; Joske et al., 1992) et de 70 à 90% dans les pays développés (Chang et al., 2005; Hemsrichart et Pintong, 2005). Les chiffres obtenus pour l'HHV-6 sont très discordants dans la littérature. Toutefois, des prévalences similaires ont été obtenues par d'autres auteurs (Krueger et al., 1994; Sumiyoshi et al., 1993; Valente et al., 1996).

Les deux groupes ainsi déterminés sont à opposer quant à la présentation histologique du LH. En effet, dans cette étude, les patients positifs pour l'EBV présentent majoritairement (80%) un sous-type à cellularité mixte alors que ceux positifs pour l'HHV-6 présentent essentiellement un sous-type scléro-nodulaire (83,6%). L'association EBV et sous-type à cellularité mixte a été démontrée dans la littérature à de nombreuses reprises (Claviez et al., 2005; Khan et al., 1993). Notre étude confirme ce qui a été trouvé par d'autres à savoir son association probable avec le sous-type scléro-nodulaire. En outre, le fait que le variant B (92,6%) de l'HHV-6 soit fréquemment détecté dans le lymphome de Hodgkin est encore une fois démontré dans cette étude.

Les résultats présentés ci-dessus ont par la suite été croisés, ce qui nous a conduit à observer que la majorité de la population (47,7%) est simultanément positive pour les deux herpèsvirus. Ceci peut suggérer une stimulation réciproque de la réplication de chacun des virus, corroborée par le fait que chez ces patients le nombre moyen de copies de chacun des virus est beaucoup plus élevé que dans le reste de la population.

Une partie non négligeable de la population étudiée (31,3%) était seulement positive pour le virus HHV-6. Dans la littérature, il a de tout temps été admis que le lymphome de Hodgkin présentait une association avec un virus et l'implication de l'EBV est reconnue. Cependant, comme nous l'avons mentionné, l'EBV est trouvé essentiellement associé aux LH de sous-type à cellularité mixte et chez les enfants ou dans des tranches d'âge plus élevées (> 50 ans). Pour l'instant, aucune étiologie n'est associée aux cas négatifs pour l'EBV. En effet, même si certains auteurs ont pu trouver la présence de l'HHV-6, son implication dans le lymphome de Hodgkin reste à prouver. Dans cette étude, la grande part de patients hodgkiniens présentant l'HHV-6 laisse penser qu'il pourrait être impliqué dans cette pathologie, et tout particulièrement dans le sous-type scléro-nodulaire.

En outre, cette population seulement positive pour l'HHV-6 est très jeune ceci en comparaison de celle uniquement positive pour le virus EBV (32,1 ans *versus* 46,9 ans), ce point statistiquement significatif sépare encore un peu plus les populations associées à chacun des deux virus.

Enfin, cette étude montre que la présence de l'HHV-6 semble être un marqueur de succès au traitement contrairement à l'EBV. En effet, l'EBV est souvent associé à un pronostic défavorable (Jarrett et al., 2005; Keegan et al., 2005).

Les populations qui présentent chacun des deux virus sont très différentes et engagent très certainement des mécanismes physiopathologiques différents. Cette conclusion est toutefois à prendre avec précaution dans le sens où les effectifs étudiés ne sont pas très élevés.

POINTS IMPORTANTS

Présence et quantification de l'EBV mais aussi de l'HHV-6 chez les patients hodgkiniens

Population hodgkinienne infectée par l'EBV : cellularité mixte et âgée

Opposée à

Population hodgkinienne infectée par l'HHV-6 : scléro-nodulaire et jeune

**HHV-6 présent de façon concomitante à l'EBV dans le LH : probable stimulation de la réplication des deux virus corroborée par une forte quantification
Etude à poursuivre**

**HHV-6 présent seul dans le LH : fait nouveau pour une aussi grande population
(auparavant cas isolés)
Etude à poursuivre**

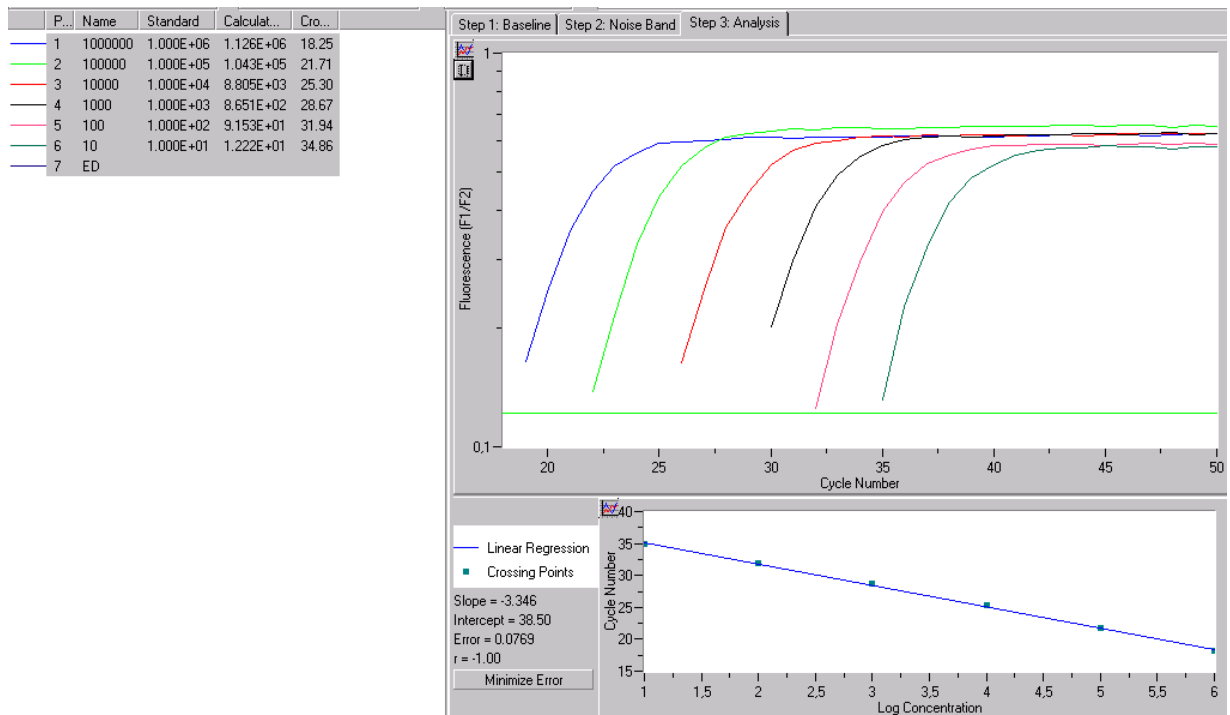


Figure 22 : Gamme étalon pour l'amplification du gène EBNA-1 de l'EBV

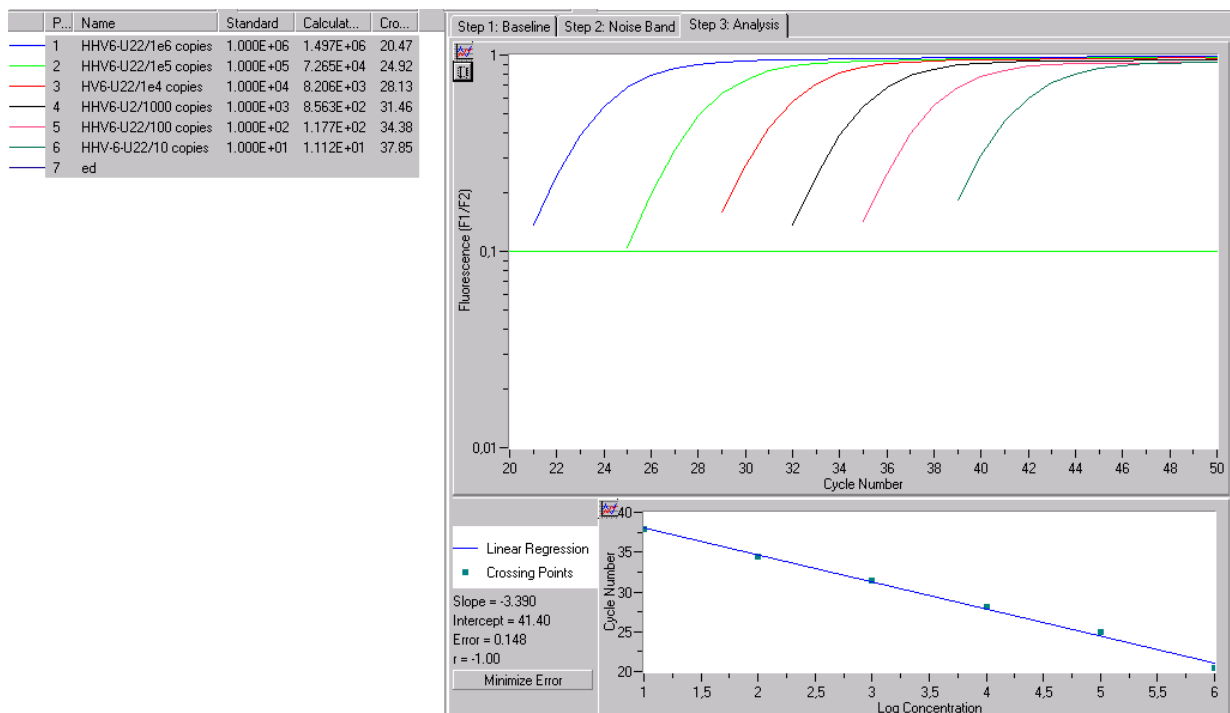


Figure 23 : Gamme étalon pour l'amplification du gène U22 de l'HHV-6

ARTICLES 2 et 3

Les articles 2 et 3 ont été regroupés sous un même chapitre au vu de leurs nombreuses caractéristiques communes. En effet, ils étudient deux herpèsvirus HHV-6 et EBV *via* la présence ou l'absence de deux oncoprotéines LMP1 pour l'EBV et DR7B pour l'HHV-6 en utilisant des sous-populations issues du panel de 86 patients présenté précédemment. La première population hodgkienne ciblée est positive pour le virus HHV-6 et négative pour le virus EBV, alors que la seconde sous-population est à la fois positive pour l'HHV-6 mais également pour l'EBV. En outre, la méthode utilisée afin de diagnostiquer la présence du virus recherchée est similaire. Elle consiste en une technique immunohistochimique sur coupes paraffinées.

ARTICLE 2

Afin d'affiner l'étude présentée lors du premier article, et étant donné qu'un grand nombre de patients atteints de lymphome de Hodgkin présentaient une positivité pour le virus HHV-6, nous nous sommes non plus intéressés à la présence de ce virus mais à sa localisation. Pour ce faire, nous avons utilisé un anticorps commercial. Le deuxième objectif était d'observer si l'oncoprotéine DR7B de l'HHV-6 était exprimée ou non au sein des adénopathies de patients atteints de LH et de savoir, en cas de détection, si sa présence était localisée dans les cellules de Reed-Sternberg caractéristiques du lymphome de Hodgkin. Nous avons décidé d'utiliser les capacités du virus de la forêt Semliki afin de produire cette protéine, et d'obtenir à terme des anticorps dirigés contre celle-ci.

Le Semliki Forest Virus ou SFV, neuropathogène chez les rongeurs et occasionnellement pathogène chez l'homme, a été primitivement isolé à partir de moustiques en Ouganda en 1944. Il fait partie du genre Alphavirus et de la famille des *Togaviridae* tout comme le virus Sindbis et plusieurs autres virus pathogènes pour l'homme et entraînant des encéphalites chez l'homme (Ross River Virus) (Wahlfors et Morgan, 2003). Ce petit virus enveloppé de 70 nm de diamètre possède un génome composé d'un ARN simple brin de polarité positive de 11,7 kb fonctionnant directement comme un ARNm dans les cellules infectées. La molécule d'ARN génomique code sa propre ARN polymérase conduisant à une haute efficacité de la réplication et de la transcription d'ARN viral (Olkkonen et al., 1994). Ce génome (Figure 24) est pourvu d'une coiffe à l'extrémité 5', est polyadénylé à l'extrémité 3' et code seulement 9 protéines fonctionnelles. Les 4 protéines non structurales (protéines nsP1, nsP2, nsP3 et nsP4) sont impliquées dans la synthèse d'ARN viral tandis que les protéines structurales forment la capsid (protéine C) et l'enveloppe (protéines E1, E2 et E3, l'association des deux dernières formant la protéine p62). Par ailleurs, il existe une petite protéine de 6 kDa codée par la région structurale du génome qui n'est pas requise pour l'assemblage des particules virales

(Atkins et al., 1999) mais qui a une influence sur le nombre de virions ou encore sur la perméabilité de la membrane.

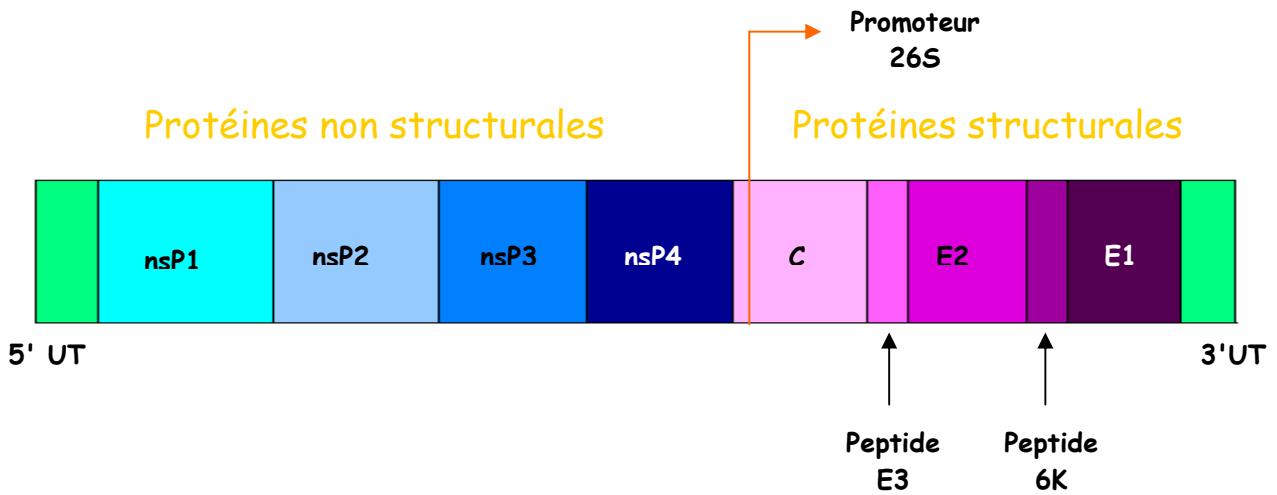


Figure 24 : Structure génomique du Semliki Forest Virus

La construction des premiers plasmides dérivés du réplicon SFV et constituant les éléments de base de ce système d'expression sont dus à Peter Liljestrom en 1991 (Liljestrom et Garoff, 1991). Comme structure de base à la construction des vecteurs d'expression SFV, un clone d'ADNc contenant le génome complet du SFV a été utilisé. Pour permettre l'insertion de gènes, la région sub-génomique 26S codant les protéines de structure du virus a été déléetée (Lundstrom, 2003a et b) et un site multiple de clonage BamHI-XmaI-SmaI suivi par une cassette de codons stop dans les trois cadres de lecture a été inséré en aval du site promoteur pour créer les vecteurs finaux pSFV. Pour conserver leur capacité d'auto-réplication, les vecteurs possèdent la région non structurale complète du génome SFV codant pour le complexe réplicase virale nsP1-nsP4, et les courtes régions 5' et 3' requises en *cis* pour la réplication de l'ARN. Le gène étranger est cloné dans le vecteur d'expression et les plasmides obtenus peuvent être utilisés pour la production *in vitro* de transcrits SFV qui initieront la réplication lors de leur introduction dans des cellules animales. Le cœur du système

d'expression est constitué par le vecteur pSFV1 (Figure 25) qui contient le gène de la réplicase du SFV cloné en aval du puissant promoteur de l'ARN polymérase SP6.

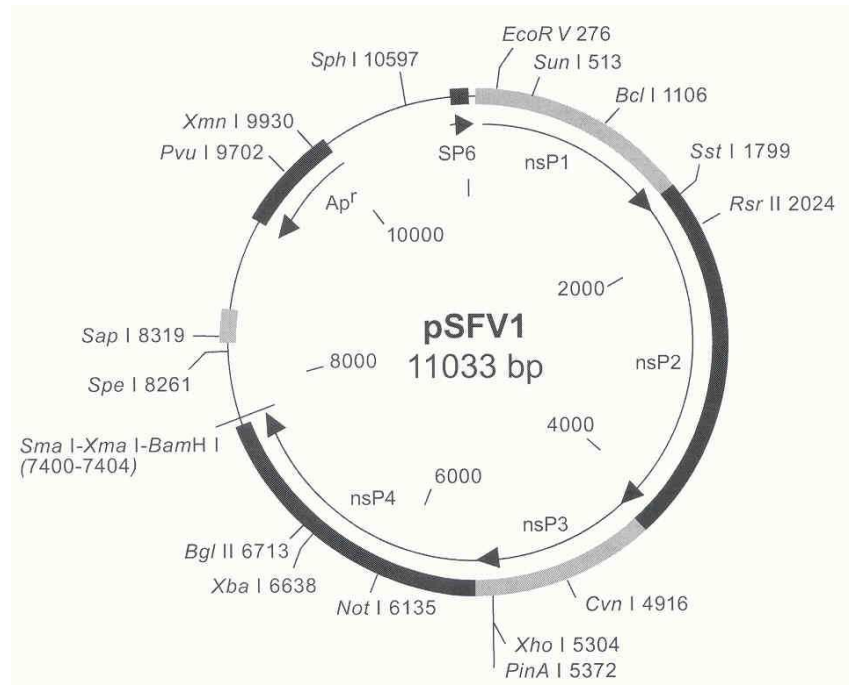


Figure 25 : Schéma du pSFV1

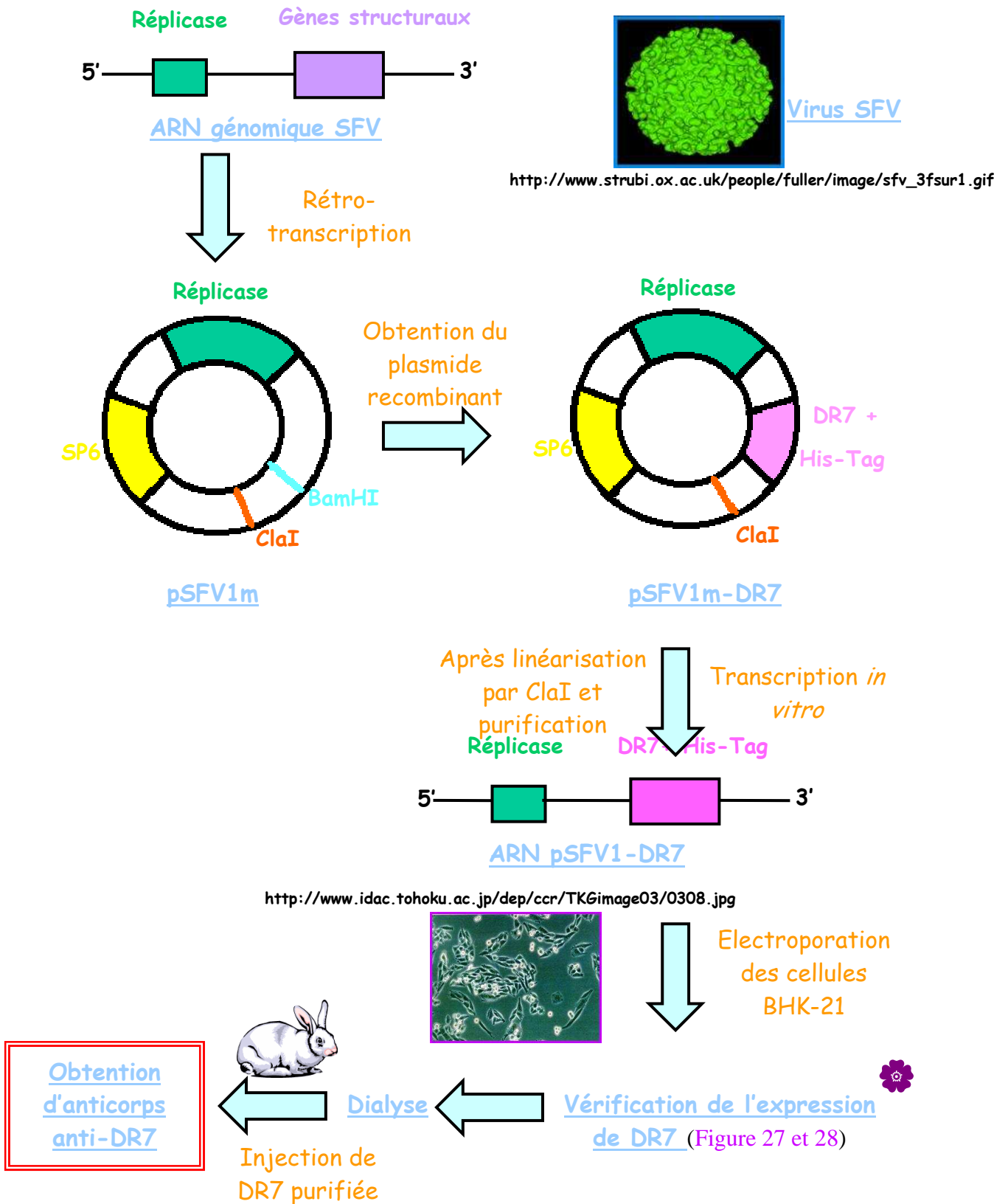
L'ADN correspondant au gène DR7 cloné au niveau du site BamHI du plasmide pSFV1 est issu d'un patient atteint de lymphome de Hodgkin. Ce patient a été soigneusement choisi après séquençage de la région ORF-1 chez de nombreux patients hodgkiniens. En effet, ce patient était le plus représentatif de la série observée. Le gène DR7 a été au préalable amplifié à partir des amorces DR7-BamF (5'-ACT TTA AGA GGA TCC CGC CAC CAT GAG GGC G-3') et DR7-BamR (5'-GCA GCC GGA TCC ACT AGT AAC GGC CG-3'). Chacune des amorces possède le site BamHI permettant son insertion dans le plasmide pSFV1. En outre, l'amorce sens possède en son sein une séquence Kozak (CGC CAC CAT G) permettant de faciliter la fixation du ribosome pour la future traduction après transcription *in vitro* de notre gène d'intérêt. Le plasmide recombinant obtenu a été séquençé grâce aux amorces DR7B-

BamF, DR7-BamR ayant servi au clonage de DR7 et 6B5 (5'-GTG AAT TAC TAG AGA CCG TGC G-3') entièrement homologue au gène d'intérêt. Après vérification de l'intégrité de notre séquence ainsi que sa bonne orientation, la structure a été purifiée et obtenue en grande quantité.

Il est à noter qu'après insertion du gène d'intérêt dans pSFV1 et transcription *in vitro*, deux voies d'expression sont utilisables *in vitro* et *in vivo* : soit l'injection directe de l'ARN recombinant, soit la production de particules SFV recombinantes suicides. La première méthode a été utilisée dans cette étude et s'exécute de la manière suivante. Le vecteur d'expression est linéarisé par une endonucléase de restriction, ici ClaI, ce qui permet d'effectuer la transcription *in vitro*. A partir de l'ADN linéaire purifié, la transcription s'effectue sous l'action de l'ARN polymérase SP6. Cette étape assure la production d'ARN recombinants qui peuvent être utilisés pour la transfection par électroporation des cellules BHK-21 (Baby Hamster Kidney). Celle-ci a été effectuée à 350V et 750µF ce qui est classiquement utilisé pour des cellules de mammifères. A l'intérieur des cellules en culture, l'ARN recombinant dirige sa propre réplication, ce qui aboutit à la production de grandes quantités de la protéine d'intérêt et à l'inhibition de la synthèse protéique de la cellule-hôte. Le système sus-décrit a été employé à de nombreuses reprises avec succès pour produire des variétés de protéines de différentes natures ([Karlsson et Liljestrom, 2004](#)).

Le but ultime de ce système d'expression dérivé du virus de la forêt Semliki appliqué à la protéine DR7 était de produire, à terme, des anticorps dirigés contre cette dernière. Cet objectif est passé au préalable par l'obtention de notre gène d'intérêt cloné au sein du vecteur d'expression pSFV1, puis par l'obtention de la protéine correspondante et enfin par la future injection de cette dernière, après dialyse, à un lapin pour obtenir les anticorps recherchés ([Figure 26](#)). Il est à noter que l'étape de détection n'aurait pu être possible sans la présence d'un tag poly-Histidine situé en C-terminal de DR7.

Figure 26 : Schéma récapitulatif de l'utilisation du Semliki Forest Virus afin de produire la protéine DR7B, puis de l'obtention finale de l'anticorps anti-DR7





Vérification de l'expression de DR7

- Par Immunofluorescence :

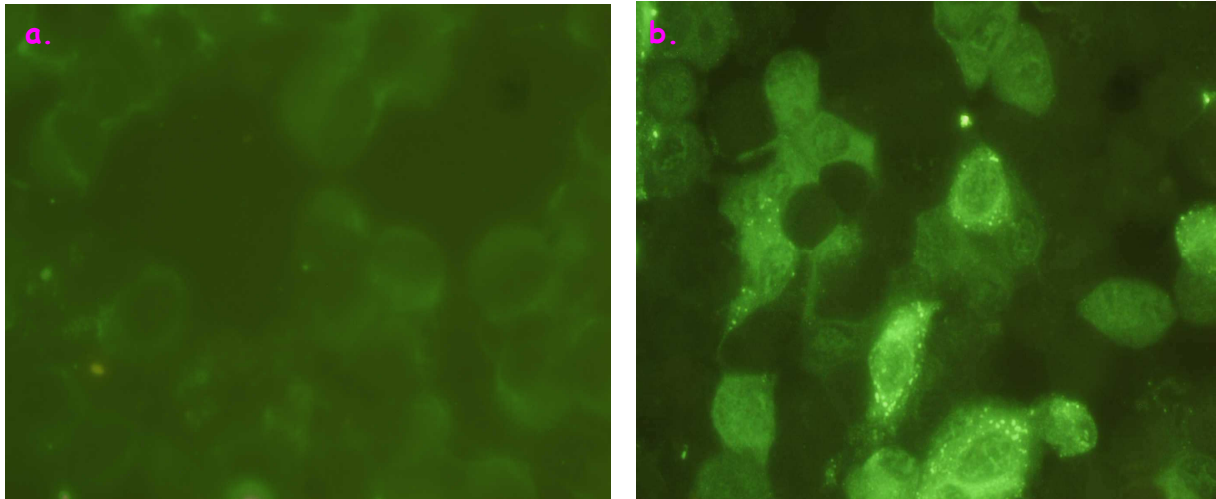


Figure 27 : Immunofluorescence indirecte (IFI) en présence d'anticorps primaire anti-His₆ puis d'anticorps anti-souris couplé au FITC révélant la présence de DR7

Fig. 27a. Suspension cellulaire testée par IFI après injection d'ARN correspondant au plasmide contrôle pSFV1m puis incubation

Fig. 27b. Suspension cellulaire testée par IFI après injection d'ARN correspondant au plasmide pSFV1m-DR7 puis incubation

- Par Western Blot :

Puits 1 : Marqueur biotinylé
Puits 2 : Lysat protéique
(anticorps primaire et secondaire)
Puits 3 : Lysat protéique
(anticorps secondaire seul)
Puits 4 : Marqueur coloré

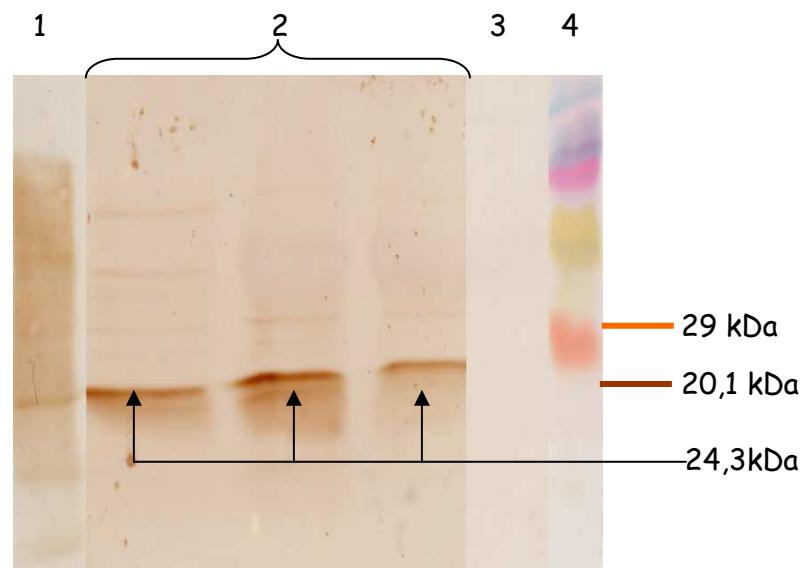


Figure 28 : Western-blot en présence d'anticorps primaire anti-His₄ puis d'anticorps secondaire anti-souris HRP révélant la présence de DR7

Il nous a semblé important d'apporter quelques précisions par rapport au déroulement de la manipulation en elle-même et des nombreux contrôles qu'elle a nécessité. En effet, cet aspect n'est pas souligné dans la publication dont ce travail a fait l'objet mais nous semble tout à fait essentiel pour sa compréhension. Après la production protéique, le lapin a été immunisé à l'aide de la fraction dialysée contre du NaCl 0,15M de la protéine DR7B ceci *via* 10 injections sous-cutanées au niveau dorsal. La protéine a été diluée de moitié dans de l'adjuvant complet de Freund avant injection puis lors du rappel 21 jours plus tard la même quantité protéique a été injectée mais diluée dans de l'adjuvant incomplet de Freund. L'adjuvant incomplet de Freund est une solution aqueuse en émulsion dans l'huile de paraffine qui produit une libération retardée de l'antigène, une capture facilitée par les macrophages alors que l'adjuvant complet correspond à la même préparation contenant en outre des mycobactéries (*Mycobacterium tuberculosis*) tuées permettant une meilleure stimulation de l'immunité. Avant la première injection, l'animal a été prélevé au niveau d'une veine de l'oreille et son sérum a été testé pour observer sa négativité pour le virus HHV-6. L'animal a ensuite été prélevé à intervalles réguliers de 10 jours afin d'observer si le taux des anticorps anti-DR7B était en augmentation. La plus forte réaction a été visible deux mois après la première injection à la fois sur des souches A (GS) et B (HST) de l'HHV-6 par immunofluorescence. La présence des anticorps dirigés contre la protéine DR7B a de plus été observée par western-blot. Des témoins cellulaires (HSB2 et MT4) dépourvus de virus ont été réalisés afin de vérifier que l'anticorps ne se fixait pas à des composants cellulaires et ne donnait pas de réaction faussement positive. Une fois ceci validé il était possible de passer à l'étude immuno-histochimique des patients atteints de lymphome de Hodgkin.

Le but de ce deuxième article était donc d'observer la localisation de l'HHV-6 dans les adénopathies de patients atteints de lymphome de Hodgkin ainsi que l'éventuelle expression et la localisation de la protéine DR7B. Les anticorps utilisés étaient un anticorps commercial, l'anticorps anti-gp116/64/54 et l'anticorps anti-DR7B que nous avons produit. L'étude a été réalisée sur 38 patients atteints de lymphome de Hodgkin positifs pour le virus HHV-6 et négatifs pour l'EBV (absence de détection de LMP1). Ce panel de patients était issu des 86 patients décrits lors de la première publication.

Detection of the DR7 oncoprotein from HHV-6 variant B in Reed-Sternberg cells in classical Hodgkin's lymphoma

Short title: HHV-6B in RS cells in Hodgkin's lymphoma

Aurélie Lacroix, Arnaud Jaccard, Barbara Petit, Laurent Mardivirin, Christophe Piguet, Pierre-Marie Preux, Franck Sturtz, François Labrousse, Dominique Bordessoule, Sylvie Ranger-Rogez

From the Faculty of Pharmacy, Laboratory of Microbiology, EA 4021, IFR 145 GEIST (AL, LM, SR-R), from the Teaching Hospital Dupuytren, Department of Clinical Haematology, (AJ, DB), Department of Pathological Anatomy (BP, FL), Department of Virology (SR-R), from the Faculty of Medicine, Laboratory of Biochemistry (FS), from the Mother-Children Hospital, Department of Pediatrics (CP), from the Institute of Neurological Epidemiology and Tropical Neurology, UFR Biostatistics (P-MP), Limoges, France

Acknowledgments: we thank Prof Denys Brand (INSERM ESPRI 3856, IFR 136, Tours, France) for providing us with the pSFV1 vector, Prof Denys Brand and Delphine Fouquet (IFR 136) for technical assistance for protein production, Dr Anne Dosogne for help with antibody production, the *Tumothèque du Limousin* for allowing us to test stored frozen tissues, the *Structure régionale de référence du Limousin* for providing clinical details, the INSERM Herpes Virus and Cancer Network, Paris, and the HHV-6 foundation for their support.

Funding: this work was supported by grants from the *Ligue contre le Cancer (Comité Haute-Vienne)* and the French National Health Service (*Direction générale de la Santé, Paris*) and was promoted by Limoges University Hospital, France.

Correspondence :

Sylvie Ranger-Rogez, PD, PhD, Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, 2 rue du Dr Marcland, 87025 Limoges Cédex, France

E-mail: sylvie.rogez@unilim.fr

ABSTRACT

Background and Objectives

Classical Hodgkin's lymphoma (cHL) is associated with the presence of Epstein-Barr virus (EBV) in pathognomonic Reed-Sternberg cells (RS) in 40 to 50% cases. Most of the remaining cases of cHL are of the nodular sclerosis subtype and have not previously been associated with any particular virus. The aim of our study was to look for the presence of human herpes virus type 6 (HHV-6) variant B in RS cells of lymph nodes negative for EBV.

Design and Methods

We examined lymph nodes from 38 EBV-negative cHL patients by immunohistochemical methods to detect the presence of HHV-6B in RS cells. A commercial antibody directed against a complex of envelope glycoproteins and an anti-DR7 oncoprotein polyclonal antibody, produced for this study, were employed.

Results

RS cells from 15 of the 38 patients (39.5%) tested positive for HHV-6 envelope glycoproteins and those from 28 patients (73.7%) tested positive for the DR7B oncoprotein. The patients testing positive for DR7B in RS cells had a higher mean age, stage at diagnosis and percentage remission than patients testing negative for this protein.

Interpretation and Conclusions

This study provides strong evidence that HHV-6 is present in the RS cells of young adult patients with EBV-negative cHL of the nodular sclerosis subtype. The DR7B oncoprotein seems to accumulate in these cells and may be involved in cell proliferation.

Keywords: classical Hodgkin's lymphoma, Reed-Sternberg cell, human herpesvirus-6, DR7, immunohistochemistry.

Ce travail a subi de longs déroulements et de nombreux rebondissements avant d'obtenir les résultats concluants relatés ci-dessous. En effet, la production de la protéine DR7B, candidate prépondérante, au vu de ses propriétés oncogènes, quant à son intervention dans le lymphome de Hodgkin a été très délicate. De nombreux systèmes ont été utilisés sans succès. Tout d'abord, le système RTS (rapid translation system) commercialisé par Roche dans lequel cette protéine n'a pu être produite. Puis le système de production en baculovirus qui n'a pu être mené à son terme du fait de difficultés de culture des cellules d'insecte Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) mais aussi du fait d'une production protéique finale insuffisante pour l'inoculation à visée d'immunisation d'un lapin. La production avec succès de notre protéine d'intérêt s'est finalement faite *via* le virus de la forêt Semliki comme il a été décrit dans le schéma présenté ci-dessus et la production massive de celle-ci a permis l'obtention des anticorps anti-DR7B.

L'étude des patients atteints de lymphome de Hodgkin testés lors de notre premier travail et sélectionnés pour leur positivité à l'HHV-6 et leur négativité concomitante à l'EBV a pu avoir lieu. En effet, afin de pouvoir observer la seule intervention de l'HHV-6, les patients ont été choisis comme étant négatifs pour la protéine LMP1 de l'EBV. Cette technique d'immunohistochimie est utilisée dans le diagnostic classique afin de montrer la présence ou l'absence de l'EBV. Cette étude a donc été réalisée sur 38 patients atteints de lymphome de Hodgkin dit classique. Deux marquages immuno-histochimiques à l'aide d'anticorps très différents ont été réalisés : l'un visant des glycoprotéines d'enveloppe (gp116/64/54) et permettant d'observer la présence du virus et certainement sa répllication complète au sein de cellules infectées, et l'autre visant une protéine exprimée dans un stade précoce du cycle réplificatif (DR7B).

En premier lieu, quel que soit le marquage observé, il a été démontré la présence du virus HHV-6 dans la cellule de Reed-Sternberg, cellule cancéreuse caractéristique du lymphome de Hodgkin. Ce fait est novateur car la présence du virus HHV-6 n'avait jamais été montrée

auparavant dans la cellule de Reed-Sternberg sauf dans des cas isolés (Krueger et al., 1994; Luppi et al., 1998; Rojo et al., 1994). Ce fait est probablement lié aux caractéristiques de la population étudiée qui est essentiellement composée d'adultes jeunes de sous-type scléro-nodulaire mais implique potentiellement l'HHV-6 dans le lymphome de Hodgkin ce qui n'était pas le cas jusqu'à lors. Il reste toutefois à confirmer nos dires par des techniques de biologie moléculaire telles que l'hybridation *in situ* en ciblant la cellule RS.

En outre, la protéine DR7B de l'HHV-6 est exprimée dans la cellule de Reed-Sternberg chez un très grand nombre de patients (73,7%). La certitude qu'il s'agit bien de la cellule de Reed-Sternberg dans laquelle la protéine a été détectée est corroborée par le fait que cette cellule a été caractérisée lors de cette étude par son phénotype CD30 positif. L'expression de la protéine DR7B dans la majorité de la population au sein de la cellule de Reed-Sternberg tend à confirmer son caractère oncogène.

La protéine DR7B, bien que présente dans les cellules infiltrantes de la tumeur, n'y est exprimée que dans une bien moindre mesure comparativement à son expression dans la cellule de Reed-Sternberg (44,7% *versus* 73,7%). Ceci est à opposer au marquage par l'anticorps visant les protéines d'enveloppe pour lequel l'ensemble des patients testés se révèle positif dans les cellules infiltrantes à la tumeur. Cette expression des glycoprotéines d'enveloppe n'est observée que dans 39,5% des cas au sein de la cellule de Reed-Sternberg. En outre, en comparant les marquages obtenus par ces deux anticorps, il semble que la protéine DR7B s'accumule dans la cellule de Reed-Sternberg. Ceci semble d'autant plus important que les patients montrant une positivité pour DR7B dans leurs cellules de Reed-Sternberg présentaient au moment du diagnostic un stade plus avancé de la maladie (III-IV) et leur LH était plus chimiosensible que les autres patients. Ceci argumente un peu plus en faveur du caractère oncogène de DR7B dans le lymphome de Hodgkin. Cette protéine présente au niveau structural une identité non négligeable (42,2%) (Isegawa et al., 1999) avec

la protéine DR7 de l'HHV-6 de type A pour laquelle des caractères transformants, transactivants et oncogènes ont été décrits (Kashanchi et al., 1997). Le gène DR7 du variant A est plus long (363 aa) que celui présent chez le variant B (Figure 7). Il peut donc en être déduit de façon hypothétique que l'activité de DR7B pourrait se situer dans cette partie homologue au DR7A mais la question reste entière quant à la partie non homologue entre les deux protéines. Il pourrait être envisageable que cette partie modère les effets de cette protéine conduisant au fait que le variant B est trouvé de façon prépondérante au sein des lymphomes et notamment du lymphome de Hodgkin. En outre, cette différence entre DR7A et B dans les lymphomes pourrait seulement être due à un tropisme cellulaire différent.

Toujours en ce qui concerne l'oncogénicité de la protéine DR7 de type B (comme ce qu'il a été d'ailleurs observé pour DR7A), des études préalables, présentées dans la thèse de Sophie Collot-Teixeira, ont démontré la liaison de la protéine DR7B avec la protéine cellulaire p53. Cette protéine p53, suppresseur de tumeur, joue un rôle central dans la régulation de la croissance mais également de la mort cellulaire. Elle s'accumule sous sa forme active dans le noyau et agit comme un facteur de transcription. La localisation de p53 ainsi que cette liaison p53/DR7B ont conduit lors de notre étude à l'observation de la localisation de la protéine DR7B par microscopie confocale au sein de cellules infectées par la souche HHV-6B HST (Figure 29), car une étude structurale de la protéine DR7A avait démontré (Doniger et al., 1999) des profils d'hydrophaties similaires à ce qui a pu être observé pour la protéine DR7B (Figure 6), signifiant une probable liaison à la membrane.

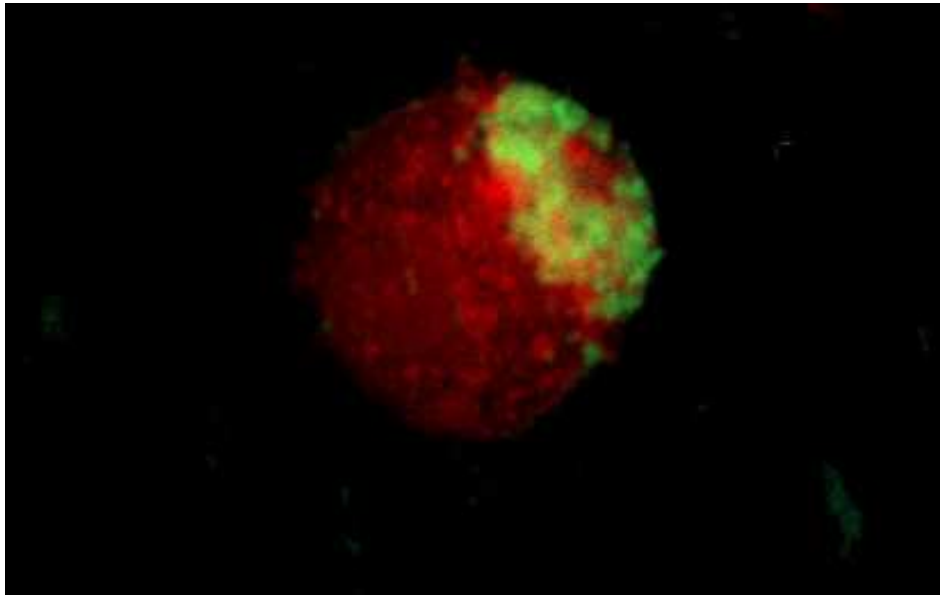


Figure 29 : Immunofluorescence visualisant l'oncoprotéine DR7B de l'HHV-6 en microscopie confocale

La protéine DR7B semble donc être membranaire ou cytoplasmique confirmant ainsi les faits précédemment fournis par la littérature, notamment concernant l'homologie avec la protéine DR7 de l'HHV-6 variant A décrite comme possédant cette même localisation ([Isegawa et al., 1999](#)).

La liaison de DR7B avec p53 qui semble dès lors improbable au vu de la localisation de chacun des deux intervenants, peut s'envisager du fait que de nombreuses altérations semblent avoir lieu au niveau de sa localisation par l'intervention des herpèsvirus. En effet, l'observation de cellules infectées par l'HHV-6 en microscopie confocale a démontré que p53 était retenue dans le cytoplasme comme si l'HHV-6 employait des mécanismes qui inhibait la localisation nucléaire classique de p53 ([Takemoto et al., 2004](#)). De plus, la localisation de DR7B a été confirmée par un western-blot visant les fractions cytoplasmiques et nucléaires de cellules MT4 infectées par l'HHV-6B HST ([Figure 30](#)).

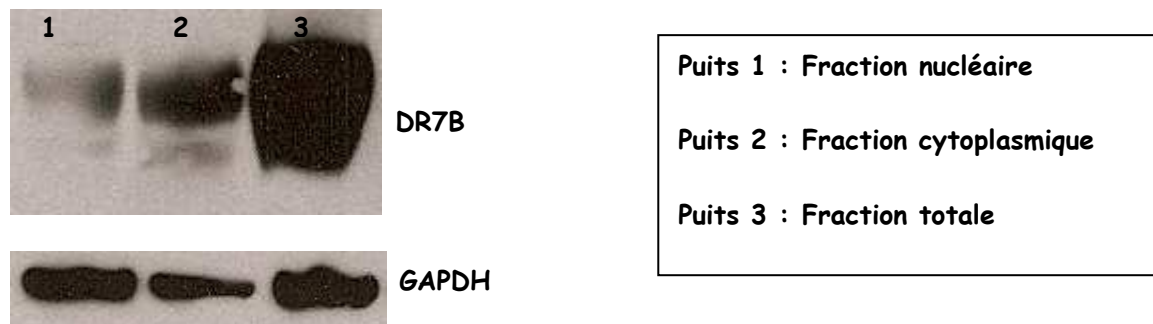


Figure 30 : Western-blot anti-DR7B sur les fractions nucléaires et cytoplasmiques de l'HHV-6B HST

La protéine DR7B est observée en quantité bien moindre dans la fraction nucléaire que dans la fraction cytoplasmique confirmant bien sa localisation cytoplasmique et/ou membranaire.

Pour renforcer un peu plus ce caractère oncogène, il a également été démontré au cours de la thèse précédemment citée que la protéine DR7B augmentait l'expression constitutive de NFκB par ses sous-unités p50 et p65. Cette sur-activation constitutive est un phénomène décrit comme intervenant dans le processus tumoral du lymphome de Hodgkin.

POINTS IMPORTANTS

Présence de l'HHV-6 dans les cellules RS du LH

Expression de DR7B de l'HHV-6 dans les cellules RS et en grande quantité

Caractère oncogène potentiel de DR7B :

- Présence chez 3/4 des patients dans la cellule RS
- DR7B peu présente dans les cellules infiltrantes à la tumeur au contraire de gp
- Présence de DR7B et accumulation de DR7B associée à la pathologie hodgkinienne :
 - ⊗ Stade avancé
 - ⊗ Rémission

ARTICLE 3

Cette étude s'explique tout d'abord par le fait que les deux herpèsvirus EBV et HHV-6 ont été trouvés de façon concomitante en quantification TaqMan à 47,7% (soit 41 patients sur 86 testés) ce qui constituait la part la plus importante de la population. De plus, lorsque les deux virus étaient trouvés de façon concomitante chez un même patient, la quantification individuelle de chacun des deux virus était beaucoup plus importante que dans les groupes où nous pouvions trouver l'un des deux virus seuls; la moyenne obtenue pour la quantification de l'EBV dans le groupe HHV-6+/EBV+ était de 7 082,8 copies/ μ g d'ADN contre 599,7 copies/ μ g d'ADN dans le groupe HHV-6-/EBV+ et de même la moyenne pour la quantification de l'HHV-6 dans le groupe HHV-6+/EBV+ était de 41 864,3 copies/ μ g d'ADN contre 428,5 copies/ μ g d'ADN dans le groupe HHV-6+/EBV-. Ceci pouvait en effet suggérer que chaque virus peut stimuler la réplication de l'autre.

Les deux intervenants ciblés lors de cette troisième étude soit LMP1 pour l'EBV ([Herling et al., 2003](#)) et DR7B pour l'HHV-6, ont été choisis car ils sont tous deux présents au sein de la cellule de Reed-Sternberg caractéristique du lymphome de Hodgkin et que ce sont des oncoprotéines.

Il nous a donc paru important d'observer les localisations respectives de la protéine DR7B de l'HHV-6 et de la protéine LMP1 de l'EBV, ceci en ciblant préférentiellement la cellule de Reed-Sternberg bien que chacune des deux protéines aient été retrouvées dans des cellules infiltrantes à la tumeur. Ceci a déjà été montré auparavant avec la présence de LMP1 notamment dans les lymphocytes T cytotoxiques ([Anagnostopoulos et al., 1995](#); [Oudejans et al., 1997](#)) et pour DR7 dans les lymphocytes ([Alexander et al., 1995](#); [Krueger et al., 2001](#); [Krueger et al., 1994](#); [Rojo et al., 1994](#)).

Pour ce faire, les coupes paraffinées de dix patients, à la fois positifs pour LMP1 et pour DR7B, ont été testées par double marquage en immunofluorescence à l'aide d'anticorps

primaires dirigés contre chacune de ces deux protéines révélés par des anticorps secondaires couplés à des alexas fluor émettant à deux longueurs d'onde différentes.

Colocalization of HHV-6B DR7 and EBV LMP1 oncoproteins in nodular-sclerosis Hodgkin lymphoma

Aurélie Lacroix¹, Arnaud Jaccard², Barbara Petit³, Christophe Piguet⁴,
Dominique Bordessoule², François Labrousse³, Sylvie Ranger-Rogez^{1,5*}

¹*Laboratoire de Microbiologie, EA 4021 IFR 145 GEIST, Faculté de Pharmacie, Limoges, France*

²*Service d'Hématologie, CHU Dupuytren, Limoges, France*

³*Service d'Anatomie Pathologique, CHU Dupuytren, Limoges, France*

⁴*Service de Pédiatrie, CHU Dupuytren, Limoges, France*

⁵*Service de Virologie, CHU Dupuytren, Limoges, France*

***Corresponding author :**

Pr Sylvie Ranger-Rogez, Laboratoire de Microbiologie, Faculté de Pharmacie

2 rue du Dr Marcland, 87025 Limoges Cedex, FRANCE

Phone number : +33-5-55-05-67-21

Fax number : +33-5-55-05-61-28

email : sylvie.rogez@unilim.fr

Running title : HHV-6 DR7B and EBV LMP1 in Hodgkin lymphoma

Toutes les cellules RS observées comme positives pour DR7B de l'HHV-6 présentent aussi un marquage par la protéine LMP1 de l'EBV. Ces deux marquages sont strictement identiques et montrent une co-localisation parfaite au sein des cellules de Reed-Sternberg pour l'ensemble des patients atteints du sous-type scléro-nodulaire. Les patients présentant cette co-localisation semblent être des hommes plutôt âgés et de sous-type scléro-nodulaire mais le faible nombre de patients ne peut conduire qu'à l'observation d'une tendance. Par ailleurs, ces premiers résultats, qui méritent d'être confirmés sur une plus grande série, laissent penser que la présence de la protéine DR7B soit un facteur de bon pronostic comme il a été démontré dans la littérature pour la protéine LMP1 (Williams et Crawford, 2006). Dans le cas du patient atteint du sous-type dit à cellularité mixte, si les cellules RS étaient positives pour LMP1, elles ne portaient pas la protéine DR7B qui était au contraire trouvée dans les cellules infiltrantes. Ceci est à confirmer sur un plus grand nombre de cas. Les mécanismes physiopathologiques impliqués dans chacun des deux sous-types pourraient être de nature différente. Au vu de la co-localisation des deux oncoprotéines, nous sommes amenés à penser qu'il pourrait y avoir interaction directe ou indirecte des deux virus par exemple *via* les deux protéines DR7B et LMP1 détectées. Différentes hypothèses peuvent être émises. En effet, il pourrait tout d'abord y avoir une liaison protéine-protéine, l'effet de l'une pouvant renforcer celui de l'autre. Cette interaction directe pourrait avoir lieu au niveau de la partie N-terminale ou par les domaines transmembranaires de LMP1, la partie C-terminale étant une portion effectrice. L'interaction indirecte est également plus qu'envisageable *via* la protéine p53 par exemple (Oster et al., 2006; Qi et al., 2003; Takemoto et al., 2004) puisque la protéine DR7B a été montrée comme étant liée à cette dernière. Cette interaction indirecte pourrait contribuer à une action synergique des deux protéines en agissant sur des voies de signalisation différentes ou sur la même voie de signalisation comme celle de NFκB (Thornburg et al., 2006) que DR7B et LMP1 activent.

Co-localisation de LMP1 de l'EBV et DR7B de l'HHV-6 chez les patients hodgkiniens

Dans la cellule RS

Probable association à la pathologie :

- ⊗ Patients âgés
- ⊗ Scléro-nodulaire
- ⊗ Pronostic favorable

Ces deux articles mettent fin à une partie mêlant à la fois les notions cliniques et fondamentales dans laquelle a pu être démontrée la présence de l'HHV-6 dans les cellules de Reed-Sternberg du lymphome de Hodgkin. Fort du fait qu'au travers d'un important panel de 86 patients, nous avons pu observer la présence non discutable de l'HHV-6 dans cette maladie de façon concomitante ou non à l'EBV (seul virus jusqu'alors impliqué dans le lymphome de Hodgkin); cette étude a été suivie par l'observation de la localisation du virus HHV-6 via la présence de son oncoprotéine DR7B au sein des cellules tumorales du lymphome de Hodgkin, les cellules de Reed-Sternberg, ceci chez des patients négatifs pour le virus d'Epstein et Barr. Puis, la présence de ces deux virus dans le LH, et notamment de leurs deux oncoprotéines DR7B et LMP1 dans les cellules RS, semble aller dans le sens d'une stimulation des deux virus impliqués. La co-localisation démontrée permet d'envisager des études plus approfondies quant à leur interaction. Notamment, une interaction indirecte via la voie NFκB avec comme intermédiaire AP-1 intervenant de la voie Id2/E2A actrice de la reprogrammation des cellules B matures semble envisageable. Dès lors une étude beaucoup plus fondamentale va être menée afin d'observer si DR7B par son caractère oncogène confère une surexpression au niveau de cette voie de signalisation comme celle observée pour les cellules de Reed-Sternberg.

ARTICLE 4

Suite aux résultats obtenus dans l'étude conduite sur les 38 patients négatifs pour l'EBV et positifs pour l'HHV-6 (présence de la protéine DR7B dans environ 3 patients sur 4 au sein des cellules de Reed-Sternberg) il nous a paru intéressant d'observer les modifications que pouvait entraîner cette oncoprotéine au niveau des voies de signalisation cellulaire et notamment au niveau prolifératif. Pour cela, il nous a fallu réaliser une transfection stable. Bien que délicate à réaliser, une transfection stable présente des caractéristiques intéressantes comme une stabilité dans le temps permettant à la protéine d'être exprimée de manière plus durable que lors d'une transfection transitoire. Le plasmide (Figure 31) utilisé pour réaliser cette transfection a lui-même été choisi avec soin dans la mesure où il possède deux caractéristiques :

- tout d'abord possédant un gène de résistance à la néomycine, ce plasmide peut conduire à une transfection stable, la sélection étant réalisée grâce à la présence de G418 dans le milieu
- ensuite ce plasmide porte un promoteur permettant de moduler l'expression du gène d'intérêt placé sous sa dépendance, cette modulation s'effectuant en présence de tétracycline ou de ses analogues tels que la doxycycline (Sturtz et al., 1998).

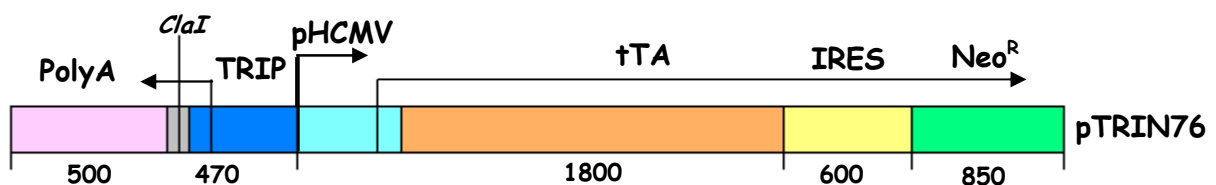


Figure 31 : Structure du plasmide pTRIN76

(D'après Sturtz et al., 1998)

Neo^R : gène de résistance à la néomycine

tTA : protéine transactivatrice sous le contrôle du promoteur au HCMV (pHCMV)

PolyA : séquence de polyadénylation

TRIP : promoteur inductible et répressible *via* la tétracycline

IRES : séquence permettant la transcription de Neo^R sans l'aide d'un promoteur pour ce gène

De façon plus précise, le promoteur au HCMV assure l'expression constitutive de la protéine régulatrice tTA. Cette protéine agit positivement sur le promoteur TRIP pour activer l'expression du gène cloné en amont stabilisée par la présence d'une séquence polyA. Lorsque la tétracycline ou un de ses analogues sont ajoutés au milieu, l'action positive de la protéine tTA sur le promoteur TRIP est réprimée car les molécules de cycline se fixent sur la protéine tTA et bloquent ainsi son action.

Les cellules BJAB (Burkitt's lymphoma B-cell line, don de I. JOAB) ont été choisies comme réceptrices de notre construction pour leurs nombreuses ressemblances avec les cellules de Reed-Sternberg; ceci devant nous conduire au meilleur modèle possible. En effet, ces cellules sont issues comme les cellules RS de la lignée B mature ([Kuppers et Rajewski, 1998](#)) et sont de surcroît négatives pour les deux herpèsvirus impliqués dans le lymphome de Hodgkin que sont l'EBV et l'HHV-6. Toutefois, les cellules caractéristiques du lymphome de Hodgkin, les cellules de Reed-Sternberg ne ressemblent phénotypiquement à aucune cellule hématopoïétique normale ([Kuppers et Brauninger, 2006](#)). En effet, ces cellules possèdent des gènes d'IgV réarrangés par mutations somatiques de façon clonale ([Kuppers et al., 1994](#)). Le profil d'expression génique des lignées cellulaires dérivées du LH révèle une perte globale du programme d'expression génique spécifique aux cellules B ([Schwering et al., 2003](#)). Plusieurs gènes typiquement exprimés par les cellules B sont régulés négativement. Trois facteurs clés dans la maturation des cellules B, agissant comme régulateurs transcriptionnels, ceci de façon hiérarchique et combinée pour établir et maintenir le programme d'expression génique des cellules B, sont particulièrement concernés : Pax-5, EBF et le facteur de transcription E2A ([Janz et al., 2006](#)). E2A est régulé négativement par interaction directe avec l'inhibiteur de la différenciation et de la liaison à l'ADN : Id2 ([Rivera et Murre, 2001](#)) ([Figure 32](#)). Toutes les protéines appartenant à la famille ID contiennent un motif de dimérisation hélice-boucle-hélice (HLH) mais il leur manque la région basique requise pour la liaison à l'ADN. Donc ces protéines Id se dimérisent avec des facteurs de transcription bHLH (domaine basique HLH)

mais il ne peut y avoir liaison à l'ADN (au niveau de la E-box) des hétérodimères (Mathas et al., 2006). Ceci conduit à l'inactivation des facteurs de transcription.

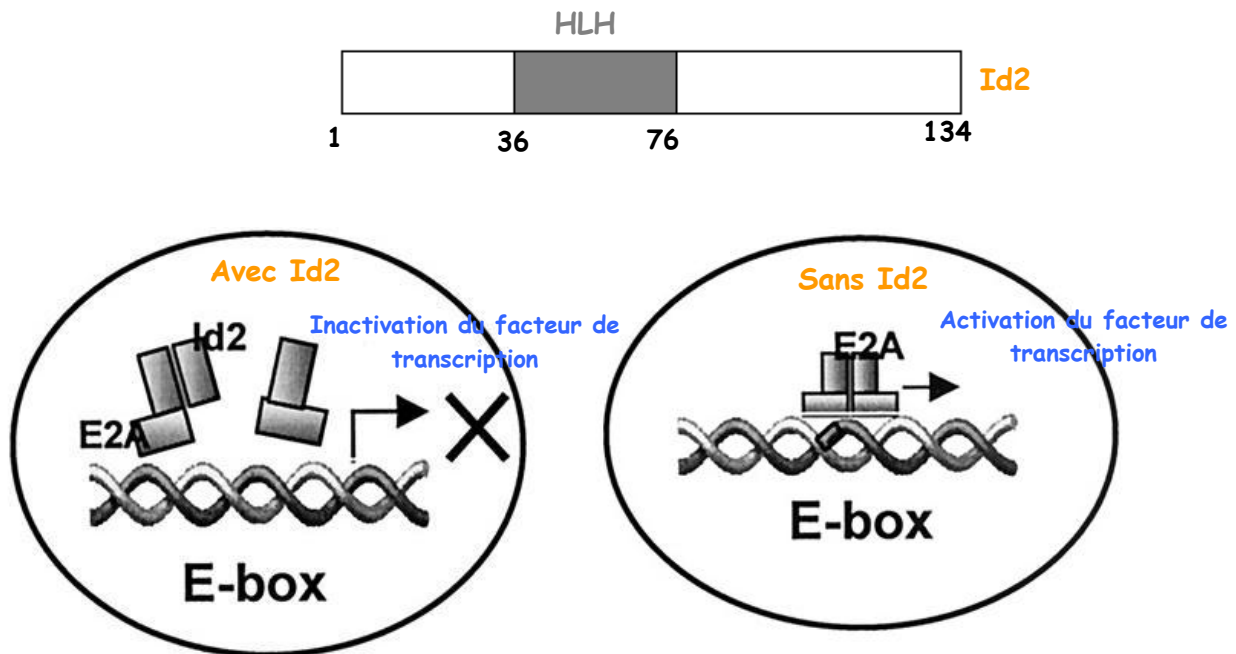


Figure 32 : Structure de l'inhibiteur Id2 et interaction avec E2A

(D'après Kurooka et Yokota, 2005; Becker-Hernman et al., 2002)

Dans les cellules hématopoïétiques en cours de développement, l'expression de Id2 est faible et semble réprimer la maturation des cellules B et l'expression des gènes spécifiques des cellules B (Cooper et al., 1997). *A contrario*, dans les cellules B matures, Id2 est sur-exprimé dans la différenciation des cellules B plasmocytaires avec une perte concomitante de l'expression de nombreux gènes des cellules B. Des transcrits d'Id2 ont par ailleurs été trouvés dans des lignées cellulaires de lymphome de Hodgkin et dans des cellules de Reed-Sternberg issues de biopsies de patients. La production de Id2 par les cellules RS dans le tissu hodgkinien a été récemment confirmée par immuno-histochimie (Renne et al., 2006).

Au vu de la surexpression d'Id2 dans la cellule RS et du fait que l'oncoprotéine DR7B de l'HHV-6 a été démontrée comme intervenant dans le LH au niveau de la cellule RS, il nous a semblé important de réaliser une transfection stable de la lignée B mature BJAB par DR7B ainsi que sa modulation afin de démontrer s'il y avait ou non une dérégulation de l'inhibiteur Id2 de E2A ceci à la fois par PCR quantitative en temps réel et par western-blot.

HHV-6B DR7 oncoprotein stimulates Id2 expression in BJAB cell line

Aurélie Lacroix^{1,2}, Carine Perez^{1,2}, Laurent Mardivirin^{1,2}, Franck Sturtz³,

Sylvie Ranger-Rogez^{1,2*}

¹*Laboratoire de Microbiologie-EA4021, IFR 145 GEIST, Faculté de Pharmacie, Limoges, France*

²*Laboratoire de Virologie, CHU Dupuytren, Limoges, France*

³*Laboratoire de Biochimie-EA4021, IFR 145 GEIST, Faculté de Pharmacie, Limoges, France*

***Corresponding author :**

Pr Sylvie Ranger-Rogez, Laboratoire de Microbiologie, Faculté de Pharmacie

2 rue du Dr Marcland, 87025 Limoges Cedex, FRANCE

Phone number : +33-5-55-05-67-21

Fax number : +33-5-55-05-61-28

email : sylvie.rogez@unilim.fr

Shortened title : Up-regulation of Id2 by DR7B oncoprotein.

La réussite de la transfection de DR7B au sein du génome des cellules BJAB ne s'est pas faite sans aléas. En effet, cette transfection a été initialement tentée dans des cellules U266, de type B plasmocytaire, sans qu'il soit possible de mettre en évidence l'expression de notre gène d'intérêt. Par la suite, la même expérience a été conduite dans des cellules de type BHK-21, avec le même résultat. Les cellules BHK-21 ont été choisies du fait qu'elles sont adhérentes, ce qui présente une facilité dans la récupération des transfectants stables, mais aussi car elles présentent des caractéristiques proches des cellules humaines (modifications post-traductionnelles). La présence du gène DR7B constatée par PCR ne conduisait pas à l'expression de ce gène. Cette absence d'expression peut être due au site d'intégration de la cassette de gènes contenant DR7B ou encore à la rupture de cette cassette conduisant à son inefficacité, ou encore à un turn-over très rapide des ARNs de DR7B. L'absence de signal peut être également liée à la méthylation du promoteur au HCMV car de nombreux types cellulaires sont capables de réaliser cette méthylation et notamment les deux types cellulaires utilisés en première intention, U266 et BHK-21 ([Drucker et al., 2006](#)). Les cellules BJAB se sont avérées être d'excellentes candidates par l'absence de cette capacité méthylante. La seule difficulté tient probablement au fait que ce sont des cellules en suspension, moins faciles à isoler que des cellules adhérentes, et qu'il est donc très délicat de n'obtenir qu'un seul clone sinon par des dilutions limites. Dans cette étude, le plasmide pTRIN76 offre de grandes possibilités dont celle de moduler l'expression de notre gène d'intérêt. Ici, cette capacité n'a été que partiellement utilisée en allumant et éteignant complètement le signal correspondant à DR7B ([Figure 33](#)). En effet, nous n'avons pas besoin de réguler finement l'expression de DR7B mais seulement d'observer si l'expression de Id2 ([Figure 34](#)) était très augmentée en absence de régulation par la doxycycline, ce produit éteignant l'expression de DR7B à la concentration de 1µg/ml. Comme l'augmentation observée pour les transcrits était d'environ deux logarithmes et que le signal observé en western-blot était très fort, il n'était pas besoin de faire varier l'expression de DR7B. L'ensemble de ces résultats ont bien sûr été normalisés à l'aide de la quantification des

transcrits du gène cellulaire GAPDH (glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase) (Figure 35). Cette importante augmentation de l'expression d'Id2 en présence de DR7B nous conduit à penser que l'expression du gène DR7B pourrait entraîner des modifications cellulaires donnant à la cellule transfectée des caractéristiques proches de celles observées pour les cellules de Reed-Sternberg. Cette transfection stable est un très bon outil qui pourra par la suite permettre de tester de nombreuses voies de signalisation. Toutefois, son utilisation est limitée par le fait que les voies cellulaires testées doivent être les bonnes : celles qui sont dérégulées... Pour un screening plus large, il faudrait tester les extraits de cellules transfectées sur des puces transcriptomiques voire protéomiques afin d'observer quelles voies ou quels intervenants peuvent être particulièrement ciblés.

POINTS IMPORTANTS

Surexpression de ID2 inhibiteur de E2A en présence de DR7B

- ⊗ **Au niveau transcriptionnel**
- ⊗ **Au niveau traductionnel**

→ **FAIT REFERENCE AUX CELLULES RS**

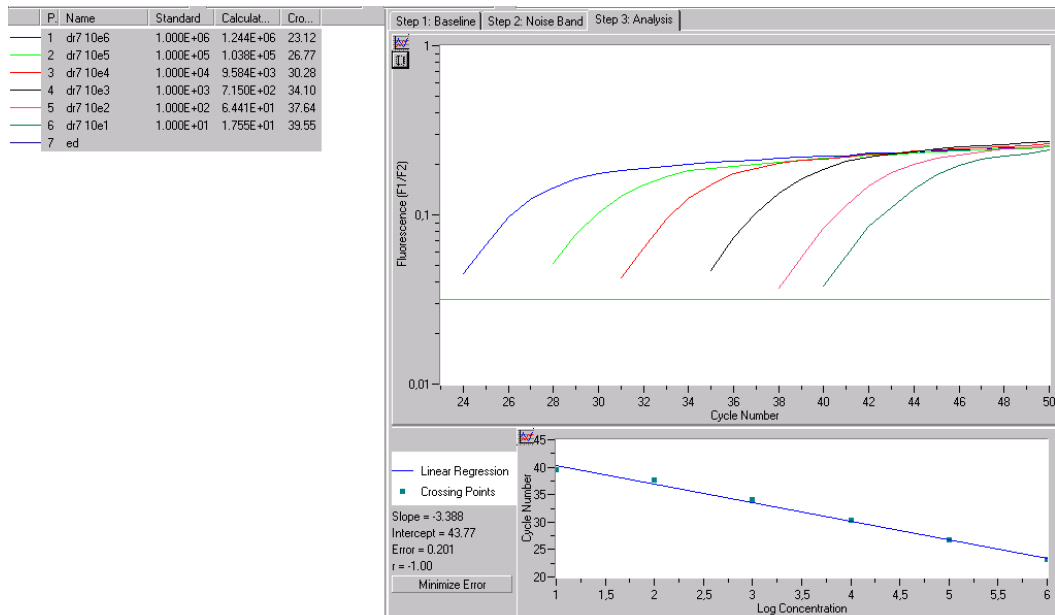


Figure 33 : Gamme étalon pour l'amplification du gène DR7 de l'HHV-6 de type B

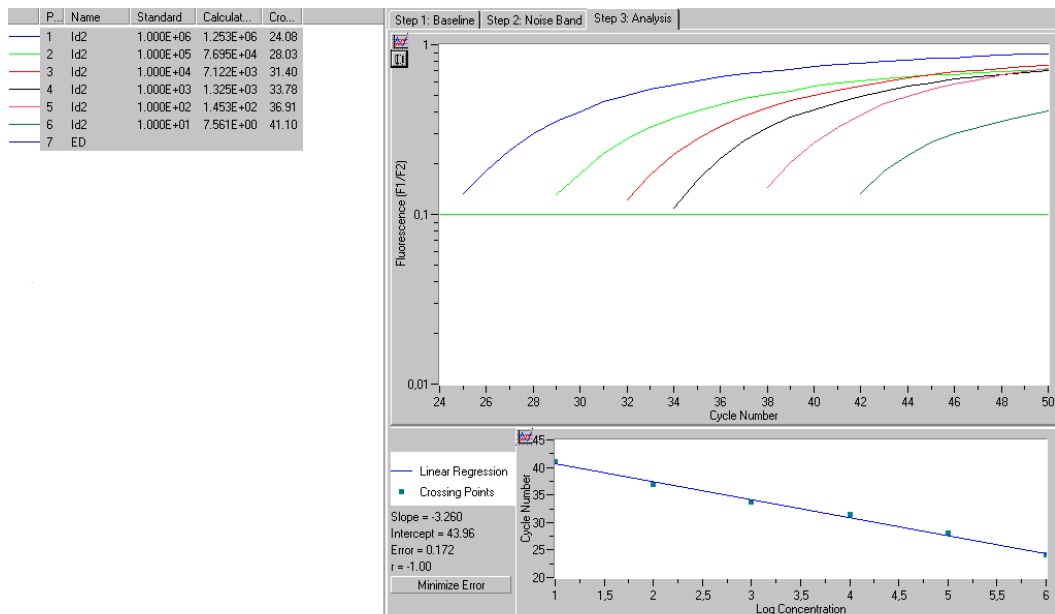


Figure 34 : Gamme étalon pour l'amplification du gène Id2

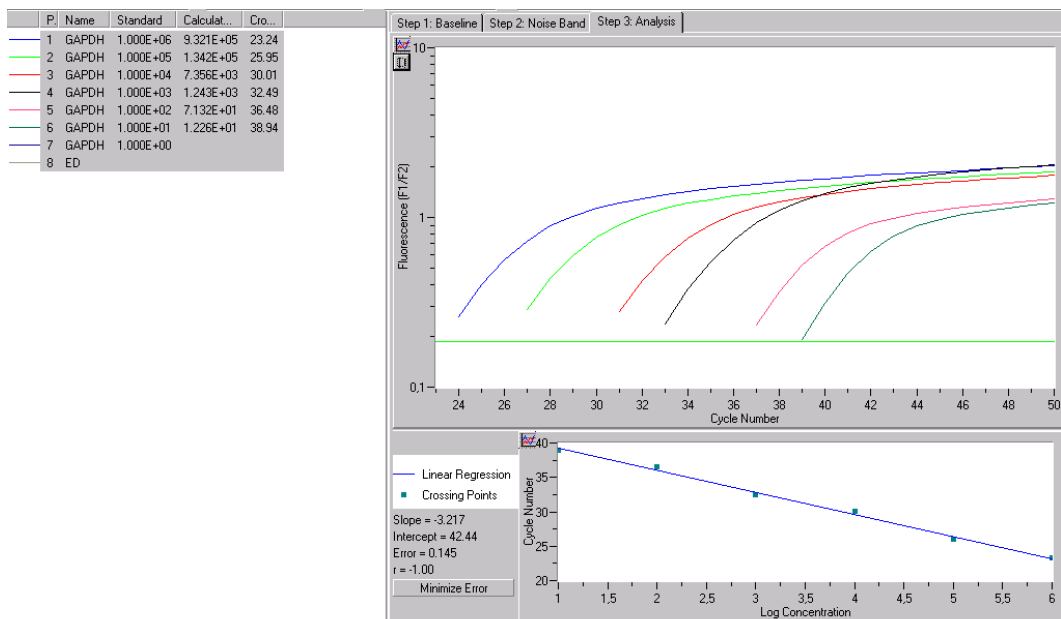


Figure 35 : Gamme étalon pour l'amplification du gène cellulaire GAPDH

CONCLUSIONS PERSPECTIVES

Lors de ce travail de thèse, des avancées notoires quant à l'implication de l'HHV-6 dans le lymphome de Hodgkin ont pu être décrites.

⊗ Tout d'abord, le fait que chez des patients atteints de lymphome de Hodgkin cet herpèsvirus a pu être quantifié de façon concomitante ou non au virus d'Epstein et Barr.

⊗ De façon plus précise, le virus HHV-6 a été démontré comme étant présent au sein des cellules caractéristiques du lymphome de Hodgkin : les cellules de Reed-Sternberg. De plus, la protéine DR7B a été observée comme étant exprimée en grande quantité au sein de ces cellules RS.

⊗ Chez les patients doublement positifs (EBV et HHV-6), les protéines DR7B et LMP1 ont été co-détectées au sein des mêmes cellules et notamment au niveau de la cellule de Reed-Sternberg pouvant laisser entrevoir une interaction directe ou indirecte des deux virus dans la survenue de cette maladie.

⊗ Après transfection stable de DR7B au sein du génome dans les cellules BJAB une voie de signalisation cellulaire a pu être étudiée. La surexpression de Id2 inhibiteur de E2A, est similaire dans les cellules BJAB transfectées stablement par DR7B à ce qui est observé dans la littérature pour les cellules RS montrant que l'intervention de DR7B conduit à des reprogrammations similaires à celles observées pour la cellule RS.

A la suite de l'ensemble de ces résultats, de nombreuses perspectives sont envisageables.

☞ Tout d'abord en commençant par prouver que l'intervention de la protéine DR7B conduit bien au phénotype observé dans les cellules de Reed-Sternberg. Cette étude passe par l'observation microscopique de grandes cellules multinucléées correspondant aux cellules transfectées par DR7B ceci par May Grünwald Giemsa mais également par l'observation d'une prolifération à l'aide d'un test MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium). En outre, il convient d'étudier l'ensemble des marqueurs de surface portés par la cellule RS comme le CD30 ou le CD40, sur les cellules transfectées stablement par DR7B.

Par ailleurs, il serait intéressant de poursuivre sur la voie de l'inhibiteur Id2 en étudiant l'intervenant qu'il inhibe soit E2A ([Renne et al., 2006](#)) ou d'autres intervenants de cette voie comme AP-1 ([Mathas et al., 2002](#)). Ces deux facteurs interviennent dans la voie de MEK/ERK et semblent être dérégulés lors de la prolifération cancéreuse hodgkinienne ([Zheng et al., 2003](#)).

☞ Il serait également utile d'aller plus avant dans l'étude de la localisation de DR7B en précisant celle-ci grâce à des anticorps ciblant les différents compartiments cellulaires par microscopie confocale mais aussi dans l'analyse des modifications post-traductionnelles semblant alourdir cette protéine DR7B présentant un poids théorique de 24,3 kDa ([Figure 36](#)). Ce deuxième aspect pourrait être documenté par western-blot en utilisant par exemple des enzymes coupant les glycosylations et/ou les phosphorylations ([Hasegawa et al., 2004](#)), très représentées en théorie (bio-informatique). Cette protéine pourrait également être cristallisée.



Figure 36 : Western-blot ciblant la protéine DR7 de la souche HHV-6B HST

☞ L'incidence de l'intégration et de la localisation chromosomique de l'HHV-6 pourront également être étudiées ([Torelli et al., 1995](#)) dans la survenue du lymphome de Hodgkin, le modèle de transfection stable intégrant le gène DR7 au sein des cellules BJAB pouvant servir de contrôle à cette étude.

☞ La présence de DR7B pourra, en outre, être observée dans les lymphomes non-hodgkiniens ([Collot et al., 2002](#)) notamment les lymphomes cutanés ([Wagner et al., 1998](#)) car des éléments nous laissent penser qu'elle pourrait y être impliquée : présence du virus dans certaines biopsies cutanées, augmentation du CD99 dans nos cellules stablement transfectées et dans ce type de lymphome ([Dorfman et al., 1997](#)) contrairement à ce qui est observé dans le lymphome de Hodgkin.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Ablashi D., Agut H., Berneman Z., Campadelli-Fiume G., Carrigan D., Ceccerini-Nelli L., Chandran B., Chou S., Collandre H., Cone R., Dambaugh T., Dewhurst S., Di Luca D., Foà-Tomasi L., Fleckenstein B., Frenkel N., Gallo R., Gompels U., Hall C., Jones M., Lawrence G., Martin M., Montagnier L., Neipel F., Nicholas J., Pellett P., Razzaque A., Torelli G., Thomson B., Salahuddin S., Wyatt L., and Yamanishi K. Human herpesvirus-6 strain groups: a nomenclature. *Arch Virol* 1993, 129: 363-6.

Ablashi D.V., Salahuddin S.Z., Josephs S.F., Balachandran N., Krueger G.R., and Gallo R.C. Human herpesvirus-6 (HHV-6). *In Vivo* 1991, 5: 193-9.

Ablashi D.V., Salahuddin S.Z., Josephs S.F., Imam F., Lusso P., Gallo R.C., Hung C., Lemp J., and Markham P.D. HBLV (or HHV-6) in human cell lines. *Nature* 1987, 329: 207.

Adams O., Krempe C., Kogler G., Wernet P., and Scheid A. Congenital infections with human herpesvirus 6. *J Infect Dis* 1998, 178: 544-6.

Akashi K., Eizuru Y., Sumiyoshi Y., Minematsu T., Hara S., Harada M., Kikuchi M., Niho Y., and Minamishima Y. Severe infectious mononucleosis-like syndrome and primary human herpesvirus 6 infection in an adult. *N Engl J Med* 1993, 329: 168-71.

Aleman B.M., van den Belt-Dusebout A.W., Klokman W.J., Van't Veer M.B., Bartelink H., and van Leeuwen F.E. Long-term cause-specific mortality of patients treated for Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* 2003, 21: 3431-9.

Alexander F.E., Daniel C.P., Armstrong A.A., Clark D.A., Onions D.E., Cartwright R.A., and Jarrett R.F. Case clustering, Epstein-Barr virus Reed-Sternberg cell status and herpes virus serology in Hodgkin's disease: results of a case-control study. *Eur J Cancer* 1995, 31A: 1479-86.

Alexander F.E., Jarrett R.F., Lawrence D., Armstrong A.A., Freeland J., Gokhale D.A., Kane E., Taylor G.M., Wright D.H., and Cartwright R.A. Risk factors for Hodgkin's disease by Epstein-Barr virus (EBV) status: prior infection by EBV and other agents. *Br J Cancer* 2000, 82: 1117-21.

Ambinder R.F. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders. *Rev Clin Exp Hematol* 2003, 7: 362-74.

Anagnostopoulos I., Hansmann M.L., Franssila K., Harris M., Harris N.L., Jaffe E.S., Han J., van Krieken J.M., Poppema S., Marafioti T., Franklin J., Sextro M., Diehl V., and Stein H. European Task Force on Lymphoma project on lymphocyte predominance Hodgkin disease: histologic and immunohistologic analysis of submitted cases reveals 2 types of Hodgkin disease with a nodular growth pattern and abundant lymphocytes. *Blood* 2000, 96: 1889-99.

Anagnostopoulos I., Herbst H., Niedobitek G., and Stein H. Demonstration of monoclonal EBV genomes in Hodgkin's disease and Ki-1-positive anaplastic large cell lymphoma by combined Southern blot and in situ hybridization. *Blood* 1989, 74: 810-6.

Anagnostopoulos I., Hummel M., and Stein H. Frequent presence of latent Epstein-Barr virus infection in peripheral T cell lymphomas. A review. *Leuk Lymphoma* 1995, 19: 1-12.

Ansari A., and Emery V.C. The U69 gene of human herpesvirus 6 encodes a protein kinase which can confer ganciclovir sensitivity to baculoviruses. *J Virol* 1999, 73: 3284-91.

Aritaki K., Ohyashiki J.H., Suzuki A., Ojima T., Abe K., Shimizu N., Yamamoto K., Ohyashiki K., and Hoshika A. A rapid monitoring system of human herpesviruses reactivation by LightCycler in stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001, 28: 975-80.

Armstrong A.A., Alexander F.E., Cartwright R., Angus B., Krajewski A.S., Wright D.H., Brown I., Lee F., Kane E., and Jarrett R.F. Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: further evidence for the three disease hypothesis. *Leukemia* 1998, 12: 1272-6.

Arpin C., Dechanet J., Van Kooten C., Merville P., Grouard G., Briere F., Banchereau J., and Liu Y.J. Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. *Science* 1995, 268: 720-2.

Asano Y., Yoshikawa T., Suga S., Kobayashi I., Nakashima T., Yazaki T., Kajita Y., and Ozaki T. Clinical features of infants with primary human herpesvirus 6 infection (exanthem subitum, roseola infantum). *Pediatrics* 1994, 93: 104-8.

Asou H., Tasaka T., Said J.W., Daibata M., Kamada N., and Koeffler H.P. Co-infection of HHV-6 and HHV-8 is rare in primary effusion lymphoma. *Leuk Res* 2000, 24: 59-61.

Atkins G.J., Sheahan B.J., and Liljestrom P. The molecular pathogenesis of Semliki Forest virus: a model virus made useful? *J Gen Virol* 1999, 80: 2287-97.

Aubin J.T., Collandre H., Candotti D., Ingrand D., Rouzioux C., Burgard M., Richard S., Huroux J.M., and Agut H. Several groups among human herpesvirus 6 strains can be distinguished by southern blotting and polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991, 29: 367-72.

Aubin J.T., Poirel L., Agut H., Huraux J.M., Bignozzi C., Brossard Y., Mulliez N., Roume J., Lecuru F., and Taurelle R. Intrauterine transmission of human herpesvirus 6. *Lancet* 1992, 340: 482-3.

B

Baichwal V.R., and Sugden B. Transformation of Balb 3T3 cells by the BNLF-1 gene of Epstein-Barr virus. *Oncogene* 1988, 2: 461-7.

Baillargeon J., Piper J., and Leach C.T. Epidemiology of human herpesvirus 6 (HHV-6) infection in pregnant and nonpregnant women. *J Clin Virol* 2000, 16: 149-57.

Balachandran N., Amelse R.E., Zhou W.W., and Chang C.K. Identification of proteins specific for human herpesvirus 6-infected human T cells. *J Virol* 1989, 63: 2835-40.

Barone S.R., Kaplan M.H., and Krilov L.R. Human herpesvirus-6 infection in children with first febrile seizures. *J Pediatr* 1995, 127: 95-7.

Becker-Hernman S., Lantner F., and Shachar I. Id2 negatively regulates B cell differentiation in the spleen. *J Immunol* 2002, 168: 5507-13.

Bell A., and Rickinson A.B. Epstein-Barr virus, the TCL-1 oncogene and Burkitt's lymphoma. *Trends Microbiol* 2003, 11: 495-7.

Berek C., Berger A., and Apel M. Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell* 1991, 67: 1121-9.

Berrington de Gonzalez A., Urban M.I., Sitas F., Blackburn N., Hale M., Patel M., Ruff P., Sur R., Newton R., and Beral V. Antibodies against six human herpesviruses in relation to seven cancers in black South Africans: a case control study. *Infect Agent Cancer* 2006, 1: 2.

Bhattarakosol P., Pancharoen C., Mekmullica J., and Bhattarakosol P. 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.

Biberfeld P., Kramarsky B., Salahuddin S.Z., and Gallo R.C. 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.

Birnbaum T., Padovan C.S., Sporer B., Rupprecht T.A., Ausserer H., Jaeger G., and Pfister H.W. Severe meningoencephalitis caused by human herpesvirus 6 type B in an immunocompetent woman treated with ganciclovir. *Clin Infect Dis* 2005, 40: 887-9.

Black J.B., Lopez C., and Pellett P.E. Induction of host cell protein synthesis by human herpesvirus 6. *Virus Res* 1992, 22: 13-23.

Black J.B., and Pellett P.E. Human herpesvirus 7. *Rev Med Virol* 1999, 9: 245-62.

Bornkamm G.W., and Hammerschmidt W. Molecular virology of Epstein-Barr virus.

Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2001, 356: 437-59.

Braun D.K., Dominguez G., and Pellett P.E. Human herpesvirus 6. Clin Microbiol Rev

1997, 10: 521-67.

Brauninger A., Schmitz R., Bechtel D., Renne C., Hansmann M.L., and Kuppers R.

Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. Int

J Cancer 2006, 118: 1853-61.

Briggs M., Fox J., and Tedder R.S. Age prevalence of antibody to human herpesvirus 6.

Lancet 1988, 1: 1058-9.

Brousset P., Knecht H., Rubin B., Drouet E., Chittal S., Meggetto F., Saati T.A.,

Bachmann E., Denoyel G., Sergeant A., and et al. Demonstration of Epstein-Barr virus

replication in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. Blood 1993, 82: 872-6.

C

Cabannes E., Khan G., Aillet F., Jarrett R.F., and Hay R.T. Mutations in the IkBa gene in

Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for IkappaBalpha. Oncogene 1999,

18: 3063-70.

Cahir-McFarland E.D., Davidson D.M., Schauer S.L., Duong J., and Kieff E. NF-kappa B

inhibition causes spontaneous apoptosis in Epstein-Barr virus-transformed

lymphoblastoid cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2000, 97: 6055-60.

Campadelli-Fiume G., Mirandola P., and Menotti L. Human herpesvirus 6: An emerging

pathogen. Emerg Infect Dis 1999, 5: 353-66.

Carbone A., Gloghini A., Gattei V., Aldinucci D., Degan M., De Paoli P., Zagonel V., and Pinto A. Expression of functional CD40 antigen on Reed-Sternberg cells and Hodgkin's disease cell lines. *Blood* 1995a, 85: 780-9.

Carbone A., Gloghini A., Gruss H.J., and Pinto A. CD40 ligand is constitutively expressed in a subset of T cell lymphomas and on the microenvironmental reactive T cells of follicular lymphomas and Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 1995b, 147: 912-22.

Carrigan D.R., Drobyski W.R., Russler S.K., Tapper M.A., Knox K.K., and Ash R.C. Interstitial pneumonitis associated with human herpesvirus-6 infection after marrow transplantation. *Lancet* 1991, 338: 147-9.

Cartwright R., Brincker H., Carli P.M., Clayden D., Coebergh J.W., Jack A., McNally R., Morgan G., de Sanjose S., Tumino R., and Vornanen M. The rise in incidence of lymphomas in Europe 1985-1992. *Eur J Cancer* 1999, 35: 627-33.

Cartwright R.A., and Watkins G. Epidemiology of Hodgkin's disease: a review. *Hematol Oncol* 2004, 22: 11-26.

Caselli E., and Di Luca D. Molecular biology and clinical associations of Roseoloviruses human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7. *New Microbiol* 2007, 30: 173-87.

Caserta M.T., Mock D.J., and Dewhurst S. Human herpesvirus 6. *Clin Infect Dis* 2001, 33: 829-33.

Challoner P.B., Smith K.T., Parker J.D., MacLeod D.L., Coulter S.N., Rose T.M., Schultz E.R., Bennett J.L., Garber R.L., Chang M., and et al. Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, 92: 7440-4.

Chan W.C. The Reed-Sternberg cell in classical Hodgkin's disease. *Hematol Oncol* 2001, 19: 1-17.

Chang K.C., Khen N.T., Jones D., and Su I.J. Epstein-Barr virus is associated with all histological subtypes of Hodgkin lymphoma in Vietnamese children with special emphasis on the entity of lymphocyte predominance subtype. *Hum Pathol* 2005, 36: 747-55.

Chen L.F., and Greene W.C. Regulation of distinct biological activities of the NF-kappaB transcription factor complex by acetylation. *J Mol Med* 2003, 81: 549-57.

Chen M., Popescu N., Woodworth C., Berneman Z., Corbellino M., Lusso P., Ablashi D.V., and DiPaolo J.A. Human herpesvirus 6 infects cervical epithelial cells and transactivates human papillomavirus gene expression. *J Virol* 1994, 68: 1173-8.

Chiu S.S., Cheung C.Y., Tse C.Y., and Peiris M. Early diagnosis of primary human herpesvirus 6 infection in childhood: serology, polymerase chain reaction, and virus load. *J Infect Dis* 1998, 178: 1250-6.

Clark D.A. Human herpesvirus 6. *Rev Med Virol* 2000, 10: 155-73.

Clark D.A., Kidd I.M., Collingham K.E., Tarlow M., Ayeni T., Riordan A., Griffiths P.D., Emery V.C., and Pillay D. Diagnosis of primary human herpesvirus 6 and 7 infections in febrile infants by polymerase chain reaction. *Arch Dis Child* 1997, 77: 42-5.

Clark D.A., Nacheva E.P., Leong H.N., Brazma D., Li Y.T., Tsao E.H., Buyck H.C., Atkinson C.E., Lawson H.M., Potter M.N., and Griffiths P.D. Transmission of integrated human herpesvirus 6 through stem cell transplantation: implications for laboratory diagnosis. *J Infect Dis* 2006, 193: 912-6.

Claviez A., Tiemann M., Luders H., Krams M., Parwaresch R., Schellong G., and Dorffel W. Impact of latent Epstein-Barr virus infection on outcome in children and adolescents with Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2005, 23: 4048-56.

Cohen J.I. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med* 2000, 343: 481-92.

Collot S., Petit B., Bordessoule D., Alain S., Touati M., Denis F., and Ranger-Rogez S. Real-time PCR for quantification of human herpesvirus 6 DNA from lymph nodes and saliva. *J Clin Microbiol* 2002, 40: 2445-51.

Connors J.M. State-of-the-art therapeutics: Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2005, 23: 6400-8.

Cooper C.L., Brady G., Bilia F., Iscove N.N., and Quesenberry P.J. Expression of the Id family helix-loop-helix regulators during growth and development in the hematopoietic system. *Blood* 1997, 89: 3155-65.

D

Daibata M., Taguchi T., Kubonishi I., Taguchi H., and Miyoshi I. Lymphoblastoid cell lines with integrated human herpesvirus type 6. *J Hum Virol* 1998a, 1: 475-81.

Daibata M., Taguchi T., Nemoto Y., Taguchi H., and Miyoshi I. Inheritance of chromosomally integrated human herpesvirus 6 DNA. *Blood* 1999, 94: 1545-9.

Daibata M., Taguchi T., Taguchi H., and Miyoshi I. Integration of human herpesvirus 6 in a Burkitt's lymphoma cell line. *Br J Haematol* 1998b, 102: 1307-13.

De Bolle L., Hatse S., Verbeken E., De Clercq E., and Naesens L. Human herpesvirus 6 infection arrests cord blood mononuclear cells in G(2) phase of the cell cycle. *FEBS Lett* 2004, 560: 25-9.

De Bolle L., Naesens L., and De Clercq E. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clin Microbiol Rev* 2005, 18: 217-45.

De Clercq E., and Naesens L. In search of effective anti-HHV-6 agents. *J Clin Virol* 2006, 37 Suppl 1: S82-6.

Deacon E.M., Pallesen G., Niedobitek G., Crocker J., Brooks L., Rickinson A.B., and Young L.S. Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: transcriptional analysis of virus latency in the malignant cells. *J Exp Med* 1993, 177: 339-49.

Devergne O., Hatzivassiliou E., Izumi K.M., Kaye K.M., Kleijnen M.F., Kieff E., and Mosialos G. Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* 1996, 16: 7098-108.

Dewhurst S., McIntyre K., Schnabel K., and Hall C.B. Human herpesvirus 6 (HHV-6) variant B accounts for the majority of symptomatic primary HHV-6 infections in a population of U.S. infants. *J Clin Microbiol* 1993, 31: 416-8.

Di Luca D., Dolcetti R., Mirandola P., De Re V., Secchiero P., Carbone A., Boiocchi M., and Cassai E. Human herpesvirus 6: a survey of presence and variant distribution in normal peripheral lymphocytes and lymphoproliferative disorders. *J Infect Dis* 1994, 170: 211-5.

Di Luca D., Katsafanas G., Schirmer E.C., Balachandran N., and Frenkel N. The replication of viral and cellular DNA in human herpesvirus 6-infected cells. *Virology* 1990, 175: 199-210.

Di Luca D., Mirandola P., Ravaioli T., Dolcetti R., Frigatti A., Bovenzi P., Sighinolfi L., Monini P., and Cassai E. 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.

Diehl V., Stein H., Hummel M., Zollinger R., and Connors J.M. Hodgkin's lymphoma: biology and treatment strategies for primary, refractory, and relapsed disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2003: 225-47.

Diehl V., Thomas R.K., and Re D. Part II: Hodgkin's lymphoma--diagnosis and treatment. *Lancet Oncol* 2004, 5: 19-26.

Dockrell D.H. Human herpesvirus 6: molecular biology and clinical features. *J Med Microbiol* 2003, 52: 5-18.

Dockrell D.H., and Paya C.V. Human herpesvirus-6 and -7 in transplantation. *Rev Med Virol* 2001, 11: 23-36.

Dockrell D.H., Smith T.F., and Paya C.V. Human herpesvirus 6. *Mayo Clin Proc* 1999, 74: 163-70.

Dominguez G., Dambaugh T.R., Stamey F.R., Dewhurst S., Inoue N., and Pellett P.E. Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A. *J Virol* 1999, 73: 8040-52.

Doniger J., Muralidhar S., and Rosenthal L.J. Human cytomegalovirus and human herpesvirus 6 genes that transform and transactivate. *Clin Microbiol Rev* 1999, 12: 367-82.

Dorfman D.M., Kraus M., Perez-Atayde A.R., Barnhill R.L., Pinkus G.S., and Granter S.R. CD99 (p30/32MIC2) immunoreactivity in the diagnosis of leukemia cutis. *Mod Pathol* 1997, 10: 283-8.

Downing R.G., Sewankambo N., Serwadda D., Honess R., Crawford D., Jarrett R., and Griffin B.E. Isolation of human lymphotropic herpesviruses from Uganda. *Lancet* 1987, 2: 390.

Drexler H.G. Recent results on the biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. II. Continuous cell lines. *Leuk Lymphoma* 1993, 9: 1-25.

Drucker L., Tohami T., Tartakover-Matalon S., Zismanov V., Shapiro H., Radnay J., and Lishner M. Promoter hypermethylation of tetraspanin members contributes to their silencing in myeloma cell lines. *Carcinogenesis* 2006, 27: 197-204.

Dworzak M.N., Fritsch G., Buchinger P., Fleischer C., Printz D., Zellner A., Schollhammer A., Steiner G., Ambros P.F., and Gadner H. Flow cytometric assessment of human MIC2 expression in bone marrow, thymus, and peripheral blood. *Blood* 1994, 83: 415-25.

E

Ekstrand B.C., and Horning S.J. Hodgkin's disease. *Blood Rev* 2002, 16: 111-7.

Enders G., Biber M., Meyer G., and 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.

Epstein M.A. Aspects of the EB virus. *Adv Cancer Res* 1970, 13: 383-411.

Epstein M.A. Historical background. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001, 356: 413-20.

F

Fennewald S., van Santen V., and Kieff E. Nucleotide sequence of an mRNA transcribed in latent growth-transforming virus infection indicates that it may encode a membrane protein. *J Virol* 1984, 51: 411-9.

Fillet A.M., Raphael M., Visse B., Audouin J., Poirel L., and Agut H. Controlled study of human herpesvirus 6 detection in acquired immunodeficiency syndrome-associated non-Hodgkin's lymphoma. The French Study Group for HIV-Associated Tumors. *J Med Virol* 1995, 45: 106-12.

Fox J.D., Briggs M., Ward P.A., and Tedder R.S. Human herpesvirus 6 in salivary glands. *Lancet* 1990, 336: 590-3.

Fraga M., and Forteza J. Diagnosis of Hodgkin's disease: an update on histopathological and immunophenotypical features. *Histol Histopathol* 2007, 22: 923-35.

Gautheret-Dejean A., Manichanh C., Thien-Ah-Koon F., Fillet A.M., Mangeney N., Vidaud M., Dhedin N., Vernant J.P., and Agut H. 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.

Gelin C., Aubrit F., Phalipon A., Raynal B., Cole S., Kaczorek M., and Bernard A. The E2 antigen, a 32 kd glycoprotein involved in T-cell adhesion processes, is the MIC2 gene product. *Embo J* 1989, 8: 3253-9.

Georgakis G.V., Li Y., Rassidakis G.Z., and al. Differential effects of three small molecules blocking phosphatidylinositol-3 kinase or AKT in Hodgkin disease cell lines: induction of apoptosis and cell cycle arrest. *Blood* 2004, 104: 125a (abstr 428).

Gires O., Kohlhuber F., Kilger E., Baumann M., Kieser A., Kaiser C., Zeidler R., Scheffer B., Ueffing M., and Hammerschmidt W. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *Embo J* 1999, 18: 3064-73.

Glaser S.L., and Jarrett R.F. The epidemiology of Hodgkin's disease. *Baillieres Clin Haematol* 1996, 9: 401-16.

Gledhill S., Gallagher A., Jones D.B., Krajewski A.S., Alexander F.E., Klee E., Wright D.H., O'Brien C., Onions D.E., and Jarrett R.F. Viral involvement in Hodgkin's disease: detection of clonal type A Epstein-Barr virus genomes in tumour samples. *Br J Cancer* 1991, 64: 227-32.

Gobbi A., Stoddart C.A., Malnati M.S., Locatelli G., Santoro F., Abbey N.W., Bare C., Linquist-Stepps V., Moreno M.B., Herndier B.G., Lusso P., and McCune J.M. Human herpesvirus 6 (HHV-6) causes severe thymocyte depletion in SCID-hu Thy/Liv mice. *J Exp Med* 1999, 189: 1953-60.

Goedhard J.G., Galama J.M., and Wagenvoort J.H. Active human herpesvirus 6 infection in an adolescent male. *Clin Infect Dis* 1995, 20: 1070-1.

Gompels U., and Kasolo F. HHV-6 genome: similar and different, in: Krueger G.R. and Ablashi D.V. (ed.) *Human herpesvirus-6: general virology, epidemiology and clinical psychology*, Second Edition, Volume 12, 23-46, 2006. Elsevier, Amsterdam.

Gompels U.A., and Macaulay H.A. Characterization of human telomeric repeat sequences from human herpesvirus 6 and relationship to replication. *J Gen Virol* 1995, 76: 451-8.

Gompels U.A., Nicholas J., Lawrence G., Jones M., Thomson B.J., Martin M.E., Efstathiou S., Craxton M., and Macaulay H.A. The DNA sequence of human herpesvirus-6: structure, coding content, and genome evolution. *Virology* 1995, 209: 29-51.

Gravel A., Gosselin J., and Flamand L. Human Herpesvirus 6 immediate-early 1 protein is a sumoylated nuclear phosphoprotein colocalizing with promyelocytic leukemia protein-associated nuclear bodies. *J Biol Chem* 2002, 277: 19679-87.

Gravel A., Tomoiu A., Cloutier N., Gosselin J., and Flamand L. Characterization of the immediate-early 2 protein of human herpesvirus 6, a promiscuous transcriptional activator. *Virology* 2003, 308: 340-53.

Gravel A., Tomoiu A., and Flamand L. La phase très précoce de l'infection par le sixième herpèsvirus humain: rôle des protéines IE1 et IE2. *Virologie* 2007, 11: 181-93.

Grivel J.C., Santoro F., Chen S., Faga G., Malnati M.S., Ito Y., Margolis L., and Lusso P. Pathogenic effects of human herpesvirus 6 in human lymphoid tissue ex vivo. *J Virol* 2003, 77: 8280-9.

H

Hall C.B., Caserta M.T., Schnabel K.C., Long C., Epstein L.G., Insel R.A., and Dewhurst S. Persistence of human herpesvirus 6 according to site and variant: possible greater neurotropism of variant A. *Clin Infect Dis* 1998, 26: 132-7.

Hall C.B., Long C.E., Schnabel K.C., Caserta M.T., McIntyre K.M., Costanzo M.A., Knott A., Dewhurst S., Insel R.A., and Epstein L.G. Human herpesvirus-6 infection in children. A prospective study of complications and reactivation. *N Engl J Med* 1994, 331: 432-8.

Hanamoto H., Nakayama T., Miyazato H., Takegawa S., Hieshima K., Tatsumi Y., Kanamaru A., and Yoshie O. Expression of CCL28 by Reed-Sternberg cells defines a major subtype of classical Hodgkin's disease with frequent infiltration of eosinophils and/or plasma cells. *Am J Pathol* 2004, 164: 997-1006.

Hansmann M.L., Weiss L.M., Stein H., Harris N.L., and Joffe E.S. In: Mauch P.M., Armitage J.O., Diehl V., Hoppe R.T., and Weiss L.M. (ed.) *Hodgkin's disease*, 169-180, 1999. Lippencott Williams and Wilkins, Philadelphia.

Harris N.L., Jaffe E.S., Diebold J., Flandrin G., Muller-Hermelink H.K., Vardiman J., Lister T.A., and Bloomfield C.D. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Histopathology* 2000, 36: 69-86.

Hasegawa A., Sawai H., Tsubamoto H., Hori M., Isojima S., and Koyama K. Possible presence of O-linked carbohydrate in the human male reproductive tract CD52. *J Reprod Immunol* 2004, 62: 91-100.

Hashimoto K., Yasukawa M., and Tohyama M. Human herpesvirus 6 and drug allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003, 3: 255-60.

Hemsrichart V., and Pintong J. Association of the Epstein-Barr viruses with Hodgkin lymphoma: an analysis of pediatric cases in Thailand. *J Med Assoc Thai* 2005, 88: 782-7.

Herling M., Rassidakis G.Z., Medeiros L.J., Vassilakopoulos T.P., Kliche K.O., Nadali G., Viviani S., Bonfante V., Giardini R., Chilosi M., Kittas C., Gianni A.M., Bonadonna G., Pizzolo G., Pangalis G.A., Cabanillas F., and Sarris A.H. Expression of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's lymphoma: associations with presenting features, serum interleukin 10 levels, and clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2003, 9: 2114-20.

Hernandez-Losa J., Fedele C.G., Pozo F., Tenorio A., Fernandez V., Castellvi J., Parada C., and Ramon y Cajal S. Lack of association of polyomavirus and herpesvirus types 6 and 7 in human lymphomas. *Cancer* 2005, 103: 293-8.

Higuchi M., Kieff E., and Izumi K.M. The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 putative Janus kinase 3 (JAK3) binding domain does not mediate JAK3 association or activation in B-lymphoma or lymphoblastoid cell lines. *J Virol* 2002, 76: 455-9.

Hjalgrim H., Askling J., Sorensen P., Madsen M., Rosdahl N., Storm H.H., Hamilton-Dutoit S., Eriksen L.S., Frisch M., Ekbohm A., and Melbye M. Risk of Hodgkin's disease and other cancers after infectious mononucleosis. *J Natl Cancer Inst* 2000, 92: 1522-8.

Hodgkin T. On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. *Med Chir Trans* 1832, 17: 68-114.

I

Ichimi R., Jin-no T., and Ito M. Induction of apoptosis in cord blood lymphocytes by HHV-6. *J Med Virol* 1999, 58: 63-8.

Inoue N. Molecular biology of human herpesvirus 6: DNA replication and trans-activator genes. *Nippon Rinsho* 1998, 56: 50-5.

Inoue Y., Yasukawa M., and Fujita S. Induction of T-cell apoptosis by human herpesvirus 6. *J Virol* 1997, 71: 3751-9.

Isegawa Y., Mukai T., Nakano K., Kagawa M., Chen J., Mori Y., Sunagawa T., Kawanishi K., Sashihara J., Hata A., Zou P., Kosuge H., and Yamanishi K. Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B. *J Virol* 1999, 73: 8053-63.

Iyengar S., Levine P.H., Ablashi D., Neequaye J., and Pearson G.R. Sero-epidemiological investigations on human herpesvirus 6 (HHV-6) infections using a newly developed early antigen assay. *Int J Cancer* 1991, 49: 551-7.

Izban K.F., Wrone-Smith T., Hsi E.D., Schnitzer B., Quevedo M.E., and Alkan S. Characterization of the interleukin-1beta-converting enzyme/ced-3-family protease, caspase-3/CPP32, in Hodgkin's disease: lack of caspase-3 expression in nodular lymphocyte predominance Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 1999, 154: 1439-47.

Izumi K.M., Cahir McFarland E.D., Riley E.A., Rizzo D., Chen Y., and Kieff E. The residues between the two transformation effector sites of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 are not critical for B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* 1999a, 73: 9908-16.

Izumi K.M., Cahir McFarland E.D., Ting A.T., Riley E.A., Seed B., and Kieff E.D. The Epstein-Barr virus oncoprotein latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated proteins TRADD and receptor-interacting protein (RIP) but does not induce apoptosis or require RIP for NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* 1999b, 19: 5759-67.

Izumi K.M., and Kieff E.D. The Epstein-Barr virus oncogene product latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein to mediate B lymphocyte growth transformation and activate NF-kappaB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94: 12592-7.

J

Jacob J., Kelsoe G., Rajewsky K., and Weiss U. Intracloonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature* 1991, 354: 389-92.

Janz M., Dorken B., and Mathas S. Reprogramming of B lymphoid cells in human lymphoma pathogenesis. *Cell Cycle* 2006, 5: 1057-61.

Jarrett R.F. Viruses and Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 2002, 13 Suppl 1: 23-9.

Jarrett R.F., Gledhill S., Qureshi F., Crae S.H., Madhok R., Brown I., Evans I., Krajewski A., O'Brien C.J., Cartwright R.A., and et al. Identification of human herpesvirus 6-specific DNA sequences in two patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* 1988, 2: 496-502.

Jarrett R.F., and MacKenzie J. Epstein-Barr virus and other candidate viruses in the pathogenesis of Hodgkin's disease. *Semin Hematol* 1999, 36: 260-9.

Jarrett R.F., Stark G.L., White J., Angus B., Alexander F.E., Krajewski A.S., Freeland J., Taylor G.M., and Taylor P.R. Impact of tumor Epstein-Barr virus status on presenting features and outcome in age-defined subgroups of patients with classic Hodgkin lymphoma: a population-based study. *Blood* 2005, 106: 2444-51.

Joos S., Kupper M., Ohl S., von Bonin F., Mechttersheimer G., Bentz M., Marynen P., Moller P., Pfreundschuh M., Trumper L., and Lichter P. Genomic imbalances including amplification of the tyrosine kinase gene JAK2 in CD30+ Hodgkin cells. *Cancer Res* 2000, 60: 549-52.

Josephs S.F., Salahuddin S.Z., Ablashi D.V., Schachter F., Wong-Staal F., and Gallo R.C.

Genomic analysis of the human B-lymphotropic virus (HBLV). *Science* 1986, 234: 601-3.

Joske D.J., Emery-Goodman A., Bachmann E., Bachmann F., Odermatt B., and Knecht H.

Epstein-Barr virus burden in Hodgkin's disease is related to latent membrane protein gene expression but not to active viral replication. *Blood* 1992, 80: 2610-3.

Jost P.J., and Ruland J. Aberrant NF-kappaB signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications. *Blood* 2007, 109: 2700-7.

Jundt F., Anagnostopoulos I., Bommert K., Emmerich F., Muller G., Foss H.D., Royer H.D., Stein H., and Dorken B. Hodgkin/Reed-Sternberg cells induce fibroblasts to secrete eotaxin, a potent chemoattractant for T cells and eosinophils. *Blood* 1999, 94: 2065-71.

K

Kapp U., Yeh W.C., Patterson B., Elia A.J., Kagi D., Ho A., Hessel A., Tipsword M., Williams A., Mirtsos C., Itie A., Moyle M., and Mak T.W. Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *J Exp Med* 1999, 189: 1939-46.

Karlsson G.B., and Liljestrom P. Delivery and expression of heterologous genes in mammalian cells using self-replicating alphavirus vectors. *Methods Mol Biol* 2004, 246: 543-57.

Kashanchi F., Araujo J., Doniger J., Muralidhar S., Hoch R., Khleif S., Mendelson E., Thompson J., Azumi N., Brady J.N., Luppi M., Torelli G., and Rosenthal L.J. Human herpesvirus 6 (HHV-6) ORF-1 transactivating gene exhibits malignant transforming activity and its protein binds to p53. *Oncogene* 1997, 14: 359-67.

Kashanchi F., Thompson J., Sadaie M.R., Doniger J., Duvall J., Brady J.N., and Rosenthal L.J. Transcriptional activation of minimal HIV-1 promoter by ORF-1 protein expressed from the Sall-L fragment of human herpesvirus 6. *Virology* 1994, 201: 95-106.

Kashkar H., Haefs C., Shin H., Hamilton-Dutoit S.J., Salvesen G.S., Kronke M., and Jurgensmeier J.M. XIAP-mediated caspase inhibition in Hodgkin's lymphoma-derived B cells. *J Exp Med* 2003, 198: 341-7.

Kashkar H., Kronke M., and Jurgensmeier J.M. Defective Bax activation in Hodgkin B-cell lines confers resistance to staurosporine-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2002, 9: 750-7.

Kato Z., Kozawa R., Teramoto T., Hashimoto K., Shinoda S., and Kondo N. Acute cerebellitis in primary human herpesvirus-6 infection. *Eur J Pediatr* 2003, 162: 801-3.

Kaye K.M., Izumi K.M., and Kieff E. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90: 9150-4.

Keegan T.H., Glaser S.L., Clarke C.A., Gulley M.L., Craig F.E., Diguseppe J.A., Dorfman R.F., Mann R.B., and Ambinder R.F. Epstein-Barr virus as a marker of survival after Hodgkin's lymphoma: a population-based study. *J Clin Oncol* 2005, 23: 7604-13.

Khan G., Norton A.J., and Slavin G. Epstein-Barr virus in Hodgkin disease. Relation to age and subtype. *Cancer* 1993, 71: 3124-9.

Kieff E., and Leibowitz D. The Epstein-Barr virus and its replication, in : Fields B.N. and Knipe D.M. (ed.) *Fundamental Virology Edition 2*, 897, 1990. Raven, New York.

Kikuta H., Lu H., Tomizawa K., and Matsumoto S. Enhancement of human herpesvirus 6 replication in adult human lymphocytes by monoclonal antibody to CD3. *J Infect Dis* 1990, 161: 1085-7.

Kim S.H., Choi E.Y., Shin Y.K., Kim T.J., Chung D.H., Chang S.I., Kim N.K., and Park S.H. Generation of cells with Hodgkin's and Reed-Sternberg phenotype through downregulation of CD99 (Mic2). *Blood* 1998, 92: 4287-95.

Kimberlin D.W. Human herpesviruses 6 and 7: identification of newly recognized viral pathogens and their association with human disease. *Pediatr Infect Dis J* 1998, 17: 59-67.

Knecht H., Berger C., McQuain C., Rothenberger S., Bachmann E., Martin J., Esslinger C., Drexler H.G., Cai Y.C., Quesenberry P.J., and Odermatt B.F. Latent membrane protein 1 associated signaling pathways are important in tumor cells of Epstein-Barr virus negative Hodgkin's disease. *Oncogene* 1999, 18: 7161-7.

Knox K.K., Harrington D.P., and Carrigan D.R. Fulminant human herpesvirus six encephalitis in a human immunodeficiency virus-infected infant. *J Med Virol* 1995, 45: 288-92.

Kondo K., Kondo T., Okuno T., Takahashi M., and Yamanishi K. Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. *J Gen Virol* 1991, 72: 1401-8.

Kondo K., Nagafuji H., Hata A., Tomomori C., and 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.

Kondo K., Shimada K., Sashihara J., Tanaka-Taya K., and Yamanishi K. Identification of human herpesvirus 6 latency-associated transcripts. *J Virol* 2002, 76: 4145-51.

Kretschmer C., Jones D.B., Morrison K., Schluter C., Feist W., Ulmer A.J., Arnoldi J., Matthes J., Diamantstein T., Flad H.D., and et al. Tumor necrosis factor alpha and lymphotoxin production in Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 1990, 137: 341-51.

Krueger G.R., and Ablashi D.V. Human herpesvirus-6: a short review of its biological behavior. *Intervirol* 2003, 46: 257-69.

Krueger G.R., Ablashi D.V., Josephs S.F., Salahuddin S.Z., Lembke V., Ramon A., and Bertram G. Clinical indications and diagnostic techniques of human herpesvirus-6 (HHV-6) infection. *In Vivo* 1991, 5: 287-95.

Krueger G.R., Guenther A., Knuefermann R., Kluppelberg U., Luka J., Pearson G.R., Ablashi D.V., Juecker M., and Tesch H. Human herpesvirus-6 (HHV-6) in Hodgkin's disease: cellular expression of viral antigens as compared to oncogenes met and fes, tumor suppressor gene product p53, and interleukins 2 and 6. *In Vivo* 1994, 8: 501-16.

Krueger G.R., Huetter M.L., Rojo J., Romero M., and Cruz-Ortiz H. Human herpesviruses HHV-4 (EBV) and HHV-6 in Hodgkin's and Kikuchi's diseases and their relation to proliferation and apoptosis. *Anticancer Res* 2001, 21: 2155-61.

Krueger G.R., Wassermann K., De Clerck L.S., Stevens W.J., Bourgeois N., Ablashi D.V., Josephs S.F., and Balachandran N. Latent herpesvirus-6 in salivary and bronchial glands. *Lancet* 1990, 336: 1255-6.

Kulwichit W., Edwards R.H., Davenport E.M., Baskar J.F., Godfrey V., and Raab-Traub N. Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95: 11963-8.

Kupper M., Joos S., von Bonin F., Daus H., Pfreundschuh M., Lichter P., Trumper L. MDM2 gene amplification and lack of p53 point mutations in Hodgkin and Reed-Sternberg cells: results from single-cell polymerase chain reaction and molecular cytogenetic studies. *Br J Haematol* 2001, 112: 768-75.

Kuppers R. Molecular biology of Hodgkin's lymphoma. *Adv Cancer Res* 2002, 84: 277-312.

Kuppers R., and Brauninger A. Reprogramming of the tumour B-cell phenotype in Hodgkin lymphoma. *Trends Immunol* 2006, 27: 203-5.

Kuppers R., and Hansmann M.L. The Hodgkin and Reed/Sternberg cell. *Int J Biochem Cell Biol* 2005, 37: 511-7.

Kuppers R., and Rajewsky K. The origin of Hodgkin and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Annu Rev Immunol* 1998, 16: 471-93.

Kuppers R., Rajewsky K., Zhao M., Simons G., Laumann R., Fischer R., and Hansmann M.L. Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91: 10962-6.

Kuppers R., Schwering I., Brauninger A., Rajewsky K., and Hansmann M.L. Biology of Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 2002, 13 Suppl 1: 11-8.

Kuppers R., Yahalom J., and Josting A. Advances in biology, diagnostics, and treatment of Hodgkin's disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006, 12: 66-76.

Kuppers R., Zhao M., Hansmann M.L., and Rajewsky K. Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *Embo J* 1993, 12: 4955-67.

Kurooka H., and Yokota Y. Nucleo-cytoplasmic shuttling of Id2, a negative regulator of basic helix-loop-helix transcription factors. *J Biol Chem* 2005, 280: 4313-20.

L

Lacoste V., Mauclore P., Dubreuil G., Lewis J., Georges-Courbot M.C., Rigoulet J., Petit T., and Gessain A. Simian homologues of human gamma-2 and beta herpesviruses in mandrill and drill monkeys. *J Virol* 2000, 74: 11993-9.

Lacoste V., Verschoor E.J., Nerrienet E., and Gessain A. A novel homologue of Human herpesvirus 6 in chimpanzees. *J Gen Virol* 2005, 86: 2135-40.

Lau Y.L., Peiris M., Chan G.C., Chan A.C., Chiu D., and Ha S.Y. Primary human herpes virus 6 infection transmitted from donor to recipient through bone marrow infusion. *Bone Marrow Transplant* 1998, 21: 1063-6.

Lautenschlager I., Linnavuori K., and Hockerstedt K. Human herpesvirus-6 antigenemia after liver transplantation. *Transplantation* 2000, 69: 2561-6.

Lee I.S., Shin Y.K., Chung D.H., and Park S.H. LMP1-induced downregulation of CD99 molecules in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Leuk Lymphoma* 2001, 42: 587-94.

Levine P.H., Ablashi D.V., Berard C.W., Carbone P.P., Waggoner D.E., and Malan L. Elevated antibody titers to Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease. *Cancer* 1971, 27: 416-21.

Levine P.H., Ebbesen P., Ablashi D.V., Saxinger W.C., Nordentoft A., and Connelly R.R. Antibodies to human herpes virus-6 and clinical course in patients with Hodgkin's disease. *Int J Cancer* 1992, 51: 53-7.

Lietz A., Janz M., Sigvardsson M., Jundt F., Dorken B., and Mathas S. Loss of bHLH transcription factor E2A activity in primary effusion lymphoma confers resistance to apoptosis. *Br J Haematol* 2007, 137: 342-8.

Liljestrom P., and Garoff H. A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *Biotechnology (N Y)* 1991, 9: 1356-61.

Lin W.C., Moore J.O., Mann K.P., Traweek S.T., and Smith C. Post transplant CD8+ gammadelta T-cell lymphoma associated with human herpes virus-6 infection. *Leuk Lymphoma* 1999, 33: 377-84.

Liszewski M.K., Post T.W., and Atkinson J.P. Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu Rev Immunol* 1991, 9: 431-55.

Liu Y.J., Joshua D.E., Williams G.T., Smith C.A., Gordon J., and MacLennan I.C. Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* 1989, 342: 929-31.

Locatelli G., Santoro F., Veglia F., Gobbi A., Lusso P., and Malnati M.S. Real-time quantitative PCR for human herpesvirus 6 DNA. *J Clin Microbiol* 2000, 38: 4042-8.

Lopez C., Pellett P., Stewart J., Goldsmith C., Sanderlin K., Black J., Warfield D., and Feorino P. Characteristics of human herpesvirus-6. *J Infect Dis* 1988, 157: 1271-3.

Lorenzen J., Thiele J., and Fischer R. The mummified Hodgkin cell: cell death in Hodgkin's disease. *J Pathol* 1997, 182: 288-98.

Lundstrom K. Semliki Forest virus vectors for large-scale production of recombinant proteins. *Methods Mol Med* 2003a, 76: 525-43.

Lundstrom K. Semliki Forest virus vectors for rapid and high-level expression of integral membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 2003b, 1610: 90-6.

Luppi M., Barozzi P., Garber R., Maiorana A., Bonacorsi G., Artusi T., Trovato R., Marasca R., and Torelli G. Expression of human herpesvirus-6 antigens in benign and malignant lymphoproliferative diseases. *Am J Pathol* 1998, 153: 815-23.

Luppi M., Barozzi P., Morris C., Maiorana A., Garber R., Bonacorsi G., Donelli A., Marasca R., Tabilio A., and Torelli G. Human herpesvirus 6 latently infects early bone marrow progenitors in vivo. *J Virol* 1999, 73: 754-9.

Lusso P., and Gallo R.C. Human herpesvirus 6. *Baillieres Clin Haematol* 1995, 8: 201-23.

Lusso P., Markham P.D., Tschachler E., di Marzo Veronese F., Salahuddin S.Z., Ablashi D.V., Pahwa S., Krohn K., and Gallo R.C. In vitro cellular tropism of human B-lymphotropic virus (human herpesvirus-6). *J Exp Med* 1988, 167: 1659-70.

M

MacLennan I.C. Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 1994, 12: 117-39.

Macswen K.F., and Crawford D.H. Epstein-Barr virus-recent advances. *Lancet Infect Dis* 2003, 3: 131-40.

Maeda T., Okuno T., Hayashi K., Nagata M., Ueda M., Terashima K., Kawashima T., Miyamoto H., Mori T., and Yamada Y. 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.

Maggio E., van den Berg A., Diepstra A., Kluiver J., Visser L., and Poppema S. Chemokines, cytokines and their receptors in Hodgkin's lymphoma cell lines and tissues. *Ann Oncol* 2002, 13 Suppl 1: 52-6.

Mardivirin L., Lacroix A., Delebassée S., Descamps V., and Ranger-Rogez S. Augmentation de la réplication in vitro de l'herpèsvirus humain 6 en présence de valproate de sodium. *Virologie* 2007, 11: 151-3.

Martin-Subero J.I., Gesk S., Harder L., Sonoki T., Tucker P.W., Schlegelberger B., Grote W., Novo F.J., Calasanz M.J., Hansmann M.L., Dyer M.J., and Siebert R. Recurrent involvement of the REL and BCL11A loci in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2002, 99: 1474-7.

Martin-Subero J.I., Renne C., S. G., and al. Chromosomal rearrangements affecting the BCL6, MYC and MALT1 loci are rare events in classical Hodgkin lymphoma. *Eur J Hematol* 2004, 73 (Suppl 65): B23.

Mathas S., Hinz M., Anagnostopoulos I., Krappmann D., Lietz A., Jundt F., Bommert K., Mehta-Grigoriou F., Stein H., Dorken B., and Scheidereit C. Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF-kappa B. *Embo J* 2002, 21: 4104-13.

Mathas S., Janz M., Hummel F., Hummel M., Wollert-Wulf B., Lusatis S., Anagnostopoulos I., Lietz A., Sigvardsson M., Jundt F., Johrens K., Bommert K., Stein H., and Dorken B. Intrinsic inhibition of transcription factor E2A by HLH proteins ABF-1 and Id2 mediates reprogramming of neoplastic B cells in Hodgkin lymphoma. *Nat Immunol* 2006, 7: 207-15.

Metkar S.S., Naresh K.N., Redkar A.A., and Nadkarni J.J. CD40-ligation-mediated protection from apoptosis of a Fas-sensitive Hodgkin's-disease-derived cell line. *Cancer Immunol Immunother* 1998, 47: 104-12.

Meyer R.M., Ambinder R.F., and Stroobants S. Hodgkin's lymphoma: evolving concepts with implications for practice. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2004: 184-202.

Meyne J., Ratliff R.L., and Moyzis R.K. Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, 86: 7049-53.

Mori Y., Akkapaiboon P., Yang X., and 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.

Mori Y., Dhepakson T., Shimamoto T., Ueda K., Gomi Y., Tani H., Matsuura Y., and Yamanishi K. Expression of human herpesvirus 6 B rep within infected cells and binding of its gene product to the TATA-binding protein in vitro and in vivo. *J Virol* 2000, 74: 6096-104.

Mori Y., Yagi H., Shimamoto T., Isegawa Y., Sunagawa T., Inagi R., Kondo K., Tano Y., and Yamanishi K. Analysis of human herpesvirus 6 U3 gene, which is a positional homolog of human cytomegalovirus UL 24 gene. *Virology* 1998, 249: 129-39.

Mori Y., Yang X., Akkapaiboon P., Okuno T., and Yamanishi K. Human herpesvirus 6 variant A glycoprotein H-glycoprotein L-glycoprotein Q complex associates with human CD46. *J Virol* 2003b, 77: 4992-9.

Morris C., Luppi M., McDonald M., Barozzi P., and 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.

Mosialos G., Birkenbach M., Yalamanchili R., VanArsdale T., Ware C., and Kieff E. The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* 1995, 80: 389-99.

Mueller N., Evans A., Harris N.L., Comstock G.W., Jellum E., Magnus K., Orentreich N., Polk B.F., and Vogelman J. Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus. Altered antibody pattern before diagnosis. *N Engl J Med* 1989, 320: 689-95.

Mukai T., Yamamoto T., Kondo T., Kondo K., Okuno T., Kosuge H., and Yamanishi K. Molecular epidemiological studies of human herpesvirus 6 in families. *J Med Virol* 1994, 42: 224-7.

Munoz N., Davidson R.J., Witthoff B., Ericsson J.E., and De-The G. Infectious mononucleosis and Hodgkin's disease. *Int J Cancer* 1978, 22: 10-3.

Murray P.G., and Young L.S. Epstein-Barr virus infection: basis of malignancy and potential for therapy. *Expert Rev Mol Med* 2001, 3: 1-20.

Murray P.G., Young L.S., Rowe M., and Crocker J. Immunohistochemical demonstration of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein in paraffin sections of Hodgkin's disease. *J Pathol* 1992, 166: 1-5.

N

Nicolas J.C., Marechal V., and Dehee A. Epstein-Barr virus. *Bull Acad Natl Med* 1997, 181: 981-97.

Nigro G., Luzi G., Krzysztofiak A., D'Orio F., and 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.

Nii S., Yoshida M., Uno F., Kurata T., Ikuta K., and Yamanishi K. Replication of human herpesvirus 6 (HHV-6): morphological aspects. *Adv Exp Med Biol* 1990, 278: 19-28.

Nitsche A., Muller C.W., Radonic A., Landt O., Ellerbrok H., Pauli G., and Siegert W. Human herpesvirus 6A DNA Is detected frequently in plasma but rarely in peripheral blood leukocytes of patients after bone marrow transplantation. *J Infect Dis* 2001, 183: 130-3.

O

Ohshima K., Akaiwa M., Umeshita R., Suzumiya J., Izuhara K., and Kikuchi M. Interleukin-13 and interleukin-13 receptor in Hodgkin's disease: possible autocrine mechanism and involvement in fibrosis. *Histopathology* 2001, 38: 368-75.

Okuno T., Takahashi K., Balachandra K., Shiraki K., Yamanishi K., Takahashi M., and Baba K. Seroepidemiology of human herpesvirus 6 infection in normal children and adults. *J Clin Microbiol* 1989, 27: 651-3.

Olkkonen V.M., Dupree P., Simons K., Liljestrom P., and Garoff H. Expression of exogenous proteins in mammalian cells with the Semliki Forest virus vector. *Methods Cell Biol* 1994, 43: 43-53.

Oster B., Kaspersen M.D., Kofod-Olsen E., Bundgaard B., and Hollsberg P. Human herpesvirus 6B inhibits cell proliferation by a p53-independent pathway. *J Clin Virol* 2006, 37 Suppl 1: S63-8.

Oudejans J.J., Jiwa N.M., and Meijer C.J. Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease: more than just an innocent bystander. *J Pathol* 1997, 181: 353-6.

P

Pallesen G., Hamilton-Dutoit S.J., Rowe M., and Young L.S. Expression of Epstein-Barr virus latent gene products in tumour cells of Hodgkin's disease. Lancet 1991, 337: 320-2.

Parker C.A., and Weber J.M. 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.

Parkin D.M., Bray F., Ferlay J., and Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. Int J Cancer 2001, 94: 153-6.

Paterson D.L., Singh N., Gayowski T., Carrigan D.R., and Marino I.R. Encephalopathy associated with human herpesvirus 6 in a liver transplant recipient. Liver Transpl Surg 1999, 5: 454-5.

Pedersen S.M., and Hollsberg P. Complexities in human herpesvirus-6A and -6B binding to host cells. Virology 2006, 356: 1-3.

Peh S.C., Kim L.H., and Poppema S. TARC, a CC chemokine, is frequently expressed in classic Hodgkin's lymphoma but not in NLP Hodgkin's lymphoma, T-cell-rich B-cell lymphoma, and most cases of anaplastic large cell lymphoma. Am J Surg Pathol 2001, 25: 925-9.

Pellett P., and Dominguez G. Human herpesviruses 6A, 6B, and 7 and their replication, in: Knipe D.M., Hawley P.M. (ed.) Fields Virology Fourth Edition Volume 2, 2369-84, 2001. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.

Portis T., Dyck P., and Longnecker R. Epstein-Barr Virus (EBV) LMP2A induces alterations in gene transcription similar to those observed in Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 2003, 102: 4166-78.

Portolani M., Cermelli C., Moroni A., Bertolani M.F., Di Luca D., Cassai E., and Sabbatini A.M. Human herpesvirus-6 infections in infants admitted to hospital. *J Med Virol* 1993, 39: 146-51.

Q

Qavi H.B., Green M.T., Lewis D.E., Hollinger F.B., Pearson G., and Ablashi D.V. 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.

Qi Z.L., Zhao T., Zhou X.H., Zhang J.H., Han X.Q., and Zhu M.G. Expressions of latent membrane protein 1, p53 and bcl-2 proteins and their significance in Hodgkin's lymphoma. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2003, 23: 225-7.

R

Rajewski K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 1996, 381: 751-8.

Ranger S., Patillaud S., Denis F., Himmich A., Sangare A., M'Boup S., Itoua-N'Gaporo A., Prince-David M., Chout R., Cevallos R., and et al. Seroepidemiology of human herpesvirus-6 in pregnant women from different parts of the world. *J Med Virol* 1991, 34: 194-8.

Ranger-Rogez S., Lacroix A., Denis F., and Bordessoule D. HHV-6 and the lympho-hematopoietic system, in: Krueger G.R. and Ablashi D.V. (ed.) Human herpesvirus-6: general virology, epidemiology and clinical pathology, Second Edition, Volume 12, 185-200, 2006. Elsevier, Amsterdam.

Rapp J.C., Krug L.T., Inoue N., Dambaugh T.R., and Pellett P.E. 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.

Razzaque A. Oncogenic potential of human herpesvirus-6 DNA. *Oncogene* 1990, 5: 1365-70.

Re D., Kuppers R., and Diehl V. Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2005a, 23: 6379-86.

Re D., Muschen M., Ahmadi T., Wickenhauser C., Staratschek-Jox A., Holtick U., Diehl V., and Wolf J. Oct-2 and Bob-1 deficiency in Hodgkin and Reed Sternberg cells. *Cancer Res* 2001, 61: 2080-4.

Re D., Thomas R.K., Behringer K., and Diehl V. From Hodgkin disease to Hodgkin lymphoma: biologic insights and therapeutic potential. *Blood* 2005b, 105: 4553-60.

Reddy S., and Manna P. Quantitative detection and differentiation of human herpesvirus 6 subtypes in bone marrow transplant patients by using a single real-time polymerase chain reaction assay. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005, 11: 530-41.

Reisinger J., Rumpler S., Lion T., and Ambros P.F. Visualization of episomal and integrated Epstein-Barr virus DNA by fiber fluorescence in situ hybridization. *Int J Cancer* 2006, 118: 1603-8.

Renne C., Martin-Subero J.I., Eickernjager M., Hansmann M.L., Kuppers R., Siebert R., and Brauning A. Aberrant expression of ID2, a suppressor of B-cell-specific gene expression, in Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol* 2006, 169: 655-64.

Reux I., Fillet A.M., Agut H., Katlama C., Hauw J.J., and LeHoang P. In situ detection of human herpesvirus 6 in retinitis associated with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Ophthalmol* 1992, 114: 375-7.

Rezk S.A., Weiss L.M. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders. *Human Pathol* 2007, 38: 1293-304.

Rivera R., and Murre C. The regulation and function of the Id proteins in lymphocyte development. *Oncogene* 2001, 20: 8308-16.

Robinson W.S. Human herpesvirus 6. *Curr Clin Top Infect Dis* 1994, 14: 159-69.

Roizman B., and Pellett P.E. The family Herpesviridae: a brief introduction, in: Knipe D.M., Hawley P.M. (Ed.) *Fields Virology Fourth Edition, Volume 2*, 2381-97, 2001. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.

Rojo J., Ferrer Argote V.E., Klueppelberg U., Krueger G.R., Eidt E., Ablashi D.V., Luka J., and Tesch H. Semi-quantitative in situ hybridization and immunohistology for antigen expression of human herpesvirus-6 in various lymphoproliferative diseases. *In Vivo* 1994, 8: 517-26.

Rosdahl N., Larsen S.O., and Clemmesen J. Hodgkin's disease in patients with previous infectious mononucleosis: 30 years' experience. *Br Med J* 1974, 2: 253-6.

Rossi C., Delforge M.L., Jacobs F., Wissing M., Pradier O., Rimmelink M., Byl B., Thys J.P., and Liesnard C. Fatal primary infection due to human herpesvirus 6 variant A in a renal transplant recipient. *Transplantation* 2001, 71: 288-92.

Rotola A., Ravaioli T., Gonelli A., Dewhurst S., Cassai E., and 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.

S

Safronetz D., Humar A., and Tipples G.A. Differentiation and quantitation of human herpesviruses 6A, 6B and 7 by real-time PCR. *J Virol Methods* 2003, 112: 99-105.

Said J.W. Immunodeficiency-related Hodgkin lymphoma and its mimics. *Adv Anat Pathol* 2007, 14: 189-94.

Salahuddin S. The discovery of human herpesvirus type 6, in Ablashi D.V., Krueger G.R. and Salahuddin S.Z. (ed.) *Human herpesvirus 6: epidemiology, molecular biology, and clinical pathology*, Volume 4, 3-8, 1992. Elsevier, Amsterdam.

Salahuddin S.Z., Ablashi D.V., Markham P.D., Josephs S.F., Sturzenegger S., Kaplan M., Halligan G., Biberfeld P., Wong-Staal F., Kramarsky B., and et al. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science* 1986, 234: 596-601.

Santoro F., Kennedy P.E., Locatelli G., Malnati M.S., Berger E.A., and Lusso P. CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell* 1999, 99: 817-27.

Sashihara J., Tanaka-Taya K., Tanaka S., Amo K., Miyagawa H., Hosoi G., Taniguchi T., Fukui T., Kasuga N., Aono T., Sako M., Hara J., Yamanishi K., and Okada S. High incidence of human herpesvirus 6 infection with a high viral load in cord blood stem cell transplant recipients. *Blood* 2002, 100: 2005-11.

Schirmer E.C., Wyatt L.S., Yamanishi K., Rodriguez W.J., and Frenkel N. Differentiation between two distinct classes of viruses now classified as human herpesvirus 6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, 88: 5922-6.

Schmidt C.A., Oettle H., Peng R., Binder T., Wilborn F., Huhn D., Siegert W., and Herbst H. Presence of human beta- and gamma-herpes virus DNA in Hodgkin's disease. *Leuk Res* 2000, 24: 865-70.

Schmitz N., Pfistner B., Sextro M., Sieber M., Carella A.M., Haenel M., Boissevain F., Zschaber R., Muller P., Kirchner H., Lohri A., Decker S., Koch B., Hasenclever D., Goldstone A.H., and Diehl V. Aggressive conventional chemotherapy compared with high-dose chemotherapy with autologous haemopoietic stem-cell transplantation for relapsed chemosensitive Hodgkin's disease: a randomised trial. *Lancet* 2002, 359: 2065-71.

Schwering I., Brauninger A., Klein U., Jungnickel B., Tinguely M., Diehl V., Hansmann M.L., Dalla-Favera R., Rajewsky K., and Kuppers R. Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 2003, 101: 1505-12.

Secchiero P., Zella D., Crowley R.W., Gallo R.C., and Lusso P. Quantitative PCR for human herpesviruses 6 and 7. *J Clin Microbiol* 1995, 33: 2124-30.

Shanavas K.R., Kala V., Vasudevan D.M., Vijayakumar T., and Yadav M. Anti-HHV-6 antibodies in normal population and in cancer patients in India. *J Exp Pathol* 1992, 6: 95-105.

Shiramizu B., Chang C.W., and Cairo M.S. Absence of human herpesvirus-6 genome by polymerase chain reaction in children with Hodgkin disease: a Children's Cancer Group Lymphoma Biology Study. *J Pediatr Hematol Oncol* 2001, 23: 282-5.

Simmons A., Demmrich Y., La Vista A., and Smith K. Replication of human herpesvirus 6 in epithelial cells in vitro. *J Infect Dis* 1992, 166: 202-5.

Singh N., and Carrigan D.R. Human herpesvirus-6 in transplantation: an emerging pathogen. *Ann Intern Med* 1996, 124: 1065-71.

Singh N., and Paterson D.L. Encephalitis caused by human herpesvirus-6 in transplant recipients: relevance of a novel neurotropic virus. *Transplantation* 2000, 69: 2474-9.

Skinnider B.F., Elia A.J., Gascoyne R.D., Trumper L.H., von Bonin F., Kapp U., Patterson B., Snow B.E., and Mak T.W. Interleukin 13 and interleukin 13 receptor are frequently expressed by Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 2001, 97: 250-5.

Sobue R., Miyazaki H., Okamoto M., Hirano M., Yoshikawa T., Suga S., and Asano Y. Fulminant hepatitis in primary human herpesvirus-6 infection. *N Engl J Med* 1991, 324: 1290.

Stanton R., Fox J.D., Caswell R., Sherratt E., and Wilkinson G.W. Analysis of the human herpesvirus-6 immediate-early 1 protein. *J Gen Virol* 2002, 83: 2811-20.

Stanton R., Wilkinson G.W., and Fox J.D. Analysis of human herpesvirus-6 IE1 sequence variation in clinical samples. *J Med Virol* 2003, 71: 578-84.

Stein H., Hummel M., Marafioti T., Anagnostopoulos I., and Foss H.D. Molecular biology of Hodgkin's disease. *Cancer Surv* 1997, 30: 107-23.

Sternberg C.H. The 'Prickly Pear.' *Science* 1902, 15: 714-715.

Sternberg C.H. Über eine eigenartige unter dem bilde der pseudoleukämie verlaufende tuberkolose des lymphatischen apparates. *Zeitschrift für Meilkunde* 1898, 19: 21-90.

Sturtz F.G., Cioffi L., Wittmer S., Sonk M.J., Shafer A., Li Y., Leeper N.J., Smith-Gbur J., Shulok J., and Platika D. Tetracycline-regulatable expression vectors tightly regulate in vitro gene expression of secreted proteins. *Gene* 1998, 221: 279-85.

Suga S., Yoshikawa T., Kajita Y., Ozaki T., and Asano Y. Prospective study of persistence and excretion of human herpesvirus-6 in patients with exanthem subitum and their parents. *Pediatrics* 1998, 102: 900-4.

Sumiyoshi Y., Kikuchi M., Ohshima K., Takeshita M., Eizuru Y., and Minamishima Y. Analysis of human herpes virus-6 genomes in lymphoid malignancy in Japan. *J Clin Pathol* 1993, 46: 1137-8.

Sumiyoshi Y., Kikuchi M., Ohshima K., Takeshita M., Eizuru Y., and Minamishima Y. A case of human herpesvirus-6 lymphadenitis with infectious mononucleosis-like syndrome. *Pathol Int* 1995, 45: 947-51.

Surosky R.T., Urabe M., Godwin S.G., McQuiston S.A., Kurtzman G.J., Ozawa K., and Natsoulis G. Adeno-associated virus Rep proteins target DNA sequences to a unique locus in the human genome. *J Virol* 1997, 71: 7951-9.

T

Taylor P.B., Saikia T.K., Advani S.H., and Mukhopadhyaya R. Activation of HHV-6 in lymphoproliferative disorders: a polymerase chain reaction-based study. *Ann N Y Acad Sci* 2004, 1022: 282-5.

Takahashi K., Sonoda S., Higashi K., Kondo T., Takahashi H., Takahashi M., and Yamanishi K. Predominant CD4 T-lymphocyte tropism of human herpesvirus 6-related virus. *J Virol* 1989, 63: 3161-3.

Takemoto M., Mori Y., Ueda K., Kondo K., and Yamanishi K. Productive human herpesvirus 6 infection causes aberrant accumulation of p53 and prevents apoptosis. *J Gen Virol* 2004, 85: 869-79.

Tamagawa-Mineoka R., Katoh N., Nara T., Nishimura Y., Yamamoto S., and Kishimoto S. DRESS syndrome caused by teicoplanin and vancomycin, associated with reactivation of human herpesvirus-6. *Int J Dermatol* 2007, 46: 654-5.

Tanaka-Taya K., Sashihara J., Kurahashi H., Amo K., Miyagawa H., Kondo K., Okada S., and Yamanishi K. 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.

Taniguchi T., Shimamoto T., Isegawa Y., Kondo K., and 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.

Teofili L., Di Febo A.L., Pierconti F., Maggiano N., Bendandi M., Rutella S., Cingolani A., Di Renzo N., Musto P., Pileri S., Leone G., and Larocca L.M. Expression of the c-met proto-oncogene and its ligand, hepatocyte growth factor, in Hodgkin disease. *Blood* 2001, 97: 1063-9.

Thorley-Lawson D.A. EBV the prototypical human tumor virus-just how bad is it? *J Allergy Clin Immunol* 2005, 116: 251-61.

Thomas R.K., Kallenborn A., Wickenhauser C., Schultze J.L., Draube A., Vockerodt M., Re D., Diehl V., and Wolf J. Constitutive expression of c-FLIP in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Am J Pathol* 2002, 160: 1521-8.

Thomas R.K., Re D., Wolf J., and Diehl V. Part I: Hodgkin's lymphoma--molecular biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Lancet Oncol* 2004, 5: 11-8.

Thompson M.P., and Kurzrock R. Epstein-Barr virus and cancer. *Clin Cancer Res* 2004, 10: 803-21.

Thomson B.J., Dewhurst S., and 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.

Thomson B.J., Efstathiou S., and Honess R.W. Acquisition of the human adeno-associated virus type-2 rep gene by human herpesvirus type-6. *Nature* 1991, 351: 78-80.

Thornburg N.J., Kulwichit W., Edwards R.H., Shair K.H., Bendt K.M., and Raab-Traub N. LMP1 signaling and activation of NF-kappaB in LMP1 transgenic mice. *Oncogene* 2006, 25: 288-97.

Tohyama M., Hashimoto K., Yasukawa M., Kimura H., Horikawa T., Nakajima K., Urano Y., Matsumoto K., Iijima M., and Shear N.H. Association of human herpesvirus 6 reactivation with the flaring and severity of drug-induced hypersensitivity syndrome. *Br J Dermatol* 2007, 157: 934-40.

Torelli G., Barozzi P., Marasca R., Cocconcilli P., Merelli E., Ceccherini-Nelli L., Ferrari S., and Luppi M. 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.

Torelli G., Marasca R., Luppi M., Selleri L., Ferrari S., Narni F., Mariano M.T., Federico M., Ceccherini-Nelli L., Bendinelli M., and et al. Human herpesvirus-6 in human lymphomas: identification of specific sequences in Hodgkin's lymphoma by polymerase chain reaction. *Blood* 1991, 77: 2251-8.

Torelli G., Marasca R., Montorsi M., Luppi M., Barozzi P., Ceccherini L., Batoni G., Bendinelli M., and Muyombano A. Human herpesvirus 6 in non-AIDS related Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia* 1992, 6 Suppl 3: 46S-48S.

Torre D., Mancuso R., and Ferrante P. Pathogenic mechanisms of meningitis/encephalitis caused by human herpesvirus-6 in immunocompetent adult patients. *Clin Infect Dis* 2005, 41: 422-3.

Tsang R.W., Hodgson D.C., and Crump M. Hodgkin's lymphoma. *Curr Probl Cancer* 2006, 30: 107-58.

Tsai H.K., and Mauch P.M. Nodular Lymphocyte-Predominant Hodgkin Lymphoma. *Semin Radiat Oncol* 2007, 17: 184-9.

U

Uchida J., Yasui T., Takaoka-Shichijo Y., Muraoka M., Kulwichit W., Raab-Traub N., and Kikutani H. Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science* 1999, 286: 300-3.

V

Valente G., Secchiero P., Lusso P., Abete M.C., Jemma C., Reato G., Kerim S., Gallo R.C., and Palestro G. Human herpesvirus 6 and Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease: a controlled study by polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Am J Pathol* 1996, 149: 1501-10.

Van den Berg A., Visser L., and Poppema S. High expression of the CC chemokine TARC in Reed-Sternberg cells. A possible explanation for the characteristic T-cell infiltrate in Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol* 1999, 154: 1685-91.

Van Loon N.M., Gummuluru S., Sherwood D.J., Marentes R., Hall C.B., and 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.

Virtanen J.O., Farkkila M., Multanen J., Uotila L., Jaaskelainen A.J., Vaheri A., and Koskiniemi M. Evidence for human herpesvirus 6 variant A antibodies in multiple sclerosis: diagnostic and therapeutic implications. *J Neurovirol* 2007, 13: 347-52.

W

Wagner M., Rose V.A., Linder R., Schulze H.J., and Krueger G.R. Human pathogenic virus-associated pseudolymphomas and lymphomas with primary cutaneous manifestation in humans and animals. *Clin Infect Dis* 1998, 27: 1299-308.

Wahlfors J., and Morgan R.A. Semliki Forest virus vectors for gene transfer. *Methods Mol Med* 2003, 76: 493-502.

Wang D., Liebowitz D., and Kieff E. An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* 1985, 43: 831-40.

Ward K.N., and Gray J.J. Primary human herpesvirus-6 infection is frequently overlooked as a cause of febrile fits in young children. *J Med Virol* 1994, 42: 119-23.

Weiss L.M., Chan J.K.C., MacLennan K., and Warnke R.A. In: Mauch P.M., Armitage J.O., Diehl V., Hoppe R.T., and Weiss L.M. (ed.) *Hodgkin's disease*, 101-120, 1999. Lippencott Williams and Wilkins, Philadelphia.

Weiss L.M., Chen Y.Y., Liu X.F., and Shibata D. Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease. A correlative in situ hybridization and polymerase chain reaction study. *Am J Pathol* 1991, 139: 1259-65.

Weiss L.M., Movahed L.A., Warnke R.A., and Sklar J. Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1989, 320: 502-6.

Wiens G.D., Heldwein K.A., Stenzel-Poore M.P., and Rittenberg M.B. Somatic mutation in VH complementarity-determining region 2 and framework region 2: differential effects on antigen binding and Ig secretion. *J Immunol* 1997, 159: 1293-302.

Williams H., and Crawford D.H. Epstein-Barr virus: the impact of scientific advances on clinical practice. *Blood* 2006, 107: 862-9.

Wlodarska I., Nooyen P., Maes B., Martin-Subero J.I., Siebert R., Pauwels P., De Wolf-Peters C., and Hagemeyer A. Frequent occurrence of BCL6 rearrangements in nodular lymphocyte predominance Hodgkin lymphoma but not in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2003, 101: 706-10.

Wolf J., Kapp U., Bohlen H., Kornacker M., Schoch C., Stahl B., Mucke S., von Kalle C., Fonatsch C., Schaefer H.E., Hansmann M.L., and Diehl V. Peripheral blood mononuclear cells of a patient with advanced Hodgkin's lymphoma give rise to permanently growing Hodgkin-Reed Sternberg cells. *Blood* 1996, 87: 3418-28.

Wu T.C., Mann R.B., Charache P., Hayward S.D., Staal S., Lambe B.C., and Ambinder R.F. Detection of EBV gene expression in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Int J Cancer* 1990, 46: 801-4.

Wu Z., Mu G., and Wang L. Seroprevalence of human herpesvirus-6 in healthy population in two provinces of north China. *Chin Med Sci J* 1997, 12: 111-4.

Yamanishi K. Human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7, in: Knipe D.M., Hawley P.M. (ed.) *Fields Virology Fourth Edition Volume 2*, 2785-801, 2001. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.

Yamanishi K., Okuno T., Shiraki K., Takahashi M., Kondo T., Asano Y., and Kurata T. Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet* 1988, 1: 1065-7.

Yasukawa M., Inoue Y., Ohminami H., Terada K., and Fujita S. Apoptosis of CD4+ T lymphocytes in human herpesvirus-6 infection. *J Gen Virol* 1998, 79: 143-7.

Yoshida M., Uno F., Bai Z.L., Yamada M., Nii S., Sata T., Kurata T., Yamanishi K., and Takahashi M. Electron microscopic study of a herpes-type virus isolated from an infant with exanthem subitum. *Microbiol Immunol* 1989, 33: 147-54.

Yoshikawa T., and Asano Y. Central nervous system complications in human herpesvirus-6 infection. *Brain Dev* 2000, 22: 307-14.

Younes A., and Carbone A. Clinicopathologic and molecular features of Hodgkin's lymphoma. *Cancer Biol Ther* 2003, 2: 500-7.

Young G.A., and Iland H.J. Clinical perspectives in lymphoma. *Int Med J* 2007, 37: 478-84.

Young L.S., Dawson C.W., and Eliopoulos A.G. The expression and function of Epstein-Barr virus encoded latent genes. *Mol Pathol* 2000, 53: 238-47.

Young L.S., and Murray P.G. Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene* 2003, 22: 5108-21.

Young L.S., and Rickinson A.B. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 2004, 4: 757-68.

Yung L., and Linch D. Hodgkin's lymphoma. *Lancet* 2003, 361: 943-51.

Z

Zerr D.M. Human herpesvirus 6: a clinical update. *Herpes* 2006, 13: 20-4.

Zhao J., Fan H., Mu G., Shen X., and 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.

Zheng B., Fiumara P., Li Y.V., Georgakis G., Snell V., Younes M., Vauthey J.N., Carbone A., and Younes A. MEK/ERK pathway is aberrantly active in Hodgkin disease: a signaling pathway shared by CD30, CD40, and RANK that regulates cell proliferation and survival. *Blood* 2003, 102: 1019-27.

Zhou Y., Chang C.K., Qian G., Chandran B., and Wood C. Trans-activation of the HIV promoter by a cDNA and its genomic clones of human herpesvirus-6. *Virology* 1994, 199: 311-22.

Annexe : HHV-6 and the Lympho-Hematopoietic System

HHV-6 and the Lympho-Hematopoietic System

Ranger-Rogez, S.^a, Lacroix, A.^a, Denis, F.^a, Bordessoule, D.^b

^a Department of Virology, Equipe d'accueil EA 4021, Dupuytren University Teaching Hospital, 87042 Limoges, France

^b Department of Haematology, Dupuytren Hospital, 87042 Limoges, France

[http://dx.doi.org/10.1016/S0168-7069\(06\)12014-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-7069(06)12014-5)

**Etude de la localisation de l'herpèsvirus humain de type 6 (HHV-6)
dans les tissus hodgkiniens : recherche de l'expression de l'oncogène viral DR7 et de
ses conséquences pour la cellule**

RESUME

L'herpèsvirus humain de type 6 (HHV-6) au caractère lymphotropique présente deux variants A et B, ce dernier étant associé au lymphome de Hodgkin (LH). Toutefois, cette association est controversée dans la littérature car elle est présente dans de rares cas et absente dans la cellule caractéristique du LH : la cellule de Reed-Sternberg (RS). Lors du premier objectif de notre travail de thèse, la PCR quantitative a démontré l'existence et a quantifié le virus HHV-6 au sein d'une cohorte de patients atteints de LH; ceci de façon concomitante ou non au virus d'Epstein et Barr (EBV) connu pour être associé à cette pathologie. Par la suite, l'anticorps anti-DR7B de l'HHV-6 produit par nos soins a permis de connaître la localisation cellulaire du virus HHV-6 et ainsi de détecter sa présence en grande quantité dans la cellule RS pour 73,7% des patients atteints de LH seulement positifs pour l'HHV-6. En outre, un double marquage chez les patients de la cohorte positifs pour les deux herpèsvirus a démontré la colocalisation, notamment au niveau de la cellule RS, des oncoprotéines DR7B du virus HHV-6 et LMP1 du virus EBV signifiant une probable interaction virale. Enfin, un système de transfection stable permettant de moduler l'expression de DR7B au sein de cellules B matures proches des cellules RS a été réalisé. Il a permis d'observer l'induction, en présence de DR7B, de la surexpression tant au niveau transcriptionnel que traductionnel, comme au sein des cellules RS du LH, de Id2 qui est un inhibiteur de E2A, facteur de transcription impliqué dans la reprogrammation phénotypique des cellules RS.

Mots-clés : HHV-6, lymphome de Hodgkin, cellule de Reed-Sternberg, oncoprotéine DR7B, Id2 inhibiteur de E2A.

**Localization of human herpesvirus type 6 (HHV-6)
in Hodgkin's tissues: DR7 viral oncogene expression
and its consequences for the cell**

ABSTRACT

There are two variants, A and B, of human lymphotropic herpesvirus type 6 (HHV-6). The B variant is associated with Hodgkin's lymphoma (HL). However this association is controversial in the literature because it only exists in rare cases and not in Reed-Sternberg cells (RS), the characteristic cells of HL. In the first part of our study quantitative PCR demonstrated the existence of HHV-6 alone or concomitantly with Epstein-Barr virus, known to be associated with HL, in a cohort of HL patients. We then used an anti-HHV-6 DR7B antibody produced in our laboratory to determine the cellular localization of HHV-6 and to detect its presence in large quantities in RS cells from 73.7% of HL patients positive only for HHV-6. Furthermore, double labeling studies in patients from the cohort positive for both herpesviruses demonstrated the colocalization, notably in RS cells, of DR7B from HHV-6 and LMP1 from EBV oncoproteins, indicating a probable viral interaction. Finally, a stable transfection system was realised to adjust DR7B expression in mature B cells which are close to RS cells. In the presence of DR7B, a transcriptional and translational expression of Id2, an inhibitor of E2A which is a transcription factor implicated in phenotypical reprogramming of RS cells, similar to RS cells in HL, was observed.

Key-words: HHV-6, Hodgkin's lymphoma, Reed-Sternberg cell, DR7B oncoprotein, Id2 inhibitor of E2A.