



**Université Lille 2**  
**Droit et Santé**

UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE - LILLE 2  
**FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG**

Année 2012

**THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT**  
**DE DOCTEUR EN MEDECINE**

**Impact de la réactivation précoce de l'herpèsvirus 6 après allogreffe de  
cellules souches hématopoïétiques**

**Présentée et soutenue publiquement le 15 octobre 2012**  
**Par Rémy DULERY**

**Jury**

**Président : Monsieur le Professeur Jean-Pierre JOUET**

**Assesseurs : Monsieur le Professeur Francis BAUTERS**  
**Madame le Docteur Anny DEWILDE**  
**Madame le Docteur Valérie COITEUX**

**Directeur de Thèse : Monsieur le Professeur Ibrahim YAKOUB-AGHA**

# SOMMAIRE

<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>p.13</b>
<b>RESUME.....</b>	<b>p.15</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>p.17</b>
<b>1. Allogreffe de cellules souches périphériques.....</b>	<b>p.17</b>
1.1 Généralités.....	p.17
1.2. Principales indications.....	p.19
1.3. Choix du donneur .....	p.21
1.4. Sources de cellules souches hématopoïétiques.....	p.22
1.5. Conditionnement de greffe.....	p.24
1.6. Complications immunologiques.....	p.25
1.6.1 Rejet de greffe ou non prise de greffe.....	p.25
1.6.2 Réaction du greffon contre l'hôte (GVH).....	p.26
1.6.2.1 GVH aiguë.....	p.26
1.6.2.1.1 Manifestations cliniques et facteurs de risque.....	p.26
1.6.2.1.2 Physiopathologie.....	p.28
1.6.2.1.3 Prophylaxie et traitement curatif de la GVH aiguë.....	p.30
1.6.2.2 GVH chronique.....	p.31
1.6.3 Déficit immunitaire.....	p.33
1.7. Complications infectieuses.....	p.34
<b>2. Herpèsvirus humain 6.....</b>	<b>p.37</b>
2.1. Structure du virus.....	p.37
2.2. Cycle d'infection, réplication et mécanisme de latence.....	p.38

2.3. Epidémiologie et mode de transmission.....	p.39
2.4. Techniques de détection.....	p.40
2.5. Manifestations cliniques.....	p.42
<b>OBJECTIFS DE L'ETUDE.....</b>	<b>p.43</b>
<b>PATIENTS ET METHODES.....</b>	<b>p.44</b>
1. Patients et modalités de la greffe.....	p.44
2. Prélèvements .....	p.48
3. Détection de l'ADN de l'HHV6 par PCR quantitative en temps réel.....	p.49
4. Définitions.....	p.50
5. Analyse statistique.....	p.52
<b>RESULTATS.....</b>	<b>p.54</b>
1. Réactivation de l'HHV6 dans les 100 premiers jours post-greffe.....	p.54
2. Symptômes présents au moment de la réactivation.....	p.54
3. Réponse au traitement antiviral.....	p.56
4. Devenir des patients et prise de greffe.....	p.57
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>p.63</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>p.72</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>p.73</b>
<b>ANNEXE.....</b>	<b>p.74</b>

# LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

CMSP : Cellules mononucléées du sang périphérique

CPA : Cellules présentatrices d'antigènes

CSH : Cellules souches hématopoïétiques

CSP : Cellules souches périphériques

CMV : Cytomégalovirus

EBMT: European Group for Blood and Marrow Transplantation

EBV : Virus d'Epstein-Barr

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique

EFS : Event-free survival, survie sans événement

EIQ : Ecart interquartile

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay, dosage d'immunoabsorption par enzyme liée

G-CSF: Granulocyte colony-stimulating factor

GVH : Graft-versus-host, réaction du greffon contre l'hôte

HHV6: Human Herpesvirus 6, herpèsvirus humain 6

HLA : Human leukocyte antigen

IC 95% : Intervalle de confiance à 95%

ICT : Irradiation corporelle totale

J-1 : Veille de la greffe

Jx : x jours après la greffe

MA : Myéloablatif

MO : Moelle osseuse

NMA : Non myéloablatif

NRM : Non-relapse mortality, mortalité sans rechute

OS: Overall survival, survie globale

PAMP: Pathogen associated molecular patterns

PNN : Polynucléaires neutrophiles

RR : Risque relatif

SAL : Sérum anti-lymphocytaire, thymoglobuline

SP : Sang placentaire

## RESUME

**Contexte :** L'herpèsvirus humain 6 (HHV6) infecte plus de 95% de la population et sa réactivation peut être symptomatique, particulièrement chez les patients immunodéprimés. Néanmoins, peu d'études se sont intéressées à l'impact clinique de sa réactivation après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH).

**Méthodes :** Une étude rétrospective a été réalisée chez les patients traités par allogreffe de CSH au CHRU de Lille entre 2004 et 2009. La détection du virus a été effectuée par PCR quantitative hebdomadaire pendant la période d'aplasie, puis en fonction des signes cliniques.

**Résultats :** Sur les 235 patients analysés, 112 (48%) ont présenté une réactivation de l'HHV6 dans les cent premiers jours après la greffe (groupe A) et 123 n'ont pas eu de PCR HHV6 positive pendant cette période (groupe B). La réactivation de l'HHV6 a été moins fréquente chez les patients recevant un conditionnement non myéloablatif ( $p=0,028$ ). Dans le groupe A, seulement 6 patients (5%) sont restés asymptomatiques pendant la réactivation, alors qu'il a été observé de la fièvre ( $n=60$ ), une éruption cutanée ( $n=57$ ), une diarrhée ( $n=51$ ), des complications pulmonaires ( $n=19$ ) et/ou des troubles neurologiques ( $n=12$ ) chez les autres. Les patients du groupe A ont eu un retard dans la prise de greffe des plaquettes ( $p<0,001$ ) et ont développé une réaction aiguë du greffon contre l'hôte (GVH) de grade II à IV plus souvent que ceux du groupe B (respectivement 47% et 30% des patients,  $p=0,009$ ). En analyse multivariée, les principaux facteurs associés à la GVH aiguë de grade II à IV sont la réactivation précoce de l'HHV6 [RR=1,59; IC 95% : 1,04 – 2,43] ( $p=0,03$ ) et un donneur non-apparenté [RR=2,5; IC 95%: 1,59 – 3,91] ( $p<0,001$ ). Par ailleurs, la survie globale à 6 mois des patients du groupe A est inférieure à celle des patients du groupe B [RR=2,1; IC

95%: 1,05 – 4,03] ( $p=0,04$ ). Sur les 38 patients évaluable traités par un traitement antiviral, 34 ont eu une diminution significative de leur charge virale et une régression complète de la symptomatologie. De plus, la durée de réactivation a été plus courte chez les patients recevant un traitement antiviral que chez les autres (respectivement 50 jours contre 72 jours,  $p=0,04$ ).

**Conclusion :** La réactivation de l'HHV6 est associée à un retard dans la prise de greffe des plaquettes, au développement de la GVH aiguë, et à une augmentation de la mortalité précoce après allogreffe de CSH. Une surveillance de la PCR HHV6 paraît nécessaire dans les premiers mois après la greffe, particulièrement en cas de tableau clinique atypique pour une GVH aiguë.

# INTRODUCTION

## 1. Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

### 1.1 Généralités

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est une immunothérapie fondée sur la reconnaissance des cellules tumorales par des cellules immunitaires allogéniques, c'est-à-dire étrangères au patient porteur de la maladie. Elle demeure le seul traitement curatif d'un certain nombre d'hémopathies malignes mais également de pathologies déficitaires de la moelle osseuse ou du système immunitaire (aplasies médullaires, déficits immunitaires congénitaux, hémoglobinopathies). Elle a pour but de remplacer une moelle osseuse malade par une moelle osseuse saine et fonctionnelle et, dans le cas des hémopathies malignes, d'éradiquer le clone responsable de la maladie (1).

Sa réalisation implique une triade constituée par :

- Un receveur : le malade ;
- Un donneur : une personne volontaire, saine, et compatible avec le receveur au niveau du système des antigènes majeurs d'histocompatibilité HLA (de l'anglais, human leukocyte antigen) ;
- Un greffon : la source des CSH, prélevée chez le donneur.

L'allogreffe de CSH débute par l'administration d'un conditionnement au patient, qui permet d'induire l'immunosuppression nécessaire à la prise du greffon et à la prévention du rejet de greffe. Il détruit également les cellules hématopoïétiques de l'hôte, contribuant ainsi à éliminer l'éventuel clone malin. Il induit ainsi une période d'aplasie pendant laquelle le

patient est hospitalisé dans un secteur protégé afin de limiter les risques infectieux (par définition le taux de polynucléaires neutrophiles est alors inférieur à  $500/\text{mm}^3$ ) et de pallier l'insuffisance médullaire en ayant recours, si nécessaire, à des transfusions de concentrés érythrocytaires ou plaquettaires. Sa durée varie principalement en fonction de l'intensité du conditionnement et de la richesse du greffon en CSH, mais aussi de la survenue de possibles complications infectieuses ou immunologiques (1).

Le greffon est injecté au patient par simple transfusion au terme du conditionnement. Il contient des lymphocytes du donneur potentiellement capables de reconnaître et détruire les cellules clonales malignes du patient (effet du greffon contre la leucémie). Plus encore que par l'action du conditionnement, c'est grâce à ce mécanisme que l'allogreffe peut permettre de guérir des hémopathies malignes réfractaires. Néanmoins, les lymphocytes du donneur peuvent aussi induire des réactions immunologiques délétères en raison des différences d'histocompatibilité entre le donneur et le receveur (2). Leur activation peut conduire à une réaction du greffon contre l'hôte (en anglais, graft-versus-host disease, GVH) et provoquer des lésions de certains organes cibles, parfois mortelles. Celle-ci peut se développer de manière aiguë (en général, dans les cent premiers jours après la greffe) ou chronique.

L'allogreffe de CSH s'accompagne encore aujourd'hui d'une lourde morbidité et d'une mortalité liée à la toxicité de la procédure (3), que ce soit en raison du conditionnement, de la GVH ou du déficit immunitaire induit. Ce dernier favorise la survenue d'infections bactériennes, virales, fongiques ou parasitaires qui peuvent en elles-mêmes créer des lésions tissulaires qui facilitent le développement de la GVH (2). La gravité de ces complications et leur incidence dépendent d'une multitude de paramètres liés à la fois au receveur (âge, état général, comorbidités, statut hématologique), au donneur (compatibilité HLA avec le receveur, sexe, antécédents infectieux), aux caractéristiques du greffon (source des CSH, richesse cellulaire, manipulation), et aux modalités de la procédure (type de conditionnement,

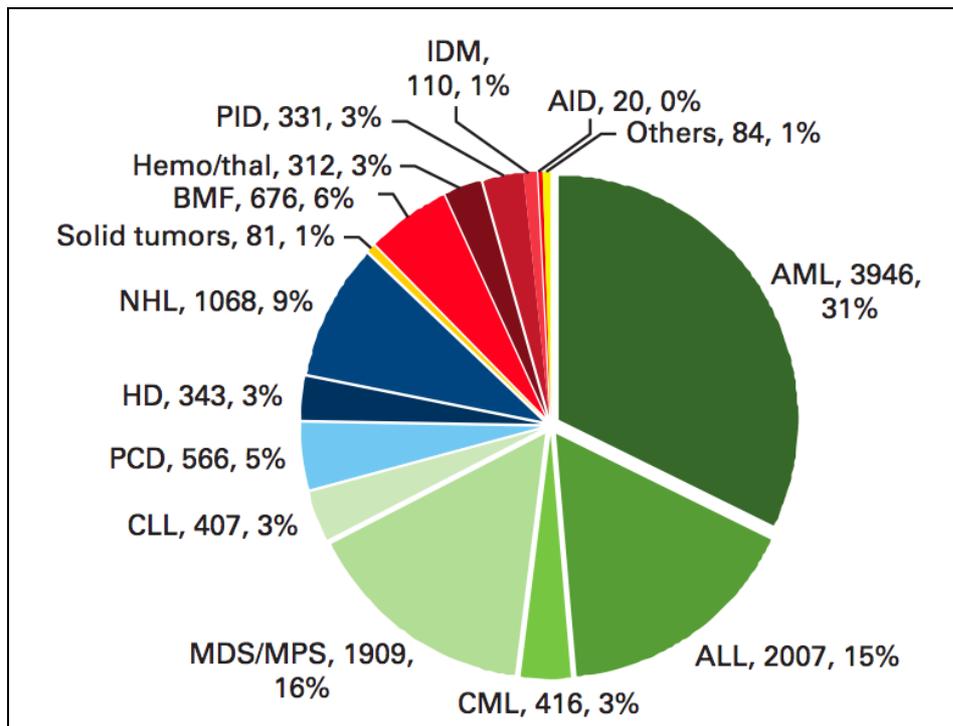
prophylaxie de la GVH, dépistage et prise en charge des infections, soins de support...).

L'enjeu pour le médecin greffeur et son équipe est donc de réussir à limiter la toxicité du traitement sans nuire à son efficacité. Depuis la première allogreffe de moelle osseuse chez l'homme en 1957 par Thomas ED et al. (4), le développement de nouvelles techniques et procédures de greffe a permis d'augmenter constamment la survie des patients et d'étendre l'indication de l'allogreffe. C'est par une meilleure compréhension des mécanismes qui entrent en jeu que des progrès ont pu être réalisés que ce soit en termes de morbidité ou de mortalité.

## **1.2. Principales indications**

Les hémopathies malignes représentent la principale indication de l'allogreffe de CSH. D'après le rapport d'activité de l'EBMT (European Group for Blood and Marrow Transplantation) (5), 13 345 greffes allogéniques ont été réalisées en Europe en 2010 dont 8 685 (71%) pour des leucémies (5953 pour des leucémies aiguës), 1 977 (16%) pour des syndromes lymphoprolifératifs, et 81 (<1%) pour des tumeurs solides. Parmi les causes non malignes, les hémopathies représentent 988 (9%) des allogreffes (aplasie médullaire : 6%, hémoglobinopathies 3%), les déficits immunitaires 331 (3%), les désordres métaboliques 110 (1%) et les maladies auto-immunes 20 (<1%) (Figure 1).

**Figure 1. Répartition par pathologie des allogreffes de cellules souches hématopoïétiques effectuées en Europe en 2010 selon le registre de l'EBMT (5).**



*Abréviations et légende :* Les leucémies sont représentées en vert (AML : leucémie aiguë myéloïde ; ALL : leucémie aiguë lymphoïde ; CML : leucémie myéloïde chronique ; MDS/MPS : syndromes myélodysplasiques/myéloprolifératifs ; CLL : leucémie lymphoïde chronique), les syndromes lymphoprolifératifs en bleu (PCD : dyscrasies plasmocytaires ; HD : maladie de Hodgkin ; NHL : lymphome non hodgkinien), les tumeurs solides en orange, les pathologies non malignes en rouge (BMF : aplasies médullaires ; Hemo/thal : hémoglobinopathies ; PID : déficits immunitaires ; IDM : désordres métaboliques ; AID : maladies auto-immunes) et les autres causes en jaune.

Cependant, l'indication de l'allogreffe de CSH reste difficile à établir en raison des risques liés à la procédure. Il faut pour chaque patient évaluer et mettre en balance les risques encourus avec la greffe (mortalité sans rechute, NRM – non-relapse mortality – morbidité, et qualité de vie) et ceux liés à l'évolution naturelle de la maladie (rechute, qualité de vie espérée). Cela nécessite d'analyser les différents paramètres pronostiques et d'identifier les facteurs de risques péjoratifs en fonction des caractéristiques de la triade receveur – donneur - greffon. Certains sont classiques comme l'âge, le statut de la maladie avant la greffe, ou l'existence de comorbidités (6); d'autres émergent comme l'analyse du caryotype ou de la maladie résiduelle en biologie moléculaire. Enfin, du fait des progrès constants en

hématologie et de l'apparition de nouvelles molécules dans la prise en charge des hémopathies, une des réflexions porte aussi sur l'identification des sous-populations que l'on pourrait exclure *a priori* du champ de réalisation de la greffe allogénique (« patients de bon pronostic ») (7).

### **1.3. Choix du donneur**

Un donneur de CSH est considéré compatible avec le receveur s'ils sont HLA identiques pour les loci A, B, C, DRB1 et DQB1. Lorsqu'une allogreffe est envisagée, un typage HLA est donc réalisé chez le patient par méthode sérologique ou en biologie moléculaire pour les antigènes HLA de classe I (A, B et C) et en biologie moléculaire pour les antigènes de classe II (DR, DP et DQ) (8,9). En première intention, on recherche un donneur familial géno-identique dans la fratrie, sachant que la probabilité qu'il soit compatible est de  $\frac{1}{4}$ . En l'absence de donneur familial, une interrogation des registres est effectuée afin de trouver un donneur non-apparenté ayant une phéno-identité HLA de  $10/10^{\text{ème}}$ , voire de  $9/10^{\text{ème}}$  en cas d'hémopathies de pronostic très sévère (10,11). Classiquement, les greffes réalisées à partir d'un donneur non-apparenté présentent un risque supérieur de GVH et de rejet de greffe (2). Les résultats en termes d'efficacité et de complications des greffes à partir de donneurs non-apparentés  $10/10^{\text{ème}}$  parfaitement appariés sont toutefois similaires à ceux observés à partir de donneurs familiaux pour les hémopathies malignes à risque standard (12). De plus, le nombre de donneurs accessibles grâce aux fichiers internationaux augmentant (16 millions de donneurs inscrits en 2012), la proportion d'allogreffes non-apparentées a progressé chaque année jusqu'à dépasser celles des allogreffes familiales (5).

D'autres paramètres que le degré de compatibilité HLA peuvent par ailleurs influencer sur le déroulement de la greffe comme le sexe du donneur (le risque de GVH serait supérieur en cas de donneur de sexe féminin pour un receveur de sexe masculin) (13) ou son statut pour le cytomégalovirus (qui peut favoriser ou non la réactivation de ce virus en post-greffe) (14). Ces critères de choix restent cependant secondaires et n'interviennent que dans les rares cas où il existe plusieurs donneurs compatibles (le problème reste bien trop souvent qu'il n'y a aucun donneur).

Enfin, rappelons que pour devenir donneur de CSH il faut en premier lieu être volontaire, mais aussi être en bonne santé et ne présenter aucune contre-indication au prélèvement. Des procédures strictes et obligatoires existent afin que le donneur reste sain.

#### **1.4. Sources de cellules souches hématopoïétiques**

Un greffon de CSH peut provenir de trois sources : moelle osseuse, sang périphérique ou sang placentaire. La moelle osseuse (MO) est ponctionnée au niveau des crêtes iliaques postérieures sous anesthésie générale et les cellules souches périphériques (CSP) sont prélevées par cytophérèse après stimulation du donneur par un facteur de croissance hématopoïétique, le G-CSF (Granulocyte colony-stimulating factor). Le choix entre les deux types de prélèvement est laissé au donneur, en l'absence de contre-indication à l'une ou l'autre de ces deux méthodes.

Plusieurs études prospectives randomisées ont comparé l'utilisation de moelle osseuse à celle des CSP dans les conditionnements myéloablatifs (15–18). Elles s'accordent toutes pour conclure à une reconstitution hématopoïétique plus précoce avec les CSP (raccourcissant ainsi la durée d'aplasie). Leurs impacts respectifs sur la GVH, la survie ou la rechute restent

cependant moins bien définis en raison d'un nombre de patients inclus trop limité dans chaque étude. Selon une méta-analyse (19), il semblerait que les CSP :

- n'aient pas d'impact significatif sur le risque de GVH aiguë,
- augmentent le risque de survenue d'une GVH chronique,
- diminuent le risque de rechute chez les patients à haut risque, mais pas dans les hémopathies à risque standard.

Compte tenu des conséquences de la GVH chronique sur la qualité de vie des patients, cette étude inciterait à privilégier les greffons issus de MO chez les patients à risque standard.

Si aucun donneur n'est identifié, il est désormais possible de faire appel à une banque de sang placentaire (SP) (10). Dans ce type de greffe, on admet une certaine incompatibilité HLA étant donné le degré d'immaturation des cellules utilisées. La majorité des greffes sont réalisées avec une incompatibilité 4/6<sup>ème</sup> (seuls les loci HLA A, B et DRB1 sont pris en compte), avec néanmoins de meilleurs résultats si l'appariement est de 5/6<sup>ème</sup>, ou, fait plus rare, 6/6<sup>ème</sup> (20–22). Le risque de rejet est plus élevé, la reconstitution immunitaire plus lente et les infections sont plus fréquentes avec ce type de greffon, et dépendent du nombre de cellules nucléées injectées, et plus spécifiquement des cellules CD34<sup>+</sup> (23–25). L'incidence de la GVH aiguë serait moins importante, et les données se rapportant à la survie restent discordantes (23,26,27). Certains auteurs montrent toutefois des résultats similaires en comparant les greffes de cellules souches médullaires à partir d'un donneur non-apparenté avec les greffes de SP chez des patients atteints de leucémie aiguë (28).

Afin d'améliorer la prise de greffe et de limiter la mortalité précoce, des greffes avec deux unités de SP de donneurs différents sont réalisées avec des résultats encourageants (29,30). Si des études sont encore en cours afin de mieux déterminer les indications et les conséquences

de l'utilisation d'une ou deux unités de sang placentaire, cette source de cellules souches est de plus en plus utilisée et a permis d'étendre les indications de greffe (5).

### **1.5. Conditionnement de greffe**

Le conditionnement joue un rôle important dans l'allogreffe de CSH puisqu'il permet d'assurer l'immunosuppression nécessaire à la prise de greffe. Il peut également détruire, en fonction de son intensité et des drogues utilisées, les éventuelles cellules malignes du receveur. Initialement, les premiers conditionnements étaient myéloablatifs (MA), entraînant une destruction supposée définitive du tissu hématopoïétique de l'hôte. Ils utilisent classiquement une irradiation corporelle totale (ICT) de 12 grays (Gy) associée à 2 jours de cyclophosphamide à forte dose (60 mg/kg/jour) (31,32). Compte tenu de sa toxicité à long terme et du risque de cancers secondaires (33,34), l'ICT a été remplacée dans certaines pathologies par du busulfan intraveineux, l'indication principale du conditionnement cyclophosphamide – ICT 12 Gy étant désormais la leucémie aiguë lymphoblastique (35,36).

Des conditionnements non myéloablatifs (NMA), à intensité réduite, ont été développés depuis 15 ans à partir du double constat que, d'une part l'effet anti-tumoral de l'allogreffe est essentiellement lié à l'action immunologique du greffon (effet GVL), et que d'autre part la vacuité de la moelle osseuse du receveur n'est pas indispensable à la prise de greffe (37,38). L'objectif est de limiter la toxicité du conditionnement, dont l'incidence augmente avec l'âge et les comorbidités du receveur (6). Depuis la première publication d'un conditionnement NMA par Slavin et al. en 1998 (39), de multiples schémas ont été mis en place (40,41). Ils associent, selon les indications, des immunosuppresseurs (fludarabine, sérum anti-lymphocytaire...) à des chimiothérapies plus ou moins cytoréductrices (melphalan, busulfan,

aracytine...) ou à des faibles doses d'ICT. A ce jour, aucun de ces conditionnements n'a montré sa supériorité par rapport à l'autre. Ils représentent environ 40% des allogreffes réalisées en Europe en 2010 (5), et ont largement contribué à élargir les indications à des pathologies touchant les patients au-delà de la limite d'âge habituelle des conditionnements MA (50-55 ans). Les études rétrospectives semblent toutefois montrer que si la toxicité est moindre dans les greffes à conditionnement NMA, l'incidence de la rechute est probablement supérieure (42-44).

Une troisième alternative, actuellement en cours d'évaluation, consiste à associer le busulfan à la fludarabine pendant 4 jours, et semble avoir l'avantage de proposer un conditionnement d'intensité MA avec une toxicité réduite, du moins à court terme (45,46).

## **1.6. Complications immunologiques**

### **1.6.1 Rejet de greffe ou non prise de greffe**

L'absence de prise de greffe est une complication rare (moins de 2%) après allogreffe de CSH (47). Elle peut être due à un rejet ou à une inhibition de l'hématopoïèse, d'origine toxique ou virale (48,49), par l'action des lymphocytes T du receveur. Un chimérisme mixte, c'est-à-dire la coexistence de CSH issues du donneur et de l'hôte, peut également être observé (50,51). Elle est favorisée par la disparité HLA (52), l'utilisation d'un greffon pauvre en CD34<sup>+</sup> (comme dans les greffes de SP) (53), les conditionnements NMA (54), ou la déplétion en cellules T du greffon (55,56).

Pour prévenir cette complication, différentes techniques sont utilisées telles que l'administration de SAL dans le conditionnement dans le but de détruire les lymphocytes T

résiduels de l'hôte.(57) En cas de rejet ou de perte du greffon, il peut être décidé d'injecter des lymphocytes du donneur ou de réaliser une seconde allogreffe (56).

### **1.6.2 Réaction du greffon contre l'hôte (GVH)**

La GVH résulte de l'interaction entre des antigènes du receveur et les lymphocytes T matures du greffon. Elle constitue un des principaux obstacles à la réalisation d'une allogreffe de CSH : elle en est la complication la plus fréquente et demeure la première cause de mortalité en post-greffe en raison des conséquences directes de cette réaction, mais surtout à cause des complications infectieuses qu'elle entraîne. Ces dernières sont favorisées par la GVH elle-même (58) et par l'action immunosuppressive des traitements nécessaires pour traiter la GVH. Elle peut se présenter sous deux formes : la GVH aiguë, qui apparaît classiquement avant le 100<sup>ème</sup> jour post-greffe (J100), et la GVH chronique, qui se développe au-delà de J100. Après une greffe de CSP et/ou un conditionnement NMA, la GVH aiguë peut toutefois survenir au-delà de J100 (2). Elle est, par ailleurs, étroitement liée à l'effet GVL ; si la présence d'une GVH n'est pas pour autant souhaitable, son absence totale n'est donc pas un objectif indispensable à atteindre.

#### **1.6.2.1 GVH aiguë**

##### **1.6.2.1.1 Manifestations cliniques et facteurs de risque**

La GVH aiguë touche principalement trois organes cibles : la peau, le foie et le tube digestif (2). Elle peut aussi aggraver le déficit immunitaire par une action directe sur les organes lymphoïdes secondaires (58,59), et induire des cytopénies par inhibition de l'hématopoïèse (60,61).

L'atteinte cutanée se caractérise par une éruption érythémateuse morbilliforme, parfois prurigineuse, prédominant sur le visage, les extrémités (paumes, plantes et régions rétro-auriculaires), et les faces d'extension des membres. Dans sa forme la plus grave, peuvent apparaître des décollements cutanés (signe de Nikolsky) dont le pronostic est le plus souvent sombre. L'atteinte hépatique, rarement isolée, se manifeste par des perturbations biologiques avec au premier plan une cholestase, parfois associée à une cytolyse, mais en règle générale sans insuffisance hépatocellulaire. Enfin, l'atteinte digestive se manifeste par une diarrhée d'apparition subaiguë, parfois dysentérique, et accompagnée de douleurs abdominales dans les stades avancés. Elle peut mettre en jeu le pronostic vital lorsqu'elle se complique de dénutrition sévère, hémorragie digestive, syndrome occlusif ou surinfection.

En fonction du nombre et de la sévérité des lésions, on classe chaque atteinte d'organe en stades en allant de 1 à 4, selon la classification de Glücksberg (62). Le score global tient compte de l'atteinte de l'ensemble des organes et distingue la GVH aiguë en quatre grades (de I à IV). Les formes sévères sont associées à un pronostic défavorable avec une survie à long terme de l'ordre de 25% pour les grades III et de 5% pour les grades IV (63).

L'incidence de la GVH aiguë est directement corrélée au degré de disparité HLA et va de 35-45% dans les greffes familiales géno-identiques (64,65), à 60-80% en cas de donneur non-apparenté avec incompatibilité HLA 9/10<sup>ème</sup> pour un antigène (8,66). Le même degré de disparité semble avoir moins d'influence dans les greffes de SP, avec une incidence de GVH aiguë allant de 35 à 65% (67). Les autres facteurs de risque sont : l'âge élevé du receveur (68), une incompatibilité de sexe (homme receveur et femme donneuse) (13), l'intensité du conditionnement (69), et les infections en post-greffe, en particulier à cytomégalovirus (CMV) (14).

### 1.6.2.1.2 Physiopathologie

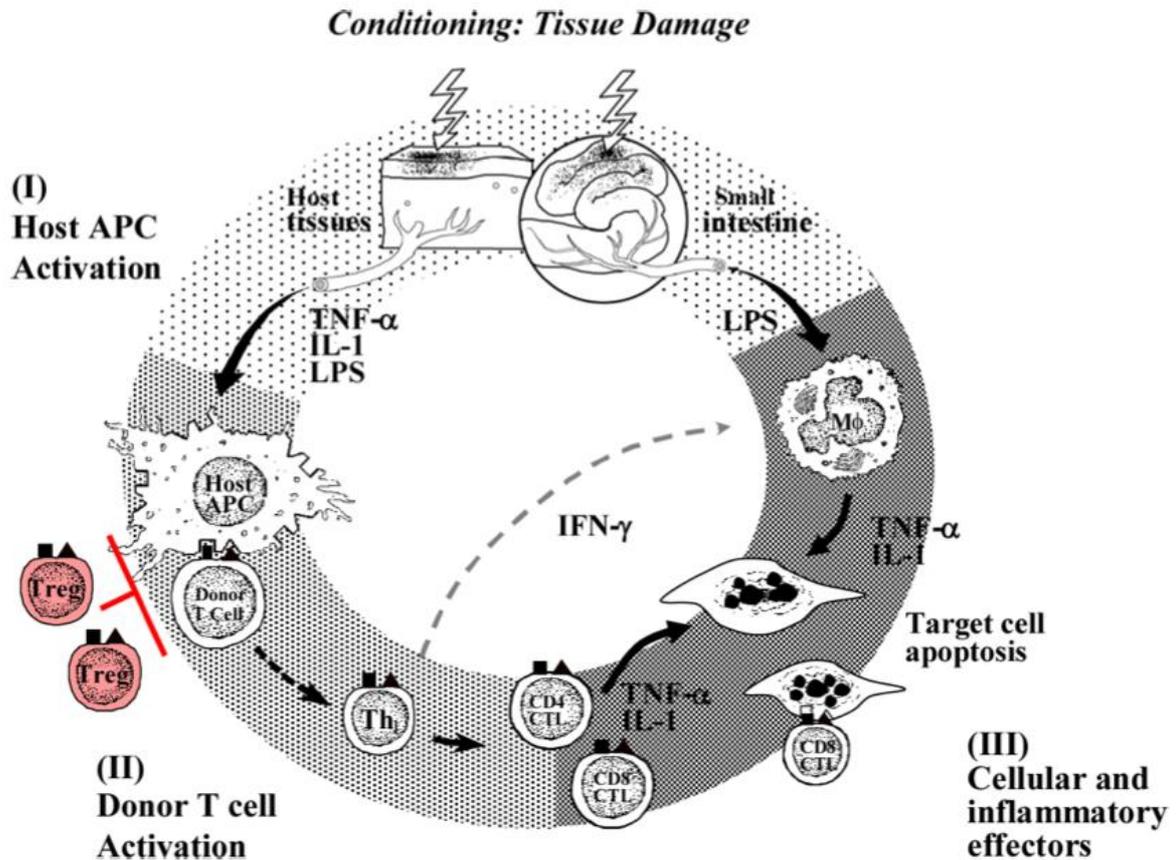
La physiopathologie de la GVH aiguë repose sur deux principes. Premièrement, la GVH aiguë est le reflet de mécanismes inflammatoires exacerbés mais normaux, induits par les lymphocytes du donneur. Leur fonctionnement est adapté étant donné l'environnement étranger qu'ils rencontrent. Deuxièmement, les tissus du receveur, qui stimulent les lymphocytes du donneur, sont généralement le siège de lésions causées préalablement par la maladie sous-jacente, le conditionnement de la greffe, et les éventuels antécédents infectieux (2). Il en résulte une production de molécules (ou signaux de « danger ») par ces tissus, provoquant ainsi l'activation et la prolifération des cellules immunitaires du donneur (70,71). Le développement de la GVH aiguë peut être divisé en trois phases (représentées par la figure 2) (2) :

- *Phase I : activation des cellules présentatrices d'antigènes (CPA).* Les lésions tissulaires induites par la maladie sous-jacente et le conditionnement de la greffe entraînent la production de signaux de « danger » (cytokines pro-inflammatoires, chimiokines, molécules d'adhésion) qui activent les CPA. Les lésions du tube digestif causées par le conditionnement sont particulièrement importantes car elles entraînent la translocation systémique de produits microbiens comme les lipopolysaccharides. Les CPA sont également activés par les infections de par leur capacité à reconnaître des «molécules-signature» des agents pathogènes, appelées PAMP (pour pathogen associated molecular patterns).
- *Phase II : activation des cellules T du donneur.* En réponse à l'activation des CPA de l'hôte, les cellules T du donneur prolifèrent et se différencient. Il en résulte des réactions biochimiques intracellulaires en cascade qui induisent la transcription de gènes codant pour des cytokines et leurs récepteurs, dont principalement celles de l'immunité à polarisation Th1 (interféron gamma, interleukine-2, facteur de nécrose

tumorale alpha). L'interféron gamma a des fonctions multiples et peut soit amplifier soit diminuer la GVH aiguë. Il rend notamment les monocytes et les macrophages plus sensibles aux différents stimuli. L'interleukine-2 est par ailleurs la cible principale des différentes approches prophylactiques et curatives de la GVH aiguë.

- *Phase III : phase des effecteurs cellulaires et inflammatoires.* Une cascade complexe (ou « orage cytokinique ») se met ensuite en place impliquant à la fois des médiateurs cellulaires (lymphocytes T cytotoxiques, cellules Natural Killer) et des médiateurs inflammatoires solubles (interféron gamma, interleukine-1, facteur de nécrose tumorale alpha, acide nitrique). Leurs actions synergiques aggravent les lésions tissulaires locales, ce qui favorise d'autant plus l'inflammation, et, par voie de conséquence, amplifie d'avantage la destruction tissulaire.

**Figure 2. Physiopathologie de la GVH aiguë (d'après Ferrara et al.)(2)**



*Abréviations et traduction* : Conditioning : conditionnement ; Tissue Damage : lésions tissulaires ; Host APC Activation : activation des cellules présentatrices d'antigènes de l'hôte ; Donor T cell Activation : activation des cellules T du donneur ; Cellular and inflammatory effectors : effecteurs cellulaires et inflammatoires ; Host tissues : tissus de l'hôte ; small intestine : intestin grêle ; TNF $\alpha$  : facteur de nécrose tumorale alpha ; IL-1 : interleukine-1 ; LPS : lipopolysaccharides ; Treg : lymphocytes T régulateurs ; CD4/CD8 CTL : lymphocytes T cytotoxiques CD4+/CD8+ ; IFN $\gamma$  : interféron gamma ; Target cell apoptosis : cellules cibles de l'apoptose ; M $\Phi$  : macrophages.

### 1.6.2.1.3 Prophylaxie et traitement curatif de la GVH aiguë

Etant donné la gravité et la fréquence de la GVH aiguë, une prophylaxie est systématiquement administrée. Elle est initiée dès la veille de la greffe (ou trois jours avant dans certains protocoles) avec une décroissance à partir de J100 (en l'absence de signes de GVH). Elle peut être interrompue plus précocement en cas de rechute, de chimérisme défavorable ou de

toxicité importante. Le traitement de référence dans les conditionnements MA repose sur la ciclosporine A, en association avec des faibles doses de méthotrexate (72,73). Ce dernier est parfois remplacé par du mycophénolate mophétil dans les greffes à conditionnement NMA. D'autres immunosuppresseurs, comme le tacrolimus (FK 506) et le sirolimus ont montré des résultats intéressants, et peuvent constituer des traitements préventifs alternatifs en cas d'intolérance à la ciclosporine A (74,75). Enfin, le SAL, utilisé dans le conditionnement pour prévenir le rejet de greffe, joue également un rôle de prévention de la GVH car il entraîne une déplétion *in vivo* du greffon en lymphocytes T (57,39).

Un traitement curatif systémique est indiqué en cas de GVH aiguë de grade supérieur ou égal à II (76). Le traitement de référence est alors la corticothérapie, à la posologie de 2 mg/kg/jour (77,78). Il n'y a en revanche pas de consensus pour la deuxième ligne thérapeutique en cas de corticorésistance. Les thérapeutiques utilisables sont alors : SAL, anticorps monoclonaux anti-récepteur de l'interleukine-2, anticorps anti-facteur de nécrose tumorale, tacrolimus, sirolimus, photochimiothérapie extracorporelle, mycophénolate mophétil, rituximab, ou anticorps anti-CD52.

### **1.6.2.2 GVH chronique**

La GVH chronique se développe en général à partir du troisième mois après la greffe, et peut apparaître sans être précédée par une GVH aiguë. Son tableau clinique est polymorphe car elle peut toucher tous les organes et s'apparente, dans sa symptomatologie, aux maladies auto-immunes (2). Sa classification distingue classiquement les formes limitées des formes extensives (79).

Ses principales atteintes sont :

- *Cutanée* : atteinte la plus fréquente qui peut se présenter sous la forme de troubles de la pigmentation (type lichen plan) associés ou non à des papules ou un érythème diffus desquamatif. Elle peut évoluer vers une forme sclérodermiforme avec atteinte tendineuse et articulaire.
- *Muqueuse* : elle se présente sous la forme de lésions lichénoïdes de la langue, des gencives ou de la face interne des joues, associées à un syndrome sec buccal, oculaire ou génital.
- *Hépatique* : elle se traduit par une cytolyse, le plus souvent modérée, associée à une cholestase. Elle est présente dans la majorité des GVH chroniques.
- *Pulmonaire* : elle peut participer au développement d'une véritable bronchiolite oblitérante, mais aussi prendre la forme d'un syndrome restrictif ou d'une pneumopathie interstitielle. Son pronostic est le plus souvent réservé et nécessite une détection précoce (80).
- *Des autres organes* : elles varient en fréquence et sévérité. L'atteinte digestive est notamment plus rare que dans la GVH aiguë.

Sa physiopathologie est moins connue que celle de la GVH aiguë. Elle serait la conséquence de réactions d'auto-réactivité (en plus de l'allo-réactivité) consécutives à une prolifération homéostatique des lymphocytes T matures du donneur (81) et à une thymopoïèse aberrante. Il y aurait alors un défaut de sélection négative des lymphocytes T auto-réactifs et une diminution de la production de lymphocytes T régulateurs (82).

La GVH chronique est plus fréquente et plus sévère après greffe de CSP qu'après greffe de MO, pour le même type de conditionnement. Dans une méta-analyse, son incidence est de 51% avec de la MO et de 67% avec des CSP, et respectivement de 31% et 47% pour les formes extensives après greffe familiale géno-identique et conditionnement MA (19). L'impact des formes résistantes sur la qualité de vie des patients peut être majeur et nécessiter des longues périodes d'hospitalisation (83).

Le traitement de référence de la GVH chronique repose sur la corticothérapie en association à la poursuite de la ciclosporine A (84). Il n'existe, en revanche, pas de consensus pour sa prise en charge en cas d'échec de ce traitement. Récemment, l'inhibiteur de tyrosine kinase imatinib a montré des résultats encourageants dans les atteintes sclérodermiformes (85). Les autres alternatives thérapeutiques sont : photochimiothérapie extracorporelle (86), azathioprine, sirolimus, rituximab, ou thalidomide. Néanmoins, ces traitements conduisent à une immunodépression prolongée, qui favorise les complications infectieuses et par conséquent le décès de 10 à 15% des patients atteints de GVH chronique (19,83).

### **1.6.3 Déficit immunitaire**

Durant la phase précoce de la greffe, c'est-à-dire pendant la période d'aplasie induite par le conditionnement, il existe un déficit immunitaire non spécifique, principalement lié à l'absence de polynucléaires neutrophiles, et qui expose les patients aux infections bactériennes et fongiques. Secondairement, il persiste un déficit de l'immunité spécifique favorisé par la destruction du système immunitaire du receveur par le conditionnement et par l'administration du traitement préventif (et éventuellement curatif) de la GVH.

La reconstitution immunitaire lymphocytaire est lente en post-greffe. Durant plusieurs mois, les cellules immunitaires du donneur présentent un défaut à la fois quantitatif et qualitatif ne permettant pas de conférer au receveur un système immunitaire efficace face aux infections (87). L'apparition d'une population naïve de lymphocytes, qui témoigne d'une différenciation à partir des CSH du donneur, ne se produit qu'au delà d'un an après l'allogreffe (88). La rapidité de la reconstitution immunitaire dépend principalement de la richesse cellulaire du greffon : elle est plus précoce avec les CSP et plus tardive avec le SP (89). Le déficit immunitaire est par ailleurs aggravé par la GVH (58) et en cas de disparité HLA entre le donneur et le receveur. Les patients perdent ainsi leur immunité acquise, et doivent être revaccinés après la greffe (90).

### **1.7. Complications infectieuses**

Outre les complications précoces comme la maladie veino-occlusive (91), ou tardives comme les cancers secondaires (33,34) et les déficits hormonaux (92), l'allogreffe de CSH se complique fréquemment d'infections. Les progrès réalisés dans leur prise en charge préventive et curative, avec notamment le développement de nouveaux traitements antifongiques, ont largement contribué à la diminution de la mortalité induite par la greffe (3).

Pendant la période de neutropénie qui fait suite au conditionnement, les complications infectieuses sont essentiellement bactériennes et fongiques, mais peuvent également concerner certains virus. L'altération de la barrière digestive secondaire aux traitements, la mucite induite par le conditionnement et l'utilisation de voies veineuses centrales sont autant de portes d'entrées infectieuses (93,94). La symptomatologie est souvent initialement pauvre, la fièvre étant alors le seul signe en faveur d'une infection. Tout épisode fébrile doit

nécessairement entraîner la mise en route d'une antibiothérapie à large spectre. La documentation microbiologique varie selon les études de 20 à 65% et les traitements restent le plus souvent probabilistes (95,96).

Le risque d'une infection fongique est proportionnel à la durée d'aplasie, les principales espèces en cause étant le *Candida* et l'*Aspergillus*. Une prophylaxie primaire antifongique est systématiquement administrée au patient pendant toute la durée de l'aplasie, et en cas de fièvre prolongée sous antibiothérapie, un traitement empirique est initié (97). Les infections fongiques peuvent par ailleurs survenir après la période de neutropénie, principalement lorsque le patient est traité par corticothérapie pour une GVH.

Le conditionnement de greffe entraîne un hyposplénisme qui rend les patients plus sensibles aux germes encapsulés, comme le pneumocoque ou l'*Haemophilus influenzae* (98). Une prévention est assurée par la prise quotidienne de phénoxyéthylpénicilline en cas d'ICT ou de greffe de SP et par la vaccination en post-greffe (90). Le risque d'infection à *Pneumocystis jiroveci* et les réactivations de *Toxoplasma gondii* (en cas de receveur séropositif avant la greffe) doivent également être prévenus en post-greffe après la sortie d'aplasie.

Le déficit immunitaire des patients allogreffés favorise également la réactivation des virus du groupe herpès (99). Le receveur reçoit une prophylaxie par aciclovir dès le début du conditionnement, essentiellement pour prévenir des infections par l'herpèsvirus simplex (HSV), et le virus de la varicelle et du zona (VZV). Les infections à CMV surviennent chez environ 60% des receveurs séropositifs avant la greffe et 30% des receveurs séronégatifs ayant un donneur séropositif. La maladie à CMV peut se présenter sous la forme d'une pneumopathie ou d'une colite potentiellement mortelle en l'absence de traitement adapté

(100). Elle favoriserait, par ailleurs, le développement de la GVH aiguë (101). Une détection précoce de la réactivation (ou plus rarement de la primo-infection) de ce virus est actuellement recommandée soit par polymérase chain reaction (PCR) soit par antigénémie. Son traitement consiste en l'administration, si possible préemptive, de ganciclovir ou de foscarnet pendant une période minimale de trois semaines (102).

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) peut favoriser l'émergence d'un syndrome lymphoprolifératif lorsque sa réplication devient importante (103). L'EBV infecte les lymphocytes B et induit une prolifération lymphocytaire, d'abord oligoclonale puis monoclonale. Cliniquement, elle se présente sous la forme d'une fièvre associée à l'apparition d'adénopathies et d'une éventuelle éruption cutanée. Sa détection peut se faire précocement en surveillant la charge virale de l'EBV par PCR. Le traitement consiste à diminuer le traitement immunosuppresseur et administrer des anticorps monoclonaux anti-CD20 (rituximab). Dans les formes graves, une chimiothérapie peut être envisagée (104).

D'autres virus peuvent être responsables de complications sévères en post-greffe ; certaines sont bien connues comme celles induites par l'adénovirus (105), le virus respiratoire syncytial (106) ou les virus des hépatites (107,108), d'autres sont moins décrites comme celles associées à l'herpèsvirus humain 6.

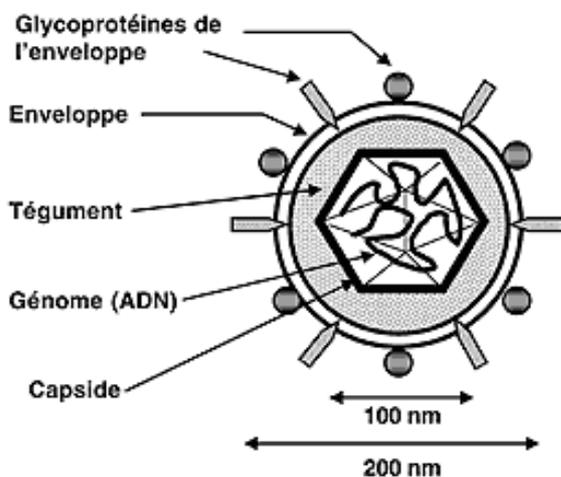
## 2. Herpèsvirus humain 6

Décrit pour la première fois en 1986 (109), l'herpèsvirus humain 6 (HHV6) est un membre de la sous-famille des *Betaherpesvirinae* (comme le CMV). Il appartient au genre *Roseolovirus* dans lequel l'herpèsvirus humain 7 est également classé. Après avoir infecté l'hôte, il peut persister à l'état latent, de manière analogue aux autres herpèsvirus (110,111). Cette propriété rend l'étude de sa pathogénicité parfois difficile, même si cette dernière est désormais formellement démontrée (112–117).

### 2.1. Structure du virus

L'HHV6 a un diamètre total d'environ 200 nanomètres et s'apparente, de par sa structure, aux autres membres de la famille des *Herpesviridae* (110). L'acide désoxyribonucléique (ADN) génomique est contenu dans une capside icosaédrique (polyèdre à 20 faces) d'environ 100 nanomètres de diamètre (figure 3). Cette capside est entourée d'un tégument (substance contenant des protéines impliquées dans la régulation du cycle viral), lui-même entouré par une enveloppe lipidique. A sa surface, on retrouve des glycoprotéines virales.

**Figure 3. Structure de l'herpèsvirus humain 6** (d'après Agut H. et al.) (118).



Le génome de l'HHV6 est constitué d'une molécule linéaire d'ADN longue d'environ 160-162 Kb et s'organise en sept blocs de gènes communs avec les autres herpesvirus, auquel s'ajoute un bloc noté  $\beta$ , qui contient des gènes intervenant dans la transactivation, plus spécifiques des *Betaherpesvirinae* (119).

Il existe deux variants de l'HHV6, les variants A et B, que l'on peut différencier par 9 cadres ouverts de lecture distincts (120). Par ailleurs, dans ceux qu'ils ont en commun, les gènes ont quelques divergences, l'identité de la séquence globale étant de l'ordre de 90 %.

## **2.2. Cycle d'infection, réplication et mécanisme de latence**

L'HHV6 a un tropisme préférentiel pour les lymphocytes T CD4+, mais peut également se répliquer dans un grand nombre de cellules nucléées : lymphocytes T CD8+, monocytes, macrophages, cellules Natural Killer, cellules dendritiques, oligodendrocytes, cellules épithéliales, cellules endothéliales, ou CSH (110,121,122). L'efficacité de la réplication n'est toutefois pas constante selon le type cellulaire et le tropisme du variant A semble plus large que celui du variant B. Une telle variété dans ses cibles s'explique par le caractère ubiquitaire de son principal récepteur cellulaire, la molécule CD46 (123).

Cette dernière est présente à la surface de l'ensemble des cellules nucléées et interagit avec les glycoprotéines de l'enveloppe du virus. La fixation de l'HHV6 à son récepteur entraîne la fusion de l'enveloppe avec la membrane de la cellule, puis l'entrée de la nucléocapside virale dans le cytoplasme. La nucléocapside est ensuite dégradée et le génome viral transporté jusqu'au noyau avec les protéines du tégument. La transcription se déroule en trois étapes séquentielles à partir des gènes très précoces, précoces et tardifs qui codent pour des protéines permettant la modification du métabolisme cellulaire, la réplication de l'ADN viral et

l'assemblage de nouveaux virions. La réplication de l'ADN se déroule dans le noyau, par l'intermédiaire notamment d'une ADN polymérase spécifique codée par le gène U38 (119). L'assemblage des capsides et la formation du tégument se fait également dans le noyau, puis l'acquisition de l'enveloppe a lieu dans des vacuoles cytoplasmiques, dont la fusion avec la membrane cytoplasmique permet enfin de libérer les virions à l'extérieur de la cellule infectée. Ce cycle de production aboutit à la lyse de la cellule et à sa mort (110).

Par ailleurs, l'HHV6 a également la capacité de persister dans la cellule infectée, dans un état de latence qui n'entraîne pas de dommage apparent. Les mécanismes sont moins connus mais il semble que, de manière analogue aux autres *Herpesviridae*, le génome viral puisse prendre une forme circulaire libre intranucléaire, tel un épisome. Le virus a ensuite la possibilité d'entrer dans un processus de réactivation et de se répliquer à nouveau. Il n'est cependant pas exclu que, même à l'état latent, un faible taux de réplication se produise (110).

Enfin, l'HHV6 a la particularité de pouvoir s'intégrer dans les chromosomes de l'hôte au niveau des télomères. Ceci a été démontré à la fois *in vitro* dans des cellules épithéliales et *in vivo* dans des cellules mononucléées humaines (111,124). Il semble que les cellules capables de supporter la phase productive et l'infection lytique puissent demeurer viables après l'intégration chromosomique du génome de l'HHV6. Lorsque ce phénomène se produit, une transmission verticale de la mère à son enfant est alors possible.

### **2.3. Epidémiologie et mode de transmission**

L'infection par l'HHV6 est ubiquitaire dans le monde, et sa prévalence sérologique est de plus de 95% dès l'âge de 18 mois (125). La primo-infection a lieu en général avant l'âge de 4

ans, et il semble que la majorité des adultes soit infectée à la fois par le variant A et B (ce qui indique qu'une réinfection est possible) (126,127). L'intégration chromosomique concernerait quant à elle environ 1% de la population (123–125).

L'HHV6 étant trop fragile pour survivre en milieu extérieur, sa transmission se fait par voie interhumaine directe, généralement par la salive (128). Il peut par ailleurs être transmis par les produits sanguins, du moins d'un point de vue théorique, étant donné sa présence dans le sang. Néanmoins, sa forte séroprévalence chez l'adulte rend la démonstration d'une telle transmission difficile. Des cas de transmission au cours de greffes d'organe (moelle osseuse, rein, foie) sont en revanche bien décrits, principalement par le variant B (129–132). L'HHV6 peut aussi être transmis pendant la grossesse (133), la pathogénicité chez le fœtus n'étant cependant pas clairement établie. Enfin, la transmission pourrait avoir lieu au moment de l'accouchement, mais ne semble pas être possible lors de l'allaitement (134).

## **2.4. Techniques de détection**

Le diagnostic indirect, ou sérologique, permet la détection des anticorps spécifiques de l'HHV6 dans le sérum du sujet infecté. Les méthodes actuelles utilisent soit l'immunofluorescence indirecte sur cellules infectées, soit une technique immuno-enzymatique de type ELISA (de l'anglais enzyme-linked immunosorbent assay, dosage d'immunoabsorption par enzyme liée) réalisée sur des protéines purifiées extraites des cellules infectées (125). Si l'apport du diagnostic sérologique est indéniable lors de la primo-infection (dont témoigne la séroconversion) (135), il a en revanche de nombreuses limites dans les autres contextes. L'importante séroprévalence de l'HHV6 rend son interprétation peu contributive en cas de suspicion de réactivation, de réinfection par un nouveau virus, ou de

responsabilité dans les symptômes d'une maladie. De plus, chez les patients immunodéprimés, la réponse humorale est souvent altérée, rendant alors la sérologie faussement négative (90). Enfin, ces techniques ne permettent pas de distinguer le variant en cause et manquent de spécificité puisque des réactions croisées sont observées avec le CMV ou l'herpèsvirus humain 7 (110).

D'importants progrès ont été réalisés dans les techniques de diagnostic direct. Les antigènes viraux peuvent désormais être détectés dans les cellules ou tissus infectés par immunohistochimie ou immunofluorescence en utilisant des anticorps monoclonaux. Ils permettent d'étayer l'hypothèse d'une infection active lorsqu'une atteinte d'organe est suspectée. Ainsi, la présence d'un antigène dans les cellules épithéliales serait plus en faveur d'un rôle pathogène de l'HHV6 que s'il n'est retrouvé que dans les lymphocytes ou macrophages (136,137). Néanmoins, cette technique peut manquer de sensibilité et le panel d'anticorps monoclonaux disponible reste encore limité.

La détection de l'ADN génomique par PCR est aujourd'hui la technique directe la plus sensible et accessible (110). Le développement de l'amplification en temps réel a, de plus, réduit les risques de contamination des prélèvements et surtout permis la quantification de la charge virale en routine (138,139). L'intérêt est de pouvoir distinguer une infection latente d'une infection active à partir des seuils de charge virale ou de leurs variations dans le temps par corrélation avec les manifestations cliniques (117). La PCR peut aussi être un outil pour dépister précocement une réactivation ou surveiller l'efficacité d'un traitement. Elle permet également de connaître le variant de l'HHV6 mis en cause (140). Les données issues d'études épidémiologiques ont montré que le variant A atteint plus fréquemment les cellules du système nerveux central, alors que le variant B est plus souvent retrouvé dans le sang.

## 2.5. Manifestations cliniques

La primo-infection par l'HHV6 est généralement asymptomatique mais peut se traduire par un exanthème subit, également appelé roséole infantile ou sixième maladie. Elle survient habituellement chez l'enfant entre 6 mois et 3 ans et se présente sous la forme d'une fièvre élevée et d'une éruption cutanée rubéoliforme au niveau du cou et du tronc, apparaissant au moment de la défervescence thermique (135). L'évolution est spontanément favorable mais peut se compliquer de troubles neurologiques, en particulier de crises convulsives (137). D'autres formes de primo-infection sont possibles : fièvre isolée, méningo-encéphalite, atteinte hépatique, ou syndrome mononucléosique (110). De rares cas ont également été rapportés chez l'adulte immunocompétent, avec des tableaux cliniques similaires quoique souvent plus sévères (141,142). Au cours des infections chroniques les maladies observées sont moins clairement identifiées et il est plus difficile de mettre en évidence le rôle pathogène de l'HHV6.

Chez les patients immunodéprimés, il est maintenant bien établi que l'HHV6 peut être responsable d'infections opportunistes, parfois graves (131,132,143,144). Cependant, peu d'études se sont intéressées à l'impact clinique de la réactivation de l'HHV6 dans le cadre plus spécifique de l'allogreffe de CSH. Par ailleurs, l'interprétation des données de la littérature, souvent contradictoires, est rendue difficile par le nombre limité de patients dans chaque étude. Pourtant, la réactivation de l'HHV6 semble survenir chez environ la moitié des patients allogreffés, principalement durant le premier mois après la greffe (144–147). Elle peut entraîner des complications sévères, telles que des encéphalites (114,116,148,149) ou des pneumopathies (112,113,136). Elle a également été associée à de la fièvre, des éruptions cutanées (150,151) et une susceptibilité à une maladie à CMV concomitante (152).

L'impact de la réactivation de l'HHV6 sur la GVH aiguë est plus particulièrement discuté. Certaines études rapportent une association significative (146,147,153–155), d'autres non (130,152,156,157). Enfin, l'efficacité et les indications des traitements préemptifs ou curatifs des manifestations de la réactivation de l'HHV6 sont mal définies (158). Le ganciclovir et le foscarnet sont actifs *in vitro* en inhibant l'ADN polymérase virale, et ils ont permis des évolutions favorables *in vivo*, notamment dans des cas d'encéphalite, mais aucun protocole thérapeutique n'a, à ce jour, été réalisé (159–162).

## **OBJECTIFS DE L'ETUDE**

Nous rapportons les résultats d'une étude rétrospective réalisée chez 235 patients traités au CHRU de Lille par allogreffe de CSH. L'objectif est de mieux comprendre et définir l'impact clinique et les conséquences de la prise en charge de la réactivation précoce de l'HHV6. Nous nous sommes intéressés à l'incidence de la réactivation, à ses facteurs de risque, aux manifestations cliniques associées, et à l'éventuelle influence sur la prise de greffe, le développement de la GVH aiguë et la survie des patients. Finalement, nous avons analysé les conséquences du traitement lorsqu'il a été initié.

# PATIENTS ET METHODES

## 1. Patients et modalités de la greffe

Cette étude rétrospective porte sur l'ensemble des patients traités par allogreffe de cellules souches dans le service des Maladies du Sang du CHRU de Lille entre janvier 2004 et juillet 2009. Seuls ceux pour qui aucune recherche de l'HHV6 n'a été effectuée ont été exclus, soit un total de 235 patients inclus sur les 334 allogreffes réalisées pendant cette période. Conformément à la déclaration d'Helsinki, chaque patient a donné un consentement éclairé, par écrit, autorisant l'utilisation anonyme de ses données cliniques et paracliniques à des fins de recherche médicale. Les caractéristiques initiales des patients et des donneurs sont présentées dans le tableau 1.

La source des CSH est majoritairement de la MO (n = 127), mais aussi des CSP (n = 74) ou du SP (n = 34). Aucun greffon n'a eu de déplétion en lymphocytes T. Un conditionnement MA a été administré à 155 patients soit par l'association du busulfan au cyclophosphamide, soit par celle d'une ICT de 12 Gy au cyclophosphamide. Quatre-vingt patients ont reçu un conditionnement NMA par fludarabine et ICT de 2 Gy, ou fludarabine, melphalan et ICT de 2 Gy ou fludarabine associée à d'autres substances. Selon les protocoles, des thymoglobulines de lapin (SAL) ont été utilisées à la posologie de 2,5 mg/kg/jour pendant 2 jours dans certains conditionnements NMA (n=11), pour des greffes de SP (n=14) ou en cas de greffon issu d'un donneur non-apparenté avec incompatibilité HLA (n=7). Les patients traités pour une aplasie médullaire (n=7) ont reçu, par ailleurs, un conditionnement classique comportant du cyclophosphamide et 3,75 mg/kg/jour de SAL pendant 5 jours, hormis deux patients ayant une anomalie du chromosome 7.

**Tableau 1. Caractéristiques des patients et facteurs de risque de la réactivation de l'HHV6.**

	Total	Groupe A	Groupe B	valeur p
Nombre de patients	235 (100)	112 (48)	123 (52)	
Âge du receveur, années (médiane (étendue))	42,2 (26-62,6)	41,7 (2,6-62,6)	42,5 (3,2-62,3)	0,238
Sexe, n (%)				0,799
Homme R et homme D	76 (32)	38 (34)	38 (31)	
Femme R et homme D	52 (22)	27 (24)	25 (20)	
Homme R et femme D*	57 (24)	28 (25)	29 (24)	
Femme R et femme D	50 (21)	19 (17)	31 (25)	
Maladie, n (%)				
Leucémies aiguës	131 (56)	61 (54)	70 (57)	
Syndrome myélodysplasique	23 (10)	12 (11)	11 (9)	
Syndrome myéloprolifératif	14 (6)	5 (4)	9 (7)	
Leucémie myéloïde chronique	16 (7)	12 (11)	4 (3)	
Leucémie lymphoïde chronique	8 (3)	2 (2)	6 (5)	
Lymphomes	19 (8)	7 (6)	12 (10)	
Myélome multiple	11 (5)	6 (5)	5 (4)	
Aplasie médullaire	7 (3)	4 (4)	3 (2)	
Divers	6 (3)	3 (3)	3 (2)	
Statut hématologique pré-greffe, n (%)				0,298
Rémission complète	123 (52)	53 (47,3)	70 (57)	
Maladie stable	62 (26)	34 (30,3)	28 (23)	
Maladie progressive	50 (21)	25 (22,3)	25 (20)	
Donneur, n (%)				
Familial, géno-identique	113 (48)	48 (43)	65 (53)	0,129
Non-apparenté				
Phéno-identique, 10/10 <sup>ème</sup>	77 (32)	35 (31)	42 (34)	0,648
Avec incompatibilité HLA, 9/10 <sup>ème</sup>	11 (5)	8 (7)	3 (2)	0,088
Conditionnement pré-greffe, n (%)				
Myéloablatif	155 (66)	82 (73)	73 (59)	<b>0,028</b>
Bu/Cy	62 (26)	29 (26)	33 (26)	
Cy/ICT 12 Gy	93 (40)	53 (47)	40 (33)	
ICT 2 Gy (+ chimiothérapie)	67 (29)	26 (23)	41 (33)	
SAL	38 (16)	18 (16)	20 (16)	NS
Source, n%				<b>0,033</b>
MO	127 (54)	64 (57)	63 (51)	
CSP	74 (31)	27 (24)	47 (38)	
SP	34 (15)	21 (19)	13 (11)	
Sérologie CMV – positive, n (%)				
Donneur	91 (39)	41 (37)	50 (41)	0,525
Receveur	118 (50)	56 (50)	62 (50)	0,950

*Abréviations:* HHV6 : herpèsvirus humain 6 ; n : nombre ; R: receveur/receveuse; D: donneur/donneuse; HLA: human leukocyte antigen; Bu: busulfan; Cy: cyclophosphamide; ICT : irradiation corporelle totale; SAL : sérum anti-lymphocytaire (thymoglobulines) ; MO : moelle osseuse; CSP: cellules souches périphériques; SP: sang placentaire; NS : non significatif ; CMV: cytomégalovirus.

\*Un greffon avec une incompatibilité de sexe est défini comme un homme receveur traité par allogreffe avec des cellules souches issues d'une femme donneuse.

La prophylaxie de la GVH a principalement reposé sur la ciclosporine A - à la posologie de 3 mg/kg/jour à partir de la veille de la greffe (J-1), puis secondairement adaptée aux résultats des dosages sanguins - associée soit à des faibles doses de méthotrexate (pour les conditionnements MA), soit au mycophénolate mofétil (pour les conditionnements NMA). En cas de greffe non-apparentée avec incompatibilité HLA, de la méthylprednisolone a été administrée de J14 à J22 après la transplantation (1 mg/kg/jour). Pour les greffes à partir de SP, la prophylaxie a associé ciclosporine A et méthylprednisolone (2 mg/kg/jour de J-1 à J12 puis 1 mg/kg/jour de J13 à J19). Enfin, un patient a reçu du SAL dans le cadre de la prise en charge d'une GVH aiguë digestive corticorésistante.

Les patients ont séjourné pendant toute la durée de l'aplasie en secteur protégé dans une chambre à haut renouvellement d'air (disposant d'un filtre à air de très haute efficacité, HEPA). L'alimentation des patients est stérilisée et hautement contrôlée, une décontamination digestive par antibiothérapie non absorbable leur a été donnée (colimycine et gentamycine) et ils ont bénéficié d'une nutrition entérale par sonde naso-gastrique la nuit, dès le lendemain de la greffe.

La prophylaxie primaire anti-infectieuse a été initiée à partir du 9<sup>ème</sup> jour avant la greffe (J-9) et a comporté, en l'absence de contre-indication : 500 mg deux fois par jour de valaciclovir en prévention des virus Herpes Simplex et de la varicelle et du zona (jusqu'à un an après la greffe) ; 400 mg de fluconazole une fois par jour en prévention des infections fongiques (jusqu'à la sortie d'aplasie) ; et un traitement par sulfaméthoxazole/triméthoprime en prévention de *Pneumocystis jiroveci* et de la toxoplasmose (arrêté le jour de la transplantation, repris ou remplacé par sulfadoxine/pyriméthamine à la sortie d'aplasie et poursuivi pendant un an).

En cas de neutropénie fébrile, les patients ont été traités par antibiothérapie intraveineuse à large spectre, probabiliste et secondairement adaptée à l'antibiogramme. Des traitements antifongiques, antiviraux ou antiparasitaires ont été ajoutés selon les indications cliniques.

Par ailleurs, les patients ont reçu de l'héparine non fractionnée à dose iso-coagulante (100 UI/kg/jour jusqu'à la sortie d'hospitalisation) et un inhibiteur de la pompe à protons en prévention respectivement de la maladie veino-occlusive hépatique et de l'ulcère de stress. L'hémoglobine a été maintenue au-dessus de 8 g/dL et le taux de plaquettes au-dessus de 10 000/mm<sup>3</sup> (seuils éventuellement adaptés à la tolérance et au risque hémorragique du patient).

La GVH aiguë a été diagnostiquée et gradée selon les critères standards (163). Avant d'ajouter un traitement immunosuppresseur, un interrogatoire détaillé et un examen clinique complet ont été réalisés. Ils ont compris une quantification quotidienne des selles en cas de diarrhée, l'inspection et la palpation de la peau, ainsi que l'appréciation de l'état général du patient et des symptômes associés. Cette enquête a été couplée à un bilan biochimique afin de rechercher des perturbations du bilan hépatique ou un syndrome inflammatoire. Si une GVH aiguë digestive a été suspectée, des investigations du tube digestif ont été systématiquement réalisées, principalement pour écarter un processus infectieux, comme décrit précédemment (164). Ainsi, des examens endoscopiques (gastroscopie et recto-sigmoïdoscopie voire vidéo-capsule) ont été faits dans les 48 heures suivant l'apparition de la diarrhée, hormis en cas de diagnostic évident de GVH aiguë cutanée de stade 2 ou plus. De plus, des coprocultures bactériennes et mycologiques ont été réalisées, de même que la recherche par PCR de rotavirus et entérovirus dans les selles, adénovirus dans les selles, le sang, la salive et les urines, et HHV6, EBV et CMV dans le sang.

La réactivation de l'HHV6 a été traitée par ganciclovir (5 mg/kg 2 fois par jour) ou foscarnet (90 mg/kg 2 fois par jour). Le choix entre ces deux traitements s'est seulement fondé sur leurs profils de toxicité respectifs, en l'absence de données solides dans la littérature comparant leur efficacité vis-à-vis de l'HHV6. Néanmoins, seules les réactivations symptomatiques ont conduit à un antiviral à dose curative. En outre, il est important de noter que les patients présentant des symptômes cliniques atypiques, ressemblant à de la GVH, mais ne mettant pas en jeu leur pronostic vital, ont d'abord reçu un traitement antiviral seul avant qu'un éventuel traitement immunosuppresseur ne soit initié. A l'inverse, lorsque le diagnostic de GVH a été établi et qu'une réactivation de l'HHV6 est survenue secondairement, un traitement antiviral a été ajouté au traitement immunosuppresseur en cas de persistance de la symptomatologie.

## **2. Prélèvements**

Chez la majorité des patients, une surveillance hebdomadaire des PCR HHV6, EBV, CMV, et adénovirus a été effectuée sur sang total durant la période d'aplasie. Après la sortie d'hospitalisation, la fréquence des prélèvements a été guidée par les symptômes. En cas de réactivation de l'HHV6, la charge virale a été suivie plus régulièrement, selon l'appréciation du clinicien. Une recherche de l'HHV6 a pu également être faite par PCR sur biopsie intestinale (n=10), liquide céphalo-rachidien (n=6), liquide pleural (n=3), ou liquide de lavage broncho-alvéolaire (n=1) si la présentation clinique est évocatrice. La fréquence des PCR virales n'a pas été dépendante du type de conditionnement ni de la source des CSH utilisée, tous les patients bénéficiant des mêmes modalités de surveillance sur le plan infectieux, quelles que soit leurs caractéristiques initiales ou celles de leur greffon.

Pendant la période considérée pour cette étude, les PCR HHV6 n'ont pas été réalisées dans le cadre du bilan pré-greffe. Nous avons néanmoins considéré que nos receveurs et donneurs

(sauf en cas de SP) ont virtuellement tous une sérologie HHV6 positive, étant donné l'incidence élevée des infections dans la petite enfance (plus de 95% à l'âge de 18 mois) (110). Ainsi, une PCR HHV6 positive en post-greffe témoigne d'une réactivation plus que d'une improbable primo-infection.

Afin de déterminer à quelle prévalence les PCR HHV6 sont positives dans une population non-greffée, donneurs et receveurs ont par ailleurs été testés systématiquement en pré-greffe entre septembre 2009 et mars 2010. La PCR HHV6 est positive dans 5 des 58 (8,5%) prélèvements sanguins réalisés (1 donneur et 4 receveurs). Après la greffe, la PCR HHV6 est positive chez 67% des receveurs testés. Parmi les 4 receveurs ayant une PCR positive avant la greffe, 2 ont eu une PCR positive en post-greffe et un autre a une intégration chromosomique confirmée.

### **3. Détection de l'ADN de l'HHV6 par PCR quantitative en temps réel (PCR HHV6)**

La technique de détection et de quantification de l'ADN des variants A et B de l'HHV6 a changé pendant la période de l'étude. Avant janvier 2007, nous avons utilisé une technique « maison » de PCR quantitative en temps réel qui amplifie le fragment du gène U65-U66 (selon la méthode développée par Gautheret-Dejean A et al.) (138). Elle a été effectuée sur les cellules mononucléées du sang périphérique (CMSP) après les avoir séparées du sang total par centrifugation à l'aide d'une solution Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech, Upssala, Suède). Les CMSP ont ensuite été lavées, culotées, aliquotées et conservées à -80°C jusqu'à leur utilisation. L'extraction de l'ADN a été faite à partir d'une suspension de 200 mL de CMSP en utilisant un kit Qiamp Blood DNA Mini Kit® (Qiagen, Courtabœuf, France).

L'ADN a été quantifié à 260 nm grâce à un spectrophotomètre GeneQuant® (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède). L'amplification de la séquence de l'HHV6 a été réalisée sur 500 ng d'ADN dans un thermocycleur LightCycler® (Roche Applied Science, Meylan, France). Les résultats sont exprimés en nombre de copies de l'HHV6 par mg d'ADN, avec un seuil de détection à 5 copies/mg d'ADN.

A partir de janvier 2007, la détection et la quantification de l'ADN de l'HHV6 ont été réalisées avec un kit commercial de PCR multiplexe en temps réel, le CMV HHV6, 7, 8 R-gene™ (Argene, Verniolle, France). Elle permet de mesurer quantitativement l'ADN du CMV et de l'HHV6 et qualitativement celui de l'HHV7 et de l'HHV8 (139). La quantification de l'ADN de l'HHV6 est obtenue en s'appuyant sur des courbes standards générées à partir de quatre dilutions standards contenant respectivement 50 000, 5000, 500 et 50 copies d'ADN standard par réaction. Cette technique est réalisée sur le sang total prélevé dans un tube contenant de l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA). L'extraction de l'ADN a été faite à partir de 200 µL de sang total en utilisant un kit Qiamp Blood DNA Mini Kit® (Qiagen, Courtabœuf, France) ; et le séquençage a été effectué par un appareil ABI Prism® 7500 (Applied Biosystems, Courtabœuf, France). Les résultats sont exprimés en nombre de copies de HHV6 par mL de sang total, avec un seuil de détection à 50 copies/mL (1,70 log<sub>10</sub>).

#### **4. Définitions**

La réactivation de l'HHV6 est définie par la positivité d'au moins une PCR HHV6 dans le sang total (c'est-à-dire la présence d'un nombre de copies de l'ADN de l'HHV6 supérieur au seuil de détection de chacune des deux techniques utilisées). Les symptômes observés au

moment où la PCR HHV6 est positive ont été recueillis et répertoriés à partir des dossiers médicaux des patients (quelle que soit la cause des symptômes).

La réactivation a été considérée symptomatique si aucune autre cause n'a été identifiée. Ainsi, une enquête étiologique a été réalisée pour chaque patient selon le tableau clinique.

En cas de fièvre, des hémocultures aérobie et anaérobie, un examen cyto bactériologique des urines, des PCR HHV6, EBV, CMV et adénovirus, et des tests non-invasifs à la recherche d'une infection fongique (antigénémie aspergillaire, sérologie candida) ont été systématiquement exécutés.

Devant toute diarrhée, des coprocultures bactériennes (incluant la recherche de la toxine de *Clostridium difficile*), mycologiques, et virales (rotavirus, entérovirus et adénovirus) ont été effectuées.

En présence d'une éruption cutanée, l'imputabilité intrinsèque et extrinsèque des médicaments a été étudiée et les virus HHV6, EBV et CMV recherchés par PCR dans le sang. Les pneumopathies ont été analysées par examen tomographique, et selon la présentation et la gravité clinique un examen cyto bactériologique des crachats, une aspiration trachéale, une ponction pleurale ou un lavage broncho-alvéolaire ont été effectués (la recherche de virus n'étant cependant pas systématique avec ces prélèvements).

Les confusions fébriles ou tout signe de méningo-encéphalite ont été explorés par une ponction lombaire à la recherche de bactéries, virus (HSV, VZV, CMV, HHV6, EBV, adénovirus) ou parasite (*Toxoplasma gondii*) associée à un examen d'imagerie par résonance magnétique et/ou scanographique. D'autres examens et explorations ont été réalisés si nécessaires.

La réponse au traitement antiviral est définie comme « négativation complète » si l'ADN de HHV6 n'est plus détectable par PCR, et comme « diminution significative » si la charge

virale a baissé de plus de 90%. Elle a été considérée « évaluable » seulement si trois PCR HHV6 ont été réalisées après une période de réactivation minimale d'une semaine.

La prise de greffe a été définie pour les polynucléaires neutrophiles (PNN) par un taux absolu supérieur ou égal à  $500/\text{mm}^3$  et pour les plaquettes par un taux supérieur ou égal à  $50\,000/\text{mm}^3$ , en l'absence de transfusion pendant 7 jours (ces valeurs devant être confirmées pendant 3 jours consécutifs, le premier jour comptant comme le jour de la prise de greffe).

## **5. Analyse statistique**

Les résultats sont exprimés en fréquence et pourcentage pour les variables catégorielles, et en moyenne et dérivation standard pour les variables quantitatives.

Cinq critères évolutifs ont été considérés : survie globale (OS), rechute, mortalité sans rechute (NRM), survie sans événement (EFS) et GVH aiguë. L'analyse de cette dernière a été conduite d'une part pour la GVH aiguë de grade II à IV, et d'autre part pour les formes sévères de grade III à IV, les patients en vie étant censurés à J100 après la greffe s'ils n'ont pas eu de GVH. L'OS est définie comme la probabilité d'être vivant (indépendamment du statut de la maladie) quelque soit le moment considéré ; la rechute comme une reprise évolutive de la maladie initiale ; la NRM comme la probabilité de décéder sans avoir rechuté (événement compétitif) ; et l'EFS comme la probabilité d'être en vie sans avoir rechuté quelque soit le moment considéré. Après 180 jours, l'influence de la réactivation de HHV6 sur le déroulement de la greffe a été considérée négligeable étant donné que le traitement immunosuppresseur est le plus souvent arrêté à ce stade. Notre analyse de l'influence de HHV6 s'est donc concentrée sur la période précoce en post-greffe pour l'OS, la rechute, la NRM et l'EFS, les patients sans événement étant ainsi censurés à J180.

Pour l'OS, l'EFS et la GVH aiguë, les courbes de survie ont été estimées par la méthode de Kaplan-Meier. Pour la NRM et la rechute, l'incidence cumulée a été calculée selon la méthode de Gray (165). La réactivation de l'HHV6 et la GVH aiguë ont été incluses comme variables dépendantes du temps dans chaque modèle.

Tous les facteurs de risque potentiels ont été comparés par un test de log-rank. Les paramètres ayant une valeur  $p < 0,10$  ont été ensuite introduits dans une analyse multivariée par régression linéaire à risque proportionnel selon le modèle de Cox (en utilisant les méthodes de Fine et Gray (166)). La réactivation de l'HHV6 a été incluse dans chaque modèle en cas de valeur  $p < 0,10$  dans les analyses bivariées. Dans le modèle final, le risque relatif (RR) et l'intervalle de confiance à 95% (IC 95%) ont été calculés.

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées sur le logiciel SAS (version 9.1, SAS Institute, Cary, NC, Etats-Unis) et implémentées sous R avec le cmprsk package (Free Software Foundation, Boston, MA, Etats-Unis). Les valeurs  $p < 0,05$  sont considérées comme significatives.

# RESULTATS

## 1. Réactivation de HHV6 dans les 100 premiers jours post-greffe

Chez les 235 patients inclus dans cette étude, un total de 952 PCR HHV6 (médiane = 3, écart interquartile – EIQ : 3-5 PCR) a été réalisé sur prélèvements sanguins. Nous avons observé une réactivation précoce de l'HHV6, c'est-à-dire dans les 100 premiers jours suivant la greffe, chez 112 patients (groupe A) (médiane : 27 jours ; étendue : 8-91). A l'inverse, la PCR HHV6 est restée négative sur cette même période chez 123 patients (groupe B). Ainsi, 82% des réactivations ont eu lieu dans les 100 premiers jours post-greffe (25 patients ont eu une réactivation plus tardive et ont donc été inclus dans le groupe B).

L'analyse univariée suggère un effet protecteur des CSP et du conditionnement NMA face à la réactivation de l'HHV6. En analyse multivariée, un seul facteur de risque est toutefois significatif : le conditionnement MA. Les autres paramètres (âge, sexe, incompatibilité de sexe, statut sérologique vis-à-vis du CMV, lien de parenté du donneur, statut hématologique pré-greffe, ICT ou utilisation de SAL) ne semblent pas influencer la survenue d'une réactivation de l'HHV6 (Tableau 1).

## 2. Symptômes présents au moment de la réactivation

Seulement 6 patients (5%) du groupe A n'ont pas présenté de symptômes au moment de la réactivation (Tableau 2). De plus, au moins deux symptômes concomitants ont été observés dans 69% des cas. Cinquante-neuf patients du groupe A ont été traités pour une GVH aiguë, 48 ont eu des symptômes que nous avons considérés sans lien avec une GVH, et 6 sont restés

asymptomatiques. Chez les 48 patients sans GVH, la symptomatologie a complètement régressé sans adjonction d'immunosuppresseurs (y compris les corticoïdes), hormis 2 patients décédés respectivement d'une lymphoprolifération associée à l'EBV à J77 et d'une gastrite à CMV réfractaire à J139 à la greffe.

**Tableau 2. Symptômes associés à la réactivation de l'HHV6.**

	Groupe A	Patients traités pour une GVH aiguë	Patients sans GVH aiguë	Valeur p
	N (%)	N (%)	N (%)	
Nombre de patients	112 (100)	58 (52)	54 (48)	
Fièvre	60 (54)	30 (52)	30 (56)	0,685
Eruption cutanée	57 (51)	42 (72)	15 (28)	<b>&lt;0,001</b>
Diarrhée et/ou coliques	51 (46)	21 (36)	30 (56)	<b>0,040</b>
Manifestations pulmonaires	19 (17)	9 (16)	10 (19)	0,672
Troubles neurologiques	12 (11)	8 (14)	4 (7)	0,275
Anomalies du bilan hépatique	8 (7)	5 (9)	3 (6)	0,529
Divers	8 (7)	5 (9)	3	0,586
Pancytopénie	2 (2)	1	1	
Rejet du greffon	1 (1)	0	1	
Erythroblastopénie	1 (1)	0	1	
Thrombopénie périphérique	1 (1)	1	0	
Asthénie (grade 3-4)	2 (2)	0	2	
Myalgies	1 (1)	1	0	
Kératite	1 (1)	1	0	
Péricardite	1 (1)	1	0	

*Abréviations:* HHV6 : herpèsvirus humain 6 ; GVH : graft-versus-host disease, réaction du greffon contre l'hôte ; N : nombre.

Par ailleurs, 21 patients du groupe A ont eu des complications sévères pour lesquelles aucune autre étiologie que la réactivation de l'HHV6 n'a été identifiée : encéphalite (n=2), crise convulsive généralisée (n=4), ou pneumopathie (interstitielle, n=7 ; alvéolo-interstitielle, n=3 ; interstitielle avec épanchement pleural, n=2 ; ou nodulaire, n=3). La PCR HHV6 n'a cependant pas été effectuée systématiquement dans les liquides et tissus. Elle est positive dans le LCR des deux patients ayant une encéphalite, le liquide pleural d'un des deux patients

ayant un épanchement parapneumonique (aucune PCR HHV6 du liquide pleural de l'autre patient n'ayant été effectuée), et le liquide du lavage broncho-alvéolaire d'un des sept patients ayant une pneumopathie interstitielle (il s'agit du seul patient pour lequel l'HHV6 a été recherché dans le liquide du lavage broncho-alvéolaire).

### **3. Réponse au traitement antiviral**

Un traitement antiviral a été administré à 44 patients : 16 ayant une réactivation de l'HHV6 isolée et 17 des réactivations de l'HHV6 et du CMV concomitantes. Les 11 autres patients ont été traités pour une GVH aiguë apparue avant la réactivation (3 ayant une réactivation de l'HHV6 isolée et 8 des réactivations de l'HHV6 et du CMV concomitantes). Les symptômes ont complètement régressé dans le mois suivant l'initiation du traitement chez 37 patients (87%).

Sur le plan biologique, une réponse a été observée chez 89% des 38 patients évaluable avec une négativation complète de la PCR HHV6 chez 14 patients et une diminution significative chez les 20 autres. Parmi les quatre patients non-répondeurs, deux sont décédés : l'un dans les suites d'une GVH aiguë et l'autre d'une gastrite à CMV réfractaire. Les deux autres patients ne présentent plus de symptômes et sont toujours vivants au moment de l'analyse de cette étude.

De plus, la durée de la réactivation de l'HHV6 a été plus courte chez les patients recevant un traitement antiviral que chez ceux qui n'en ont pas reçu (respectivement 50 jours contre 72 jours,  $p=0,04$ ).

## 4. Devenir des patients et prise de greffe

A la date de référence du 31 octobre 2009, le suivi médian est de 31 mois suivant le jour de la greffe (étendue : 4 - 68). Le tableau 3 résume les résultats des analyses bivariées concernant le devenir des patients.

**Tableau 3. Analyses univariées des facteurs associés à la prise de greffe des plaquettes, l'OS, EFS, rechute et NRM à J180, et à la GVH aiguë de grade II à IV (médiane, taux, et valeur p par test log-rank).**

Caractéristiques	N de pts	Prise de greffe des plaquettes		OS (J180)		EFS (J180)		Rechute (J180)		NRM (J180)		GVH aiguë (grade II à IV)	
		Médiane (jour)	p	%	p	%	p	%	p	%	p		
PCR HHV6													
Négative	123	22	<0,001	89	0,04	78	0,10	16	a	6	-	30	0,009
Positive	112	29		79		68		22		10		47	
Âge du receveur													
≤ 45 ans	136		-	87	0,08	79	0,005	14	0,047	7	-	35	-
> 45 ans	99			79		63		26		9		44	
Sexe du receveur													
Homme	133		-	83	-	68	0,06	23	0,012	8	-	38	-
Femme	102			84		79		14		7		39	
Sexe du donneur													
Homme R et femme D	57		-	84	-	63	0,04	26	0,003	11	-	46	-
Autres	178			83		76		17		7		36	
Donneur													
Familial	115	24	<0,001	92	0,001	80	0,02	19	-	1	0,001	24	<0,001
Non-apparenté	120	29		76		67		19		14		52	
Source													
MO	127		-	87	0,09	75		21		4	0,020	30	0,008
CSP	74			80		72		16		12		45	
SP	34			79		71		18		12		56	
CSP/SP	108			80		71	-	17	-	12		48	
Conditionnement													
Myéloablatif	155	28	<0,001	84	-	77	0,04	15	0,004	8	-	37	-
Non myéloablatif	80	18		84		65		28		8		40	
Avec SAL	38	39	0,001	66	0,001	58	0,02	24	-	18	0,007	39	-
Sans SAL	197	25		87		76		18		6		38	

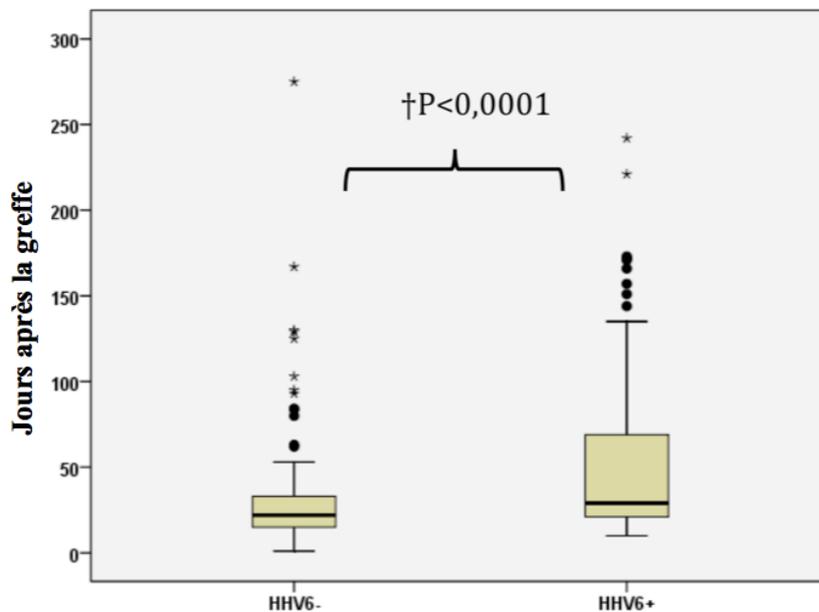
*Abréviations:* OS : overall survival, survie globale ; EFS : event-free survival, survie sans évènement ; NRM : non relapse mortality, mortalité non liée à la rechute ; J180 : 180 jours après la greffe ; GVH : graft-versus-host disease, réaction du greffon contre l'hôte ; N : nombre ; pts : patients ; PCR HHV6 : human herpesvirus 6 quantitative real-time polymerase chain reaction, réaction de polymérase en chaîne pour l'herpèsvirus humain 6 ; R: receveur/receveuse; D: donneur/donneuse; HLA: human leukocyte antigen; MO : moelle osseuse; CSP: cellules souches périphériques; SP: sang placentaire; SAL : sérum anti-lymphocytaire (thymoglobulines).

Toutes les caractéristiques initiales des patients (présentées dans le tableau 1) ainsi que la réactivation de l'HHV6 en tant que facteur de risque temps-dépendant ont été introduites dans les analyses univariées. Les variables ayant une faible valeur pronostique ( $p > 0,05$ ) ne sont pas représentées.

a- Variables à faible valeur pronostique ( $p > 0,05$ )

Une prise de greffe des PNN ou des plaquettes n'a pas eu lieu respectivement chez trois et onze patients. La durée médiane estimée pour atteindre un nombre de PNN supérieur ou égal à  $500/\text{mm}^3$  et un taux de plaquettes supérieur ou égal à  $50\,000/\text{mm}^3$  est respectivement de 20 (EIQ : 17 - 25) et 26 jours (EIQ : 18 - 43). En analyse multivariée, la réactivation de l'HHV6, l'administration de SAL, un greffon issu d'un donneur non-apparenté et un conditionnement MA sont associés à un retard de prise de greffe des plaquettes (Tableau 4, figure 4). En revanche, l'HHV6 ne semble pas avoir d'impact sur la prise de greffe des PNN.

**Figure 4. Jour de la prise de greffe des plaquettes selon la présence d'une réactivation de l'HHV6 († Test de Mann-Whitney).**



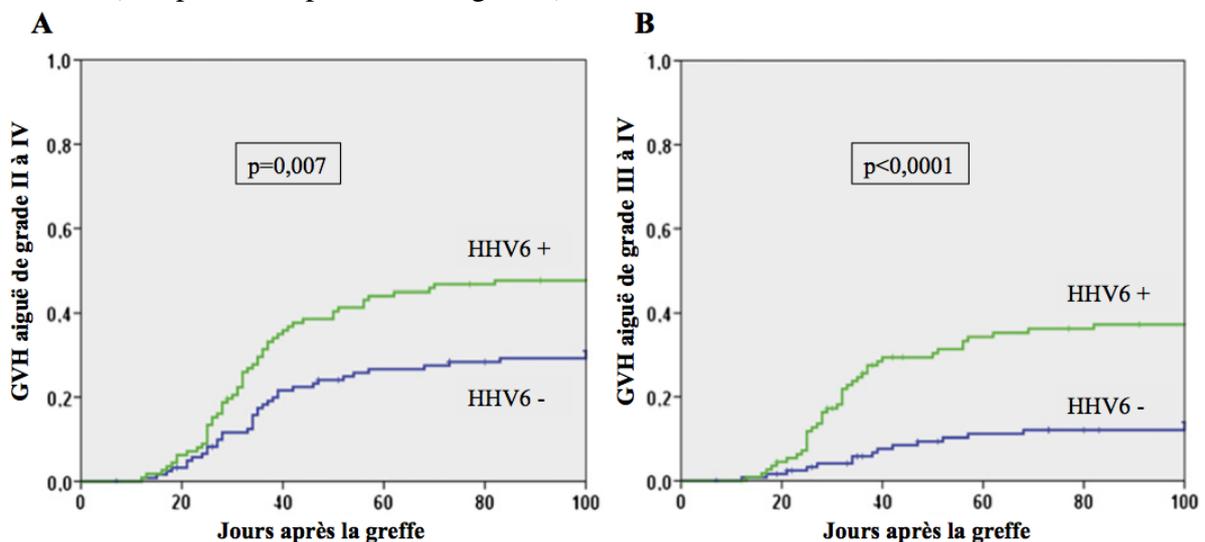
*Abréviations:* HHV6 : herpèsvirus humain 6 ; HHV6+ : réactivation de l'HHV6 ; HHV6- : pas de réactivation de l'HHV6

Dans une seconde analyse, nous avons considéré uniquement les patients ayant une PCR HHV6 positive avant la prise de greffe des PNN (n=36) ou celle des plaquettes (n=65), une réactivation survenant après la prise de greffe ne pouvant par définition influencer cette dernière. La durée médiane estimée pour atteindre une prise de greffe des PNN et des plaquettes chez ces patients du groupe A est respectivement de 29 (EIQ : 22,5 - 39,5) et 48 jours (EIQ : 28 - 112) alors qu'elle est de 20 (EIQ : 16 - 25) et 22 jours (EIQ : 15 - 33) chez

l'ensemble des patients du groupe B ( $p < 0,001$  et  $p < 0,001$ ). Ainsi, la survenue d'une réactivation de l'HHV6 pendant la période d'aplasie semble associée à un retard significatif de la prise de greffe des PNN et des plaquettes.

Le diagnostic de GVH aiguë (grade  $\geq$  II) a été établi chez 90 (38%) des 235 patients dont 56 cas de GVH de grade III ou IV. En analyse multivariée (Tableau 4), les principaux facteurs associés au développement d'une GVH de grade II à IV sont la réactivation de l'HHV6 [RR=1,59; IC 95% : 1,04 – 2,43] et un greffon issu d'un donneur non-apparenté [RR=2,5; IC 95% : 1,59 – 3,91]. En outre, les patients du groupe A ont présenté une GVH sévère de grade III à IV plus fréquemment que les patients du groupe B (respectivement 36% contre 13%), et plus précocement (avec respectivement une médiane de 32 et 39 jours après la greffe) ( $p < 0,0001$ , figure 5).

**Figure 5. Incidence cumulée de GVH aiguë selon la présence d'une réactivation de l'HHV6 (comparaisons par test de log-rank).**



(A) GVH aiguë de grade II à IV ; (B) GVH aiguë de grade III à IV.

*Abbreviations:* GVH : graft-versus-host disease, réaction du greffon contre l'hôte ; HHV6 : herpèsvirus humain 6 ; HHV6+ : réactivation de l'HHV6 ; HHV6- : pas de réactivation de l'HHV6.

**Tableau 4. Analyses multivariées des facteurs associés à la prise de greffe des plaquettes, l'OS et l'EFS à J180, et la GVH aiguë de grade II à IV (risque relatif, intervalle de confiance à 95% et valeur p par test de log-rank).**

	Retard de prise de greffe des plaquettes		GVH aiguë (grade II à IV)		OS (J180)		EFS (J180)	
	RR (IC 95%)	p	RR (IC 95%)	p	RR (IC 95%)	p	RR (IC 95%)	p
<b>PCR HHV6</b>								
Négative	1		1		1		1	
Positive	1,60 (1,23-2,10)	0,001	1,59 (1,04-2,43)	0,031	2,1 (1,05-4,03)	0,035	1,68 (1,01-2,79)	0,044
<b>Donneur</b>								
Familial	1		1		1			
Non-apparenté	1,72 (1,32- 2,27)	<0,001	2,5 (1,59-3,91)	<0,001	2,8 (1,28-6,02)	0,010		_a
<b>Conditionnement</b>								
Non myéloablatif	1							
Myéloablative	2,18 (1,64-2,90)	<0,001		–		–		–
Sans SAL	1				1		1	
Avec SAL	1,52 (1,03-2,24)	0,027		–	2,5 (1,24-5,03)	0,011	2,20 (1,24-3,91)	0,007
<b>Âge du receveur</b>								
≤ 45 ans					1		1	
> 45 ans		–		–	2,1 (1,1-4,01)	0,025	2,22 (1,34-3,67)	0,002

*Abréviations:* OS : overall survival, survie globale ; EFS : event-free survival, survie sans évènement ; J180 : 180 jours après la greffe ; GVH : graft-versus-host disease, réaction du greffon contre l'hôte ; RR : risque relatif ; IC 95% : intervalle de confiance à 95% ; PCR HHV6 : human herpesvirus 6 quantitative real-time polymerase chain reaction, réaction de polymérase en chaîne pour l'herpèsvirus humain 6 ; SAL : sérum anti-lymphocytaire (thymoglobulines).

Tous les paramètres des analyses univariées (tableau 3) ayant une valeur  $p < 0,10$  ont été introduits dans une analyse multivariée par régression linéaire à risque proportionnel selon le modèle de Cox.

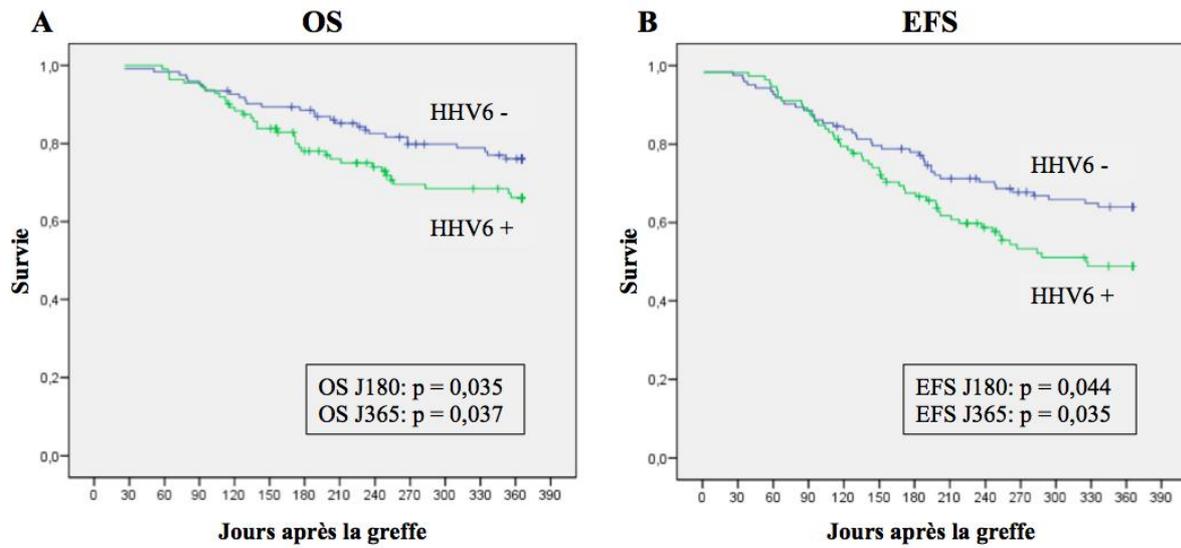
a- Variables à faible valeur pronostique ( $p > 0,05$ ), non retenues dans le modèle de Cox final.

Dans une seconde analyse, nous avons exclu les 18 patients qui ont développé une GVH aiguë avant la survenue d'une réactivation de l'HHV6 (en d'autres termes, ceux pour qui cette dernière n'a pas pu favoriser la survenue d'une GVH aiguë). En analyse multivariée, les

principaux facteurs associés au développement d'une GVH aiguë de grade III à IV sont la réactivation antérieure de l'HHV6 [RR=2,09; IC 95%: 1,09 – 3,99] et une source de cellules souches autre que la MO [RR=2,70; IC 95%: 1,39 – 5,56]. On peut également noter que la réactivation antérieure du CMV n'est pas associée significativement à l'apparition d'une GVH aiguë.

Les taux à J180 de OS, EFS, rechute et NRM sont respectivement de 84%, 73%, 19% et 8%. Aucune différence significative en terme de rechute et de NRM n'a été observée entre les deux groupes. En revanche, l'OS à J180 dans le groupe B (89%) est supérieure à celle du groupe A (79%) (p=0,04). En analyse multivariée, les principaux facteurs associés à une OS à J180 défavorable sont la réactivation de l'HHV6 [RR=2,1; IC 95%: 1,05 – 4,03], un greffon issu d'un donneur non-apparenté [RR=2,8; IC 95%: 1,28 – 6,02], l'administration de SAL [RR: 2,5; IC 95%: 1,24 – 5,03] et l'âge du receveur supérieur à 45 ans [RR= 2,1; IC 95%: 1,1 – 4,01]. De plus, la réactivation de l'HHV6 [RR=1,7; IC 95%: 1,01 – 2,78], l'âge du receveur supérieur à 45 ans [RR=2,22; IC 95%: 1,34 – 3,67] et l'administration de SAL [RR=2,20; IC 95%: 1,24 – 3,91] semblent influencer négativement l'EFS à J180. Des résultats similaires ont été observés pour l'OS et l'EFS à 1 an (en censurant les patients sans évènement à J365) (Figure 6).

**Figure 6. OS et EFS à 6 mois et 1 an selon la présence d'une réactivation de l'HHV6 (comparaisons par test de log-rank).**



(A) OS : overall survival, survie globale ; (B) EFS : event-free survival, survie sans évènement.

*Abréviations:* HHV6 : herpèsvirus humain 6 ; HHV6+ : réactivation de l'HHV6 ; HHV6- : pas de réactivation de l'HHV6 ; J180 et J365 : jour 180 et jour 365 après la greffe.

## DISCUSSION

A notre connaissance, cette étude porte sur l'une des plus grandes cohortes de patients permettant d'analyser les conséquences cliniques de la réactivation de l'HHV6 après allogreffe de CSH. Conformément aux données de la littérature, elle confirme que l'HHV6 est un pathogène fréquent après la greffe de CSH (144–147,150,154,155) puisque 58% des 235 patients testés ont eu au moins une PCR HHV6 positive. Nous avons étudié la réactivation précoce en arrêtant la période considérée à l'emblématique « J100 » pour plusieurs raisons. D'une part, c'est à cette date que la décroissance des traitements immunosuppresseurs commence, rendant le risque de réactivation plus faible et par voie de conséquence la surveillance des PCR HHV6 moins systématique. D'autre part, cette étude s'intéresse plus particulièrement aux liens entre l'HHV6 et la GVH aiguë ; cette dernière apparaissant classiquement dans les 100 premiers jours suivant la greffe, les réactivations plus tardives ne peuvent contribuer à son développement. Enfin, les réactivations ont débuté dans 82% des cas avant J100, alors qu'après cette date, leur survenue s'étale sur une très longue période (J103 à J669).

La surveillance de la charge virale de l'HHV6 a d'abord été réalisée par une technique de PCR « maison » (138), entre 2004 et 2007, puis en utilisant un kit commercial (139). Les résultats sont exprimés différemment selon la technique, mais la sensibilité et la spécificité des seuils de détection sont similaires. La PCR HHV6 est positive chez 57 des 113 patients testés par la première méthode, et chez 55 des 122 patients testés après janvier 2007 ( $p=0,489$ ). Bien que l'étendue des charges virales mesurées soit importante avec chacune des techniques (avec la PCR « maison » : médiane de 397 copies/mg d'ADN, étendue de 5 à 259 435 ; avec le kit commercial : médiane de 2570 copies/mL de sang total, étendue de 50 à 10

440 000), aucune corrélation n'a été retrouvée entre la charge virale dans le sang et les conséquences cliniques et biologiques pour les patients que ce soit en terme de nombre ou de gravité des symptômes, prise de greffe, fréquence et sévérité de la GVH aiguë, OS ou EFS. Par ailleurs, la comparaison des patients ayant une charge virale très faible (<50 copies/mg d'ADN avant 2007 ou <500 copies/mL de sang total à partir de janvier 2007) avec ceux ayant une charge plus élevée n'a montré aucune différence significative pour ces mêmes paramètres d'évolution. Il en résulte qu'il ne semble d'une part pas exister de seuil défini au-delà duquel une stratégie thérapeutique préemptive pourrait être recommandée. D'autre part, toute réactivation de l'HHV6, quelle que soit l'importance de la charge virale, devrait amener le clinicien à s'interroger sur son éventuelle pathogénicité.

Nous avons identifié une intégration chromosomique de l'HHV6 chez un seul patient. Le diagnostic a été rendu possible après avoir analysé des prélèvements sanguin et médullaire du donneur. La prévalence de l'intégration chromosomique de l'HHV6 dans notre service entre 2004 et 2009 est donc de 0,4% alors qu'elle est de l'ordre de 1% dans le monde (167–169). Ce diagnostic doit être suspecté lorsque la charge virale est supérieure ou égale à 6 millions de copies par millilitres de sang total. Par ailleurs, les prélèvements que nous effectuons systématiquement chez le donneur et le receveur en pré-greffe depuis 2009 permettent de dépister une intégration chromosomique. Un traitement antiviral est alors inutile car le virus est simplement présent à l'état latent. Néanmoins, pour certains auteurs (124,170) il semblerait que l'HHV6 puisse dans un second temps devenir prolifératif et jouer un rôle pathogène même après avoir été intégré aux télomères. En cas de symptômes évocateurs d'une infection par l'HHV6, et après avoir écarté les diagnostics différentiels, un traitement antiviral peut alors être envisagé. Dans le cas de notre patient, une réactivation du CMV

concomitante nous a conduit à mettre en route un traitement antiviral, sans efficacité sur la charge virale HHV6, ni sur la maladie à CMV.

Nos résultats ont identifié le conditionnement MA comme le seul facteur de risque indépendant de réactivation de l'HHV6, conformément à ceux de Chevallier et al (171). Il induit une immunosuppression plus profonde et plus prolongée, propice également aux infections opportunistes ou à d'autres virus (172,173). Néanmoins, contrairement à d'autres publications, une incompatibilité HLA (152,156,174), un greffon issu d'un donneur non-apparenté (154,155,174,175), une incompatibilité de sexe (147), une réactivation du CMV (150,152,176), ou une administration de SAL (177) ne semblent pas favoriser la réactivation de l'HHV6. La diversité des facteurs de risques retrouvés peut s'expliquer par la faible taille des effectifs et la variété des conditionnements utilisés.

De même, par opposition à d'autres études (130,178), les greffons de CSH d'origine médullaire ne sont pas associés à une réactivation plus fréquente de l'HHV6 dans notre population. Cependant, nous observons une tendance protectrice des CSP et une association entre les greffons de SP et un taux plus élevé de réactivation de l'HHV6. Ce dernier constat a été émis dans d'autres publications (171,115,179,155,175), et peut s'expliquer par la prise de greffe plus tardive et l'extrême immaturité des lymphocytes T issus de SP (24,180).

La réactivation de l'HHV6 est fortement associée à un retard de prise de greffe des plaquettes dans notre cohorte, confirmant ainsi ce qui est décrit dans la majorité des publications (130,147,156,157,171,174,177,178) bien que discuté (150,181,182). Nous observons, par ailleurs, qu'elle pourrait également être liée à une prise de greffe des PNN plus tardive, comme l'ont rapporté Imbert-Marcille BM et al (157). Parmi les possibles mécanismes de ces

cytopénies prolongées, il a été montré que l'HHV6 peut infecter les progéniteurs hématopoïétiques et diminuer la formation de colonies *in vitro* (183,184).

Il peut être difficile de distinguer les symptômes imputables à la réactivation de l'HHV6 de ceux de la GVH aiguë. A cet égard, nous avons procédé à une description détaillée des symptômes des patients présentant une réactivation de l'HHV6 en l'absence de GVH. Ceci a été rendu possible grâce à notre attitude attentiste qui consiste à ne pas initier dans l'urgence un traitement immunosuppresseur additionnel lorsque les patients ont un tableau clinique atypique (diarrhée isolée, rash cutané épargnant les paumes des mains et les plantes des pieds) et non sévère. Environ la moitié d'entre eux ont de la fièvre (n=30) et/ou une diarrhée (n=30), et 28% ont un rash cutané (n=15) (Tableau 2). En d'autres termes, on peut considérer *a posteriori* que notre prise en charge a effectivement permis d'épargner à ces patients un traitement immunosuppresseur par corticoïdes, ainsi que ses potentielles conséquences infectieuses, osseuses ou endocriniennes. De même, une réactivation de l'HHV6 a été observée chez 58 patients traités pour GVH aiguë, dont 11 ont reçu un traitement antiviral par ganciclovir ou foscarnet. L'évolution a été favorable pour 10 d'entre eux, conduisant ainsi à ne pas initier de traitement immunosuppresseur de 2<sup>ème</sup> ou 3<sup>ème</sup> ligne, selon les cas. En l'absence de symptomatologie mettant en jeu le pronostic vital, nous estimons donc que le diagnostic différentiel de réactivation de l'HHV6 doit être considéré devant un tableau clinique atypique pour une GVH aiguë. Un traitement immunosuppresseur ne devrait alors pas être débuté sans connaître les résultats des PCR virales et de l'examen anatomopathologique des biopsies.

Le rôle de la réactivation de l'HHV6 vis-à-vis de la GVH aiguë est largement débattu dans la littérature (130,146,147,153–157,171,181,185). Dans notre étude, les analyses multivariées

ont révélé une association significative entre la GVH aiguë et la réactivation de l'HHV6. Le risque relatif est en outre plus élevé avec les GVH aiguës les plus sévères (grade III à IV). Par ailleurs, chez la majorité (53%) des 58 patients qui ont présenté une réactivation de l'HHV6 et une GVH aiguë (concomitantes ou non), la PCR HHV6 est chronologiquement positive avant l'initiation du traitement de la GVH aiguë. La réactivation antérieure de l'HHV6 est, de plus, un des principaux facteurs de risques indépendants de développement d'une GVH aiguë de grade III à IV en analyse multivariée. Nos résultats, en accord avec d'autres études (146,147,155,185), suggèrent non seulement que la réactivation de l'HHV6 ne serait pas nécessairement la conséquence d'un traitement immunosuppresseur additionnel, mais encore qu'elle pourrait jouer un rôle déclencheur (de « gâchette ») de la GVH aiguë.

D'un point de vue physiopathologique, il semblerait que le développement de la GVH aiguë puisse être favorisé par les lésions tissulaires causées par le conditionnement de la greffe ainsi que par les chimiothérapies antérieures (2,186,187). De manière analogue à ce qu'il a été rapporté avec d'autres virus herpétiques (2), les réponses inflammatoires associées à la réactivation de l'HHV6 (lésions lytiques et lymphoprolifération) pourraient aggraver ces lésions tissulaires (145). Par ailleurs, l'HHV6 pourrait interférer avec le système immunitaire par le biais de mécanismes complexes (188). Les monocytes et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont les principales cibles de sa réplication (189). Pendant la phase lytique, l'HHV6 perturberait les réponses immunes associées, de même que la reconstitution immunitaire (190,191). Les HLA de classe I et II seraient également régulés de manière positive par l'infection à HHV6 (151). Cela induirait une prolifération et une activation des lymphocytes T alloréactifs du donneur, comme cela a été montré avec le CMV (101). Enfin, la réactivation de l'HHV6 altérerait radicalement le relargage des cytokines et chimiokines en augmentant notamment la production de l'interleukine-1 bêta ou du facteur de nécrose tumorale alpha, connus pour

délivrer des signaux pro-inflammatoires (192). Ce virus exprime aussi des récepteurs de cytokines homologues qui pourraient participer au recrutement de cellules présentatrices d'antigènes (193). Finalement, par ces multiples actions sur la prolifération et la régulation des lymphocytes T cytotoxiques, l'HHV6 pourrait entraîner, directement ou indirectement, l'apparition de la GVH aiguë. Toutefois, il semble aussi que la relation de causalité puisse dans certains cas être inversée, le déficit immunitaire induit par la GVH et/ou son traitement favorisant la réactivation de l'HHV6, comme cela a été décrit pour d'autres virus (194).

Un diagnostic syndromique définissant la symptomatologie clinique de la réactivation de l'HHV6 n'est pour le moment pas clairement établi (110,144–146,150,195). Dans notre étude, cette réactivation semble accompagnée de symptômes chez 95% des patients. L'incidence des réactivations asymptomatiques pourrait cependant être sous-estimée étant donné que les PCR HHV6 ont été réalisées plus fréquemment chez les patients présentant des symptômes après la période initiale d'hospitalisation. Ce biais paraît néanmoins peu conséquent puisque nous avons observé la même proportion de réactivations symptomatiques chez les patients ayant au moins une PCR HHV6 positive avant J27 (jour médian de la réactivation), que chez les patients débutant une réactivation après J27, lorsque la surveillance des PCR HHV6 a été moins systématique.

Par ailleurs, nous avons observé des complications cliniques sévères pendant la période de réactivation de l'HHV6. Des troubles neurologiques ont été observés chez 11% des patients (n=12), dont deux encéphalites avec une PCR HHV6 positive dans le LCR et quatre sujets atteints crises convulsives généralisées. Dans une étude japonaise portant sur 197 patients allogreffés, 4% des patients ont présenté une encéphalite à HHV6. Leur suivi à long terme a révélé que des séquelles neurocognitives persistent chez tous ces patients, affectant durablement leur qualité de vie (196). Une étude prospective a récemment montré une

association significative entre la réactivation de l'HHV6 et l'apparition de désordres touchant le système nerveux central, tel que des troubles neuropsychiatriques à type de délire ou un déclin neurocognitif persistant (175). Si la pathogénicité de la réactivation de l'HHV6 sur le système nerveux central est largement décrite dans la littérature (114–116,148,149,175,196,197), sa réalité est moins consensuelle pour les autres atteintes d'organes (117), et plus particulièrement en ce qui concerne les pneumopathies.

Quinze de nos patients ayant une PCR HHV6 positive dans le sang ont présenté une pneumopathie non documentée. L'HHV6 a été retrouvé dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire d'un patient, dans le liquide pleural d'un autre patient (dont l'évolution a été favorable après traitement par foscarnet), mais n'a pas été recherché dans les autres cas. Une étude rétrospective chez 29 patients allogreffés pour lesquels l'HHV6 a été détecté dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire montre qu'il existe un ou plusieurs co-pathogènes dans 86% des cas. Néanmoins, pour quatre patients le diagnostic de pneumopathie à HHV6 a été établi et les symptômes ont complètement régressé sous foscarnet (113).

Une des limites évidentes de notre étude est que l'HHV6 n'a que rarement été recherché sur les biopsies de tissus ou dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire et des séreuses. Néanmoins, lorsqu'une PCR HHV6 a été effectuée, elle a été le plus souvent positive. Ce constat nous conduit à penser que l'HHV6 devrait être recherché plus systématiquement dans ces différents prélèvements, l'existence d'un différentiel avec la charge virale dans le sang pouvant alors aider à déterminer si l'HHV6 est impliqué dans la pathologie (117).

Même en l'absence d'autre étiologie retrouvée, ce travail ne suffit cependant pas à démontrer que l'HHV6 est responsable de l'ensemble des symptômes concomitants à la réactivation. Seules une analyse immunohistochimique et/ou une quantification de l'ARN de l'HHV6 dans les tissus concernés auraient pu le confirmer, mais ces examens ne sont pas réalisables en routine actuellement. Néanmoins, la chronologie des symptômes couplée à l'évolution

croissante de la charge virale, la présence du virus dans les organes atteints, de même que la réponse au traitement antiviral, peuvent suggérer un lien avec la réactivation de l'HHV6. Nous considérons donc qu'en présence des symptômes rapportés dans le tableau 2, et plus particulièrement ceux des patients qui n'ont pas développé de GVH aiguë, une recherche de l'HHV6 devrait être effectuée par PCR.

A l'exception de l'encéphalite (158) les recommandations et critères pour initier un traitement antiviral devant des manifestations liées à l'HHV6 ne sont pas clairement établis (99). Dans notre étude, une disparition complète des symptômes a été observée en un mois chez 84% des patients traités et la charge virale a diminué significativement dans 89% des cas. Bien que ce travail n'ait pas été conçu pour évaluer l'efficacité du traitement, la durée de la réactivation de l'HHV6 est plus courte chez les patients traités. Ces résultats sont d'autant plus encourageants que les patients que nous avons décidé de traiter ont des charges virales plus élevées et un tableau clinique plus sévère que les autres : ils ont plus de symptômes ( $p=0,03$ ) et développent plus souvent une GVH aiguë ( $p=0,045$  pour la GVH aiguë de grade II à IV et  $p=0,02$  pour les grades III à IV). Il n'y a pas de différence en terme de survie selon qu'un traitement ait été administré ou non, mais les disparités cliniques entre ces deux sous-groupes de patients ne permettent pas de les comparer sur ce critère. Enfin, nous ne pouvons recommander un traitement antiviral plus qu'un autre, notre choix reposant essentiellement sur leurs profils de toxicité respectifs. Aucune des deux drogues utilisées n'a démontré de supériorité *in vitro* ou *in vivo* (117,159–162), et seul un essai thérapeutique prospectif contrôlé permettrait d'apporter des précisions sur leur efficacité et la durée d'administration nécessaire.

Enfin, en accord avec d'autres études (147,181), nous confirmons que la réactivation de l'HHV6 est associée à une augmentation de la mortalité précoce. L'imputabilité exacte du virus n'est cependant pas clairement déterminée puisque la majorité des patients décèdent alors que la charge virale semble contrôlée. Par ailleurs, contrairement à d'autres auteurs (181), nous n'avons pas observé de différence significative sur la NRM. Ceci peut s'expliquer par la faiblesse relative du taux de NRM chez l'ensemble de nos patients (4,3% à J100, 7,5% à 6 mois et 12% à un an, soit respectivement 10, 19 et 28 patients décédés) comparée aux autres études. Une analyse sur un plus grand nombre de patients pourrait éventuellement permettre d'observer une différence statistique. Compte tenu de l'impact pronostique défavorable en termes de morbidité et de mortalité de la réactivation de l'HHV6 après allogreffe de CSH, d'autres études nous paraissent, en outre, nécessaires afin de mieux déterminer les stratégies diagnostiques et thérapeutiques.

## CONCLUSION

Cette étude a mis en évidence deux facteurs qui semblent avoir un rôle protecteur vis-à-vis de la réactivation de l'HHV6 après allogreffe de CSH : le conditionnement NMA et un greffon issu de CSP. Par ailleurs, la réactivation précoce de l'HHV6 est rarement asymptomatique et peut entraîner des complications cliniques sévères telles que des encéphalites. Sa pathogénicité est parfois plus délicate à relever dans d'autres atteintes d'organes ; elle nécessite d'effectuer une PCR sur les prélèvements tissulaires et liquidiens et reste un diagnostic d'exclusion. Elle est associée à un retard de prise de greffe des plaquettes, au développement de la GVH aiguë et à une augmentation de la mortalité dans les six premiers mois après la greffe.

Enfin, certains symptômes liés à la réactivation de l'HHV6 peuvent évoquer une GVH aiguë. La surveillance de la charge virale par PCR paraît donc nécessaire et, en l'absence de symptomatologie mettant en jeu le pronostic vital, le diagnostic différentiel de réactivation de l'HHV6 doit être considéré devant un tableau clinique de GVH aiguë atypique.

Afin d'améliorer la prise en charge des patients et de diminuer la morbidité et la mortalité liée à la réactivation précoce de l'HHV6, d'autres investigations seraient utiles. Leur but serait d'une part de mieux déterminer le lien de causalité entre l'HHV6 et ses manifestations cliniques, et d'autre part de mieux définir les stratégies thérapeutiques.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Thomas ED. Bone marrow transplantation: a review. *Semin. Hematol.* 1999 Oct;36(4 Suppl 7):95–103.
2. Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet.* 2009 May 2;373(9674):1550–61.
3. Bacigalupo A, Sormani MP, Lamparelli T, Gualandi F, Occhini D, Bregante S, et al. Reducing transplant-related mortality after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2004 Oct;89(10):1238–47.
4. Thomas ED, Lochte HL Jr, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* 1957 Sep 12;257(11):491–6.
5. Passweg JR, Baldomero H, Gratwohl A, Bregni M, Cesaro S, Dreger P, et al. The EBMT activity survey: 1990-2010. *Bone Marrow Transplant.* 2012 Jul;47(7):906–23.
6. Sorror ML, Maris MB, Storb R, Baron F, Sandmaier BM, Maloney DG, et al. Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. *Blood.* 2005 Oct 15;106(8):2912–9.
7. Michallet M. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantations. *Transfus Clin Biol.* 2011 Apr;18(2):235–45.
8. Flomenberg N, Baxter-Lowe LA, Confer D, Fernandez-Vina M, Filipovich A, Horowitz M, et al. Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome. *Blood.* 2004 Oct 1;104(7):1923–30.
9. Morishima Y, Sasazuki T, Inoko H, Juji T, Akaza T, Yamamoto K, et al. The clinical significance of human leukocyte antigen (HLA) allele compatibility in patients receiving a marrow transplant from serologically HLA-A, HLA-B, and HLA-DR matched unrelated donors. *Blood.* 2002 Jun 1;99(11):4200–6.
10. Spellman SR, Eapen M, Logan BR, Mueller C, Rubinstein P, Setterholm MI, et al. A perspective on the selection of unrelated donors and cord blood units for transplantation. *Blood.* 2012 Jul 12;120(2):259–65.
11. Lee SJ, Klein J, Haagenson M, Baxter-Lowe LA, Confer DL, Eapen M, et al. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood.* 2007 Dec 15;110(13):4576–83.
12. Yakoub-Agha I, Mesnil F, Kuentz M, Boiron JM, Ifrah N, Milpied N, et al. Allogeneic marrow stem-cell transplantation from human leukocyte antigen-identical siblings versus human leukocyte antigen-allelic-matched unrelated donors (10/10) in patients with standard-risk hematologic malignancy: a prospective study from the French Society of Bone Marrow Transplantation and Cell Therapy. *J. Clin. Oncol.* 2006 Dec

20;24(36):5695–702.

13. Nannya Y, Kataoka K, Hangaishi A, Imai Y, Takahashi T, Kurokawa M. The negative impact of female donor/male recipient combination in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation depends on disease risk. *Transpl. Int.* 2011 May;24(5):469–76.
14. George B, Pati N, Gilroy N, Ratnamohan M, Huang G, Kerridge I, et al. Pre-transplant cytomegalovirus (CMV) serostatus remains the most important determinant of CMV reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the era of surveillance and preemptive therapy. *Transpl Infect Dis.* 2010 Aug 1;12(4):322–9.
15. Couban S, Simpson DR, Barnett MJ, Bredeson C, Hubesch L, Howson-Jan K, et al. A randomized multicenter comparison of bone marrow and peripheral blood in recipients of matched sibling allogeneic transplants for myeloid malignancies. *Blood.* 2002 Sep 1;100(5):1525–31.
16. Blaise D, Kuentz M, Fortanier C, Bourhis JH, Milpied N, Sutton L, et al. Randomized trial of bone marrow versus lenograstim-primed blood cell allogeneic transplantation in patients with early-stage leukemia: a report from the Société Française de Greffe de Moelle. *J. Clin. Oncol.* 2000 Feb;18(3):537–46.
17. Bensinger WI, Martin PJ, Storer B, Clift R, Forman SJ, Negrin R, et al. Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers. *N. Engl. J. Med.* 2001 Jan 18;344(3):175–81.
18. Schmitz N, Beksac M, Hasenclever D, Bacigalupo A, Ruutu T, Nagler A, et al. Transplantation of mobilized peripheral blood cells to HLA-identical siblings with standard-risk leukemia. *Blood.* 2002 Aug 1;100(3):761–7.
19. Allogeneic peripheral blood stem-cell compared with bone marrow transplantation in the management of hematologic malignancies: an individual patient data meta-analysis of nine randomized trials. *J. Clin. Oncol.* 2005 Aug 1;23(22):5074–87.
20. Rocha V, Wagner JE, Sobocinski KA, Klein JP, Zhang M-J, Horowitz MM, et al. Graft-Versus-Host Disease in Children Who Have Received a Cord-Blood or Bone Marrow Transplant from an HLA-Identical Sibling. *New England Journal of Medicine.* 2000 Jun 22;342(25):1846–54.
21. Kurtzberg J, Laughlin M, Graham ML, Smith C, Olson JF, Halperin EC, et al. Placental Blood as a Source of Hematopoietic Stem Cells for Transplantation into Unrelated Recipients. *New England Journal of Medicine.* 1996 Jul 18;335(3):157–66.
22. Barker JN, Byam C, Scaradavou A. How I treat: the selection and acquisition of unrelated cord blood grafts. *Blood.* 2011 Feb 24;117(8):2332–9.
23. Herr A-L, Kabbara N, Bonfim CMS, Teira P, Locatelli F, Tiedemann K, et al. Long-term follow-up and factors influencing outcomes after related HLA-identical cord blood transplantation for patients with malignancies: an analysis on behalf of Eurocord-EBMT. *Blood.* 2010 Sep 16;116(11):1849–56.
24. Gluckman E, Rocha V, Arcese W, Michel G, Sanz G, Chan K-W, et al. Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice. *Exp.*

Hematol. 2004 Apr;32(4):397–407.

25. Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R, et al. Outcome of Cord-Blood Transplantation from Related and Unrelated Donors. *New England Journal of Medicine*. 1997 Aug 7;337(6):373–81.
26. Takahashi S, Iseki T, Ooi J, Tomonari A, Takasugi K, Shimohakamada Y, et al. Single-institute comparative analysis of unrelated bone marrow transplantation and cord blood transplantation for adult patients with hematologic malignancies. *Blood*. 2004 Dec 1;104(12):3813–20.
27. Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P, Wagner JE, Zhang M-J, Champlin RE, et al. Outcomes after Transplantation of Cord Blood or Bone Marrow from Unrelated Donors in Adults with Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2004 Nov 25;351(22):2265–75.
28. Rocha V, Labopin M, Sanz G, Arcese W, Schwerdtfeger R, Bosi A, et al. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N. Engl. J. Med*. 2004 Nov 25;351(22):2276–85.
29. Goldstein G, Elhasid R, Bielgorai B, Shimoni A, Yerushalmi R, Kassis I, et al. Adults requiring cord blood transplants but have insufficient cell doses from a single cord blood unit can receive two units with successful engraftment kinetics similar to those of children receiving a single unit. *Leuk. Lymphoma*. 2011 Apr;52(4):635–41.
30. Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, Blazar BR, McGlave PB, Miller JS, et al. Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood*. 2005 Feb 1;105(3):1343–7.
31. Clift RA, Buckner CD, Appelbaum FR, Bearman SI, Petersen FB, Fisher LD, et al. Allogeneic marrow transplantation in patients with acute myeloid leukemia in first remission: a randomized trial of two irradiation regimens. *Blood*. 1990 Nov 1;76(9):1867–71.
32. Thomas ED, Buckner CD, Banaji M, Clift RA, Fefer A, Flournoy N, et al. One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation. *Blood*. 1977 Apr;49(4):511–33.
33. Curtis RE, Rowlings PA, Deeg HJ, Shriner DA, Socie G, Travis LB, et al. Solid cancers after bone marrow transplantation. *N. Engl. J. Med*. 1997 Mar 27;336(13):897–904.
34. Socie G, Curtis RE, Deeg HJ, Sobocinski KA, Filipovich AH, Travis LB, et al. New malignant diseases after allogeneic marrow transplantation for childhood acute leukemia. *J. Clin. Oncol*. 2000 Jan;18(2):348–57.
35. Davies SM, Ramsay NK, Klein JP, Weisdorf DJ, Bolwell B, Cahn JY, et al. Comparison of preparative regimens in transplants for children with acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol*. 2000 Jan;18(2):340–7.
36. Granados E, de La Cámara R, Madero L, Díaz MA, Martín-Regueira P, Steegmann JL, et al. Hematopoietic cell transplantation in acute lymphoblastic leukemia: better long term event-free survival with conditioning regimens containing total body irradiation.

Haematologica. 2000 Oct;85(10):1060–7.

37. Storb R, Raff RF, Appelbaum FR, Deeg HJ, Graham TC, Schuening FG, et al. DLA-identical bone marrow grafts after low-dose total body irradiation: the effect of canine recombinant hematopoietic growth factors. *Blood*. 1994 Nov 15;84(10):3558–66.
38. Spitzer TR, McAfee S, Sackstein R, Colby C, Toh HC, Multani P, et al. Intentional induction of mixed chimerism and achievement of antitumor responses after nonmyeloablative conditioning therapy and HLA-matched donor bone marrow transplantation for refractory hematologic malignancies. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 2000;6(3A):309–20.
39. Slavin S, Nagler A, Naparstek E, Kapelushnik Y, Aker M, Cividalli G, et al. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood*. 1998 Feb 1;91(3):756–63.
40. Storb RF, Champlin R, Riddell SR, Murata M, Bryant S, Warren EH. Non-myeloablative transplants for malignant disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2001;375–91.
41. Kassim AA, Chinratanalab W, Ferrara JLM, Mineishi S. Reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute leukemias: “what is the best recipe?” *Bone Marrow Transplant*. 2005 Oct;36(7):565–74.
42. Sorror ML, Sandmaier BM, Storer BE, Franke GN, Laport GG, Chauncey TR, et al. Long-term outcomes among older patients following nonmyeloablative conditioning and allogeneic hematopoietic cell transplantation for advanced hematologic malignancies. *JAMA*. 2011 Nov 2;306(17):1874–83.
43. Aoudjhane M, Labopin M, Gorin NC, Shimoni A, Ruutu T, Kolb H-J, et al. Comparative outcome of reduced intensity and myeloablative conditioning regimen in HLA identical sibling allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for patients older than 50 years of age with acute myeloblastic leukaemia: a retrospective survey from the Acute Leukemia Working Party (ALWP) of the European group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Leukemia*. 2005 Dec;19(12):2304–12.
44. Ringdén O, Labopin M, Ehninger G, Niederwieser D, Olsson R, Basara N, et al. Reduced intensity conditioning compared with myeloablative conditioning using unrelated donor transplants in patients with acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol*. 2009 Sep 20;27(27):4570–7.
45. Andersson BS, de Lima M, Thall PF, Wang X, Couriel D, Korbling M, et al. Once daily i.v. busulfan and fludarabine (i.v. Bu-Flu) compares favorably with i.v. busulfan and cyclophosphamide (i.v. BuCy2) as pretransplant conditioning therapy in AML/MDS. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 2008 Jun;14(6):672–84.
46. Alatrash G, de Lima M, Hamerschlak N, Pelosini M, Wang X, Xiao L, et al. Myeloablative reduced-toxicity i.v. busulfan-fludarabine and allogeneic hematopoietic stem cell transplant for patients with acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome in the sixth through eighth decades of life. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 2011 Oct;17(10):1490–6.

47. Davies SM, Weisdorf DJ, Haake RJ, Kersey JH, McGlave PB, Ramsay NK, et al. Second infusion of bone marrow for treatment of graft failure after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1994 Jul;14(1):73–7.
48. Rosenfeld CS, Rybka WB, Weinbaum D, Carrigan DR, Knox KK, Andrews DF, et al. Late graft failure due to dual bone marrow infection with variants A and B of human herpesvirus-6. *Exp. Hematol.* 1995 Jul;23(7):626–9.
49. Steffens HP, Podlech J, Kurz S, Angele P, Dreis D, Reddehase MJ. Cytomegalovirus inhibits the engraftment of donor bone marrow cells by downregulation of hemopoietin gene expression in recipient stroma. *J. Virol.* 1998 Jun;72(6):5006–15.
50. Bretagne S, Vidaud M, Kuentz M, Cordonnier C, Henni T, Vinci G, et al. Mixed blood chimerism in T cell-depleted bone marrow transplant recipients: evaluation using DNA polymorphisms. *Blood.* 1987 Nov;70(5):1692–5.
51. Donohue J, Homge M, Kernan NA. Characterization of cells emerging at the time of graft failure after bone marrow transplantation from an unrelated marrow donor. *Blood.* 1993 Aug 1;82(3):1023–9.
52. Petersdorf EW, Hansen JA, Martin PJ, Woolfrey A, Malkki M, Gooley T, et al. Major-histocompatibility-complex class I alleles and antigens in hematopoietic-cell transplantation. *N. Engl. J. Med.* 2001 Dec 20;345(25):1794–800.
53. Weaver CH, Hazelton B, Birch R, Palmer P, Allen C, Schwartzberg L, et al. An analysis of engraftment kinetics as a function of the CD34 content of peripheral blood progenitor cell collections in 692 patients after the administration of myeloablative chemotherapy. *Blood.* 1995 Nov 15;86(10):3961–9.
54. Bacigalupo A. Hematopoietic stem cell transplants after reduced intensity conditioning regimen (RI-HSCT): report of a workshop of the European group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant.* 2000 Apr;25(8):803–5.
55. Bunjes D, Wiesneth M, Hertenstein B, Schmeiser T, Arnold R, Heit W. Graft failure after T cell-depleted bone marrow transplantation: clinical and immunological characteristics and response to immunosuppressive therapy. *Bone Marrow Transplant.* 1990 Nov;6(5):309–14.
56. Wolff SN. Second hematopoietic stem cell transplantation for the treatment of graft failure, graft rejection or relapse after allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2002 Apr;29(7):545–52.
57. Michallet M, Bilger K, Garban F, Attal M, Huyn A, Blaise D, et al. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation after nonmyeloablative preparative regimens: impact of pretransplantation and posttransplantation factors on outcome. *J. Clin. Oncol.* 2001 Jul 15;19(14):3340–9.
58. Sale GE, Alavaikko M, Schaeffers KM, Mahan CT. Abnormal CD4:CD8 ratios and delayed germinal center reconstitution in lymph nodes of human graft recipients with graft-versus-host disease (GVHD): an immunohistological study. *Exp. Hematol.* 1992 Sep;20(8):1017–21.

59. Goker H, Haznedaroglu IC, Chao NJ. Acute graft-vs-host disease: pathobiology and management. *Exp. Hematol.* 2001 Mar;29(3):259–77.
60. Iwasaki T, Fujiwara H, Iwasaki T, Shearer GM. Loss of proliferative capacity and T cell immune development potential by bone marrow from mice undergoing a graft-vs-host reaction. *J. Immunol.* 1986 Nov 15;137(10):3100–8.
61. Anderson KC, Weinstein HJ. Transfusion-associated graft-versus-host disease. *N. Engl. J. Med.* 1990 Aug 2;323(5):315–21.
62. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation.* 1974 Oct;18(4):295–304.
63. Cahn J-Y, Klein JP, Lee SJ, Milpied N, Blaise D, Antin JH, et al. Prospective evaluation of 2 acute graft-versus-host (GVHD) grading systems: a joint Société Française de Greffe de Moëlle et Thérapie Cellulaire (SFGM-TC), Dana Farber Cancer Institute (DFCI), and International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) prospective study. *Blood.* 2005 Aug 15;106(4):1495–500.
64. Loiseau P, Busson M, Balere M-L, Dormoy A, Bignon J-D, Gagne K, et al. HLA Association with hematopoietic stem cell transplantation outcome: the number of mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 is strongly associated with overall survival. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2007 Aug;13(8):965–74.
65. Ratanatharathorn V, Nash RA, Przepiorka D, Devine SM, Klein JL, Weisdorf D, et al. Phase III study comparing methotrexate and tacrolimus (prograf, FK506) with methotrexate and cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood.* 1998 Oct 1;92(7):2303–14.
66. Petersdorf EW, Longton GM, Anasetti C, Martin PJ, Mickelson EM, Smith AG, et al. The significance of HLA-DRB1 matching on clinical outcome after HLA-A, B, DR identical unrelated donor marrow transplantation. *Blood.* 1995 Aug 15;86(4):1606–13.
67. Barker JN, Wagner JE. Umbilical-cord blood transplantation for the treatment of cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2003 Jul;3(7):526–32.
68. Weisdorf D, Hakke R, Blazar B, Miller W, McGlave P, Ramsay N, et al. Risk factors for acute graft-versus-host disease in histocompatible donor bone marrow transplantation. *Transplantation.* 1991 Jun;51(6):1197–203.
69. Ferrara JL, Levy R, Chao NJ. Pathophysiologic mechanisms of acute graft-vs.-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 1999;5(6):347–56.
70. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science.* 2002 Apr 12;296(5566):301–5.
71. Reddy P, Maeda Y, Liu C, Krijanovski OI, Korngold R, Ferrara JLM. A crucial role for antigen-presenting cells and alloantigen expression in graft-versus-leukemia responses. *Nat. Med.* 2005 Nov;11(11):1244–9.
72. Storb R, Deeg HJ, Whitehead J, Appelbaum F, Beatty P, Bensinger W, et al.

- Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia. *N. Engl. J. Med.* 1986 Mar 20;314(12):729–35.
73. Ram R, Gafter-Gvili A, Yeshurun M, Paul M, Raanani P, Shpilberg O. Prophylaxis regimens for GVHD: systematic review and meta-analysis. *Bone Marrow Transplant.* 2009 Apr;43(8):643–53.
  74. Antin JH, Kim HT, Cutler C, Ho VT, Lee SJ, Miklos DB, et al. Sirolimus, tacrolimus, and low-dose methotrexate for graft-versus-host disease prophylaxis in mismatched related donor or unrelated donor transplantation. *Blood.* 2003 Sep 1;102(5):1601–5.
  75. Cutler C, Li S, Ho VT, Koreth J, Alyea E, Soiffer RJ, et al. Extended follow-up of methotrexate-free immunosuppression using sirolimus and tacrolimus in related and unrelated donor peripheral blood stem cell transplantation. *Blood.* 2007 Apr 1;109(7):3108–14.
  76. Holler E. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: GvHD prevention and treatment. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2007 Jun;20(2):281–94.
  77. Martin PJ, Schoch G, Fisher L, Byers V, Anasetti C, Appelbaum FR, et al. A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment. *Blood.* 1990 Oct 15;76(8):1464–72.
  78. Weisdorf D, Haake R, Blazar B, Miller W, McGlave P, Ramsay N, et al. Treatment of moderate/severe acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation: an analysis of clinical risk features and outcome. *Blood.* 1990 Feb 15;75(4):1024–30.
  79. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2005 Dec;11(12):945–56.
  80. Patriarca F, Skert C, Sperotto A, Damiani D, Cerno M, Geromin A, et al. Incidence, outcome, and risk factors of late-onset noninfectious pulmonary complications after unrelated donor stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2004 Apr;33(7):751–8.
  81. Marleau AM, Sarvetnick N. T cell homeostasis in tolerance and immunity. *J. Leukoc. Biol.* 2005 Sep;78(3):575–84.
  82. van den Brink MR, Moore E, Ferrara JL, Burakoff SJ. Graft-versus-host-disease-associated thymic damage results in the appearance of T cell clones with anti-host reactivity. *Transplantation.* 2000 Feb 15;69(3):446–9.
  83. Mohty M, Kuentz M, Michallet M, Bourhis J-H, Milpied N, Sutton L, et al. Chronic graft-versus-host disease after allogeneic blood stem cell transplantation: long-term results of a randomized study. *Blood.* 2002 Nov 1;100(9):3128–34.
  84. Sullivan KM, Witherspoon RP, Storb R, Deeg HJ, Dahlberg S, Sanders JE, et al. Alternating-day cyclosporine and prednisone for treatment of high-risk chronic graft-v-

- host disease. *Blood*. 1988 Aug;72(2):555–61.
85. Magro L, Mohty M, Catteau B, Coiteux V, Chevallier P, Terriou L, et al. Imatinib mesylate as salvage therapy for refractory sclerotic chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2009 Jul 16;114(3):719–22.
  86. Greinix HT, Volc-Platzer B, Rabitsch W, Gmeinhardt B, Guevara-Pineda C, Kalhs P, et al. Successful use of extracorporeal photochemotherapy in the treatment of severe acute and chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 1998 Nov 1;92(9):3098–104.
  87. Mackall CL, Hakim FT, Gress RE. T-cell regeneration: all repertoires are not created equal. *Immunol. Today*. 1997 May;18(5):245–51.
  88. Hazenberg MD, Otto SA, de Pauw ES, Roelofs H, Fibbe WE, Hamann D, et al. T-cell receptor excision circle and T-cell dynamics after allogeneic stem cell transplantation are related to clinical events. *Blood*. 2002 May 1;99(9):3449–53.
  89. Komanduri KV, St John LS, de Lima M, McMannis J, Rosinski S, McNiece I, et al. Delayed immune reconstitution after cord blood transplantation is characterized by impaired thymopoiesis and late memory T-cell skewing. *Blood*. 2007 Dec 15;110(13):4543–51.
  90. Machado CM. Reimmunization after hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Rev Vaccines*. 2005 Apr;4(2):219–28.
  91. Carreras E, Bertz H, Arcese W, Vernant JP, Tomás JF, Hagglund H, et al. Incidence and outcome of hepatic veno-occlusive disease after blood or marrow transplantation: a prospective cohort study of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. European Group for Blood and Marrow Transplantation Chronic Leukemia Working Party. *Blood*. 1998 Nov 15;92(10):3599–604.
  92. Socié G, Salooja N, Cohen A, Rovelli A, Carreras E, Locasciulli A, et al. Nonmalignant late effects after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2003 May 1;101(9):3373–85.
  93. Facchini L, Martino R, Ferrari A, Piñana JL, Valcárcel D, Barba P, et al. Degree of mucositis and duration of neutropenia are the major risk factors for early post-transplant febrile neutropenia and severe bacterial infections after reduced-intensity conditioning. *Eur. J. Haematol*. 2012 Jan;88(1):46–51.
  94. Castagnola E, Faraci M. Management of bacteremia in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2009 Jun;7(5):607–21.
  95. Furno P, Bucaneve G, Del Favero A. Monotherapy or aminoglycoside-containing combinations for empirical antibiotic treatment of febrile neutropenic patients: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2002 Apr;2(4):231–42.
  96. Ram R, Farbman L, Leibovici L, Raanani P, Yeshurun M, Vidal L, et al. Characteristics of initial compared with subsequent bacterial infections among hospitalised haemato-oncological patients. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2012 Aug;40(2):123–6.
  97. Castagna L, Bramanti S, Sarina B, Todisco E, Ibaty A, Santoro A. ECIL 3-2009 update guidelines for antifungal management. *Bone Marrow Transplant*. 2012 Jun;47(6):866.

98. Storek J, Viganego F, Dawson MA, Herremans MMPT, Boeckh M, Flowers MED, et al. Factors affecting antibody levels after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2003 Apr 15;101(8):3319–24.
99. Ljungman P, de la Camara R, Cordonnier C, Einsele H, Engelhard D, Reusser P, et al. Management of CMV, HHV-6, HHV-7 and Kaposi-sarcoma herpesvirus (HHV-8) infections in patients with hematological malignancies and after SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2008 Aug;42(4):227–40.
100. Mori T, Kato J. Cytomegalovirus infection/disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Int. J. Hematol*. 2010 May;91(4):588–95.
101. Bolovan-Fritts CA, Trout RN, Spector SA. High T-cell response to human cytomegalovirus induces chemokine-mediated endothelial cell damage. *Blood*. 2007 Sep 15;110(6):1857–63.
102. Stocchi R, Ward KN, Fanin R, Bacarani M, Apperley JF. Management of human cytomegalovirus infection and disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Haematologica*. 1999 Jan;84(1):71–9.
103. Meijer E, Cornelissen JJ. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: molecular monitoring and early treatment of high-risk patients. *Curr. Opin. Hematol*. 2008 Nov;15(6):576–85.
104. Kuehnle I, Huls MH, Liu Z, Semmelmann M, Krance RA, Brenner MK, et al. CD20 monoclonal antibody (rituximab) for therapy of Epstein-Barr virus lymphoma after hemopoietic stem-cell transplantation. *Blood*. 2000 Feb 15;95(4):1502–5.
105. Feuchtinger T, Lang P, Handgretinger R. Adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Leuk. Lymphoma*. 2007 Feb;48(2):244–55.
106. Shah JN, Chemaly RF. Management of RSV infections in adult recipients of hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2011 Mar 10;117(10):2755–63.
107. Giaccone L, Festuccia M, Marengo A, Resta I, Sorasio R, Pittaluga F, et al. Hepatitis B virus reactivation and efficacy of prophylaxis with lamivudine in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 2010 Jun;16(6):809–17.
108. Ramos CA, Saliba RM, de Pádua L, Khorshid O, Shpall EJ, Giralt S, et al. Impact of hepatitis C virus seropositivity on survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematologic malignancies. *Haematologica*. 2009 Feb;94(2):249–57.
109. Salahuddin SZ, Ablashi DV, Markham PD, Josephs SF, Sturzenegger S, Kaplan M, et al. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science*. 1986 Oct 31;234(4776):596–601.
110. De Bolle L, Naesens L, De Clercq E. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clin. Microbiol. Rev*. 2005 Jan;18(1):217–45.
111. Gompels UA, Macaulay HA. Characterization of human telomeric repeat sequences from human herpesvirus 6 and relationship to replication. *J. Gen. Virol*. 1995 Feb;76 ( Pt

- 2):451–8.
112. Cone RW, Hackman RC, Huang ML, Bowden RA, Meyers JD, Metcalf M, et al. Human herpesvirus 6 in lung tissue from patients with pneumonitis after bone marrow transplantation. *N. Engl. J. Med.* 1993 Jul 15;329(3):156–61.
  113. Mariotte E, Schnell D, Scieux C, Agbalika F, Legoff J, Ribaud P, et al. Significance of herpesvirus 6 in BAL fluid of hematology patients with acute respiratory failure. *Infection.* 2011 Jun;39(3):225–30.
  114. Drobyski WR, Knox KK, Majewski D, Carrigan DR. Brief report: fatal encephalitis due to variant B human herpesvirus-6 infection in a bone marrow-transplant recipient. *N. Engl. J. Med.* 1994 May 12;330(19):1356–60.
  115. Mori Y, Miyamoto T, Nagafuji K, Kamezaki K, Yamamoto A, Saito N, et al. High incidence of human herpes virus 6-associated encephalitis/myelitis following a second unrelated cord blood transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2010 Nov;16(11):1596–602.
  116. Vu T, Carrum G, Hutton G, Heslop HE, Brenner MK, Kamble R. Human herpesvirus-6 encephalitis following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2007 Jun;39(11):705–9.
  117. Agut H. Deciphering the clinical impact of acute human herpesvirus 6 (HHV-6) infections. *J. Clin. Virol.* 2011 Nov;52(3):164–71.
  118. Agut H, Boutolleau D, Bonnafous P, Gautheret-Dejean A. Les infections à herpèsvirus humain 6 (HHV-6) : un vaste domaine encore à explorer. *Les antibiotiques. EM Premium.* Elsevier Masson; 2006. p. 123–30.
  119. Gompels UA, Nicholas J, Lawrence G, Jones M, Thomson BJ, Martin ME, et al. The DNA sequence of human herpesvirus-6: structure, coding content, and genome evolution. *Virology.* 1995 May 10;209(1):29–51.
  120. Isegawa Y, Mukai T, Nakano K, Kagawa M, Chen J, Mori Y, et al. Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B. *J. Virol.* 1999 Oct;73(10):8053–63.
  121. Ahlqvist J, Fotheringham J, Akhyani N, Yao K, Fogdell-Hahn A, Jacobson S. Differential tropism of human herpesvirus 6 (HHV-6) variants and induction of latency by HHV-6A in oligodendrocytes. *J. Neurovirol.* 2005 Aug;11(4):384–94.
  122. Donati D, Martinelli E, Cassiani-Ingoni R, Ahlqvist J, Hou J, Major EO, et al. Variant-specific tropism of human herpesvirus 6 in human astrocytes. *J. Virol.* 2005 Aug;79(15):9439–48.
  123. Santoro F, Kennedy PE, Locatelli G, Malnati MS, Berger EA, Lusso P. CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell.* 1999 Dec 23;99(7):817–27.
  124. Arbuckle JH, Medveczky MM, Luka J, Hadley SH, Luegmayer A, Ablashi D, et al. The latent human herpesvirus-6A genome specifically integrates in telomeres of human chromosomes in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010 Mar

23;107(12):5563–8.

125. Parker CA, Weber JM. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of IgG and IgM antibodies to human herpesvirus type 6. *J. Virol. Methods.* 1993 Mar;41(3):265–75.
126. Kusuhara K, Ueda K, Okada K, Miyazaki C, Tokugawa K, Hirose M, et al. Do second attacks of exanthema subitum result from human herpesvirus 6 reactivation or reinfection? *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1991 Jun;10(6):468–70.
127. Cone RW, Huang ML, Hackman RC, Corey L. Coinfection with human herpesvirus 6 variants A and B in lung tissue. *J. Clin. Microbiol.* 1996 Apr;34(4):877–81.
128. Collot S, Petit B, Bordessoule D, Alain S, Touati M, Denis F, et al. Real-time PCR for quantification of human herpesvirus 6 DNA from lymph nodes and saliva. *J. Clin. Microbiol.* 2002 Jul;40(7):2445–51.
129. Drobyski WR, Eberle M, Majewski D, Baxter-Lowe LA. Prevalence of human herpesvirus 6 variant A and B infections in bone marrow transplant recipients as determined by polymerase chain reaction and sequence-specific oligonucleotide probe hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 1993 Jun;31(6):1515–20.
130. Radonić A, Oswald O, Thulke S, Brockhaus N, Nitsche A, Siegert W, et al. Infections with human herpesvirus 6 variant B delay platelet engraftment after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* 2005 Nov;131(4):480–2.
131. Rossi C, Delforge ML, Jacobs F, Wissing M, Pradier O, Remmelink M, et al. Fatal primary infection due to human herpesvirus 6 variant A in a renal transplant recipient. *Transplantation.* 2001 Jan 27;71(2):288–92.
132. Griffiths PD, Ait-Khaled M, Bearcroft CP, Clark DA, Quaglia A, Davies SE, et al. Human herpesviruses 6 and 7 as potential pathogens after liver transplant: prospective comparison with the effect of cytomegalovirus. *J. Med. Virol.* 1999 Dec;59(4):496–501.
133. Adams O, Krempe C, Kögler G, Wernet P, Scheid A. Congenital infections with human herpesvirus 6. *J. Infect. Dis.* 1998 Aug;178(2):544–6.
134. Maeda T, Okuno T, Hayashi K, Nagata M, Ueda M, Terashima K, et al. Outcomes of infants whose mothers are positive for human herpesvirus-6 DNA within the genital tract in early gestation. *Acta Paediatr Jpn.* 1997 Dec;39(6):653–7.
135. Yamanishi K, Okuno T, Shiraki K, Takahashi M, Kondo T, Asano Y, et al. Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet.* 1988 May 14;1(8594):1065–7.
136. Carrigan DR, Drobyski WR, Russler SK, Tapper MA, Knox KK, Ash RC. Interstitial pneumonitis associated with human herpesvirus-6 infection after marrow transplantation. *Lancet.* 1991 Jul 20;338(8760):147–9.
137. Kondo K, Nagafuji H, Hata A, Tomomori C, Yamanishi K. Association of human herpesvirus 6 infection of the central nervous system with recurrence of febrile convulsions. *J. Infect. Dis.* 1993 May;167(5):1197–200.

138. Gautheret-Dejean A, Manichanh C, Thien-Ah-Koon F, Fillet A-M, Mangeney N, Vidaud M, et al. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of human herpesvirus-6 infection and application to bone marrow transplant patients. *J. Virol. Methods.* 2002 Feb;100(1-2):27–35.
139. Deback C, Agbalika F, Scieux C, Marcelin AG, Gautheret-Dejean A, Cherot J, et al. Detection of human herpesviruses HHV-6, HHV-7 and HHV-8 in whole blood by real-time PCR using the new CMV, HHV-6, 7, 8 R-gene kit. *J. Virol. Methods.* 2008 May;149(2):285–91.
140. Boutolleau D, Duros C, Bonnafous P, Caiola D, Karras A, Castro ND, et al. Identification of human herpesvirus 6 variants A and B by primer-specific real-time PCR may help to revisit their respective role in pathology. *J. Clin. Virol.* 2006 Mar;35(3):257–63.
141. Sobue R, Miyazaki H, Okamoto M, Hirano M, Yoshikawa T, Suga S, et al. Fulminant hepatitis in primary human herpesvirus-6 infection. *N. Engl. J. Med.* 1991 May 2;324(18):1290.
142. Niederman JC, Liu CR, Kaplan MH, Brown NA. Clinical and serological features of human herpesvirus-6 infection in three adults. *Lancet.* 1988 Oct 8;2(8615):817–9.
143. Emery VC, Atkins MC, Bowen EF, Clark DA, Johnson MA, Kidd IM, et al. Interactions between beta-herpesviruses and human immunodeficiency virus in vivo: evidence for increased human immunodeficiency viral load in the presence of human herpesvirus 6. *J. Med. Virol.* 1999 Mar;57(3):278–82.
144. Cone RW, Huang ML, Corey L, Zeh J, Ashley R, Bowden R. Human herpesvirus 6 infections after bone marrow transplantation: clinical and virologic manifestations. *J. Infect. Dis.* 1999 Feb;179(2):311–8.
145. de Pagter PJ, Schuurman R, Meijer E, van Baarle D, Sanders EAM, Boelens JJ. Human herpesvirus type 6 reactivation after haematopoietic stem cell transplantation. *J. Clin. Virol.* 2008 Dec;43(4):361–6.
146. Appleton AL, Sviland L, Peiris JS, Taylor CE, Wilkes J, Green MA, et al. Human herpes virus-6 infection in marrow graft recipients: role in pathogenesis of graft-versus-host disease. Newcastle upon Tyne Bone Marrow Transport Group. *Bone Marrow Transplant.* 1995 Dec;16(6):777–82.
147. Zerr DM, Corey L, Kim HW, Huang M-L, Nguy L, Boeckh M. Clinical outcomes of human herpesvirus 6 reactivation after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin. Infect. Dis.* 2005 Apr 1;40(7):932–40.
148. Singh N, Paterson DL. Encephalitis caused by human herpesvirus-6 in transplant recipients: relevance of a novel neurotropic virus. *Transplantation.* 2000 Jun 27;69(12):2474–9.
149. Hill JA, Koo S, Guzman Suarez BB, Ho VT, Cutler C, Koreth J, et al. Cord-Blood Hematopoietic Stem Cell Transplant Confers an Increased Risk for Human Herpesvirus-6-Associated Acute Limbic Encephalitis: A Cohort Analysis. *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow*

Transplantation [Internet]. 2012 May 4 [cited 2012 Sep 23]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22564265>

150. Kadakia MP, Rybka WB, Stewart JA, Patton JL, Stamey FR, Elsayy M, et al. Human herpesvirus 6: infection and disease following autologous and allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 1996 Jun 15;87(12):5341–54.
151. Yoshikawa T, Goshima F, Akimoto S, Ozaki T, Iwasaki T, Kurata T, et al. Human herpesvirus 6 infection of human epidermal cell line: pathogenesis of skin manifestations. *J. Med. Virol.* 2003 Sep;71(1):62–8.
152. Yamane A, Mori T, Suzuki S, Mihara A, Yamazaki R, Aisa Y, et al. Risk factors for developing human herpesvirus 6 (HHV-6) reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and its association with central nervous system disorders. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2007 Jan;13(1):100–6.
153. Takemoto Y, Takatsuka H, Wada H, Mori A, Saheki K, Okada M, et al. Evaluation of CMV/human herpes virus-6 positivity in bronchoalveolar lavage fluids as early detection of acute GVHD following BMT: evidence of a significant relationship. *Bone Marrow Transplant.* 2000 Jul;26(1):77–81.
154. Hentrich M, Oruzio D, Jäger G, Schlemmer M, Schleuning M, Schiel X, et al. Impact of human herpesvirus-6 after haematopoietic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* 2005 Jan;128(1):66–72.
155. Pichereau C, Desseaux K, Janin A, Scieux C, Peffault de Latour R, Xhaard A, et al. The complex relationship between human herpesvirus 6 and acute graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2012 Jan;18(1):141–4.
156. Ogata M, Kikuchi H, Satou T, Kawano R, Ikewaki J, Kohno K, et al. Human herpesvirus 6 DNA in plasma after allogeneic stem cell transplantation: incidence and clinical significance. *J. Infect. Dis.* 2006 Jan 1;193(1):68–79.
157. Imbert-Marcille BM, Tang XW, Lepelletier D, Besse B, Moreau P, Billaudel S, et al. Human herpesvirus 6 infection after autologous or allogeneic stem cell transplantation: a single-center prospective longitudinal study of 92 patients. *Clin. Infect. Dis.* 2000 Oct;31(4):881–6.
158. Tunkel AR, Glaser CA, Bloch KC, Sejvar JJ, Marra CM, Roos KL, et al. The management of encephalitis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 2008 Aug 1;47(3):303–27.
159. De Clercq E, Naesens L, De Bolle L, Schols D, Zhang Y, Neyts J. Antiviral agents active against human herpesviruses HHV-6, HHV-7 and HHV-8. *Rev. Med. Virol.* 2001 Dec;11(6):381–95.
160. Reymen D, Naesens L, Balzarini J, Holý A, Dvoráková H, De Clercq E. Antiviral activity of selected acyclic nucleoside analogues against human herpesvirus 6. *Antiviral Res.* 1995 Dec;28(4):343–57.
161. Bethge W, Beck R, Jahn G, Munding P, Kanz L, Einsele H. Successful treatment of human herpesvirus-6 encephalitis after bone marrow transplantation. *Bone Marrow*

- Transplant. 1999 Dec;24(11):1245–8.
162. Yoshida H, Matsunaga K, Ueda T, Yasumi M, Ishikawa J, Tomiyama Y, et al. Human herpesvirus 6 meningoencephalitis successfully treated with ganciclovir in a patient who underwent allogeneic bone marrow transplantation from an HLA-identical sibling. *Int. J. Hematol.* 2002 May;75(4):421–5.
  163. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J, et al. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant.* 1995 Jun;15(6):825–8.
  164. Yakoub-Agha I, Maunoury V, Wacrenier A, Couignoux S, Depil S, Desreumaux P, et al. Impact of Small Bowel Exploration Using Video-Capsule Endoscopy in the Management of Acute Gastrointestinal Graft-versus-Host Disease. *Transplantation.* 2004 Dec 15;78(11):1697–701.
  165. Ruan PK, Gray RJ. Analyses of cumulative incidence functions via non-parametric multiple imputation. *Stat Med.* 2008 Nov 29;27(27):5709–24.
  166. Fine J, Gray RJ. A Proportional Hazards Model for the Subdistribution of A Competing Risk. *Journal of the American Statistical Association.* 1999;94:496–509.
  167. Morissette G, Flamand L. Herpesviruses and Chromosomal Integration. *Journal of Virology.* 2010 Sep 15;84(23):12100–9.
  168. Leong HN, Tuke PW, Tedder RS, Khanom AB, Eglin RP, Atkinson CE, et al. The prevalence of chromosomally integrated human herpesvirus 6 genomes in the blood of UK blood donors. *J. Med. Virol.* 2007 Jan;79(1):45–51.
  169. Ward KN, Leong HN, Nacheva EP, Howard J, Atkinson CE, Davies NWS, et al. Human Herpesvirus 6 Chromosomal Integration in Immunocompetent Patients Results in High Levels of Viral DNA in Blood, Sera, and Hair Follicles. *Journal of Clinical Microbiology.* 2006 Apr 5;44(4):1571–4.
  170. Lee S-O, Brown RA, Razonable RR. Clinical significance of pretransplant chromosomally integrated human herpesvirus-6 in liver transplant recipients. *Transplantation.* 2011 Jul 27;92(2):224–9.
  171. Chevallier P, Hebia-Fellah I, Planche L, Guillaume T, Bressolette-Bodin C, Coste-Burel M, et al. Human herpes virus 6 infection is a hallmark of cord blood transplant in adults and may participate to delayed engraftment: a comparison with matched unrelated donors as stem cell source. *Bone Marrow Transplant.* 2010 Jul;45(7):1204–11.
  172. Meers S, Lagrou K, Theunissen K, Dierickx D, Delforge M, Devos T, et al. Myeloablative conditioning predisposes patients for *Toxoplasma gondii* reactivation after allogeneic stem cell transplantation. *Clin. Infect. Dis.* 2010 Apr 15;50(8):1127–34.
  173. Arai Y, Maeda T, Sugiura H, Matsui H, Jo T, Ueda T, et al. Risk factors for and prognosis of hemorrhagic cystitis after allogeneic stem cell transplantation: Retrospective analysis in a single institution. *Hematology.* 2012 Jul;17(4):207–14.
  174. Ljungman P, Wang FZ, Clark DA, Emery VC, Remberger M, Ringdén O, et al. High

- levels of human herpesvirus 6 DNA in peripheral blood leucocytes are correlated to platelet engraftment and disease in allogeneic stem cell transplant patients. *Br. J. Haematol.* 2000 Dec;111(3):774–81.
175. Zerr DM, Fann JR, Breiger D, Boeckh M, Adler AL, Xie H, et al. HHV-6 reactivation and its effect on delirium and cognitive functioning in hematopoietic cell transplantation recipients. *Blood.* 2011 May 12;117(19):5243–9.
176. Wang L-R, Dong L-J, Zhang M-J, Lu D-P. The impact of human herpesvirus 6B reactivation on early complications following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2006 Oct;12(10):1031–7.
177. Savolainen H, Lautenschlager I, Piiparinen H, Saarinen-Pihkala U, Hovi L, Vettenranta K. Human herpesvirus-6 and -7 in pediatric stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer.* 2005 Nov;45(6):820–5.
178. Maeda Y, Teshima T, Yamada M, Shinagawa K, Nakao S, Ohno Y, et al. Monitoring of human herpesviruses after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation and bone marrow transplantation. *Br. J. Haematol.* 1999 Apr;105(1):295–302.
179. Sashihara J, Tanaka-Taya K, Tanaka S, Amo K, Miyagawa H, Hosoi G, et al. High incidence of human herpesvirus 6 infection with a high viral load in cord blood stem cell transplant recipients. *Blood.* 2002 Sep 15;100(6):2005–11.
180. Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, Baker KS, Blazar BR, Eide C, et al. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood.* 2002 Sep 1;100(5):1611–8.
181. de Pagter PJA, Schuurman R, Visscher H, de Vos M, Bierings M, van Loon AM, et al. Human herpes virus 6 plasma DNA positivity after hematopoietic stem cell transplantation in children: an important risk factor for clinical outcome. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2008 Jul;14(7):831–9.
182. Takatsuka H, Wakae T, Mori A, Okada M, Fujimori Y, Takemoto Y, et al. Endothelial damage caused by cytomegalovirus and human herpesvirus-6. *Bone Marrow Transplant.* 2003 Mar;31(6):475–9.
183. Burd EM, Knox KK, Carrigan DR. Human herpesvirus-6-associated suppression of growth factor-induced macrophage maturation in human bone marrow cultures. *Blood.* 1993 Mar 15;81(6):1645–50.
184. Isomura H, Yamada M, Yoshida M, Tanaka H, Kitamura T, Oda M, et al. Suppressive effects of human herpesvirus 6 on in vitro colony formation of hematopoietic progenitor cells. *J. Med. Virol.* 1997 Aug;52(4):406–12.
185. Wang L-R, Dong L-J, Zhang M-J, Lu D-P. Correlations of human herpesvirus 6B and CMV infection with acute GVHD in recipients of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2008 Nov;42(10):673–7.
186. Morris ES, Hill GR. Advances in the understanding of acute graft-versus-host disease. *Br. J. Haematol.* 2007 Apr;137(1):3–19.

187. Shlomchik WD. Graft-versus-host disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2007 May;7(5):340–52.
188. Lusso P. HHV-6 and the immune system: mechanisms of immunomodulation and viral escape. *J. Clin. Virol.* 2006 Dec;37 Suppl 1:S4–10.
189. Lusso P, Markham PD, Tschachler E, di Marzo Veronese F, Salahuddin SZ, Ablashi DV, et al. In vitro cellular tropism of human B-lymphotropic virus (human herpesvirus-6). *J. Exp. Med.* 1988 May 1;167(5):1659–70.
190. Lusso P, Malnati M, De Maria A, Balotta C, DeRocco SE, Markham PD, et al. Productive infection of CD4+ and CD8+ mature human T cell populations and clones by human herpesvirus 6. Transcriptional down-regulation of CD3. *J. Immunol.* 1991 Jul 15;147(2):685–91.
191. Flamand L, Gosselin J, Stefanescu I, Ablashi D, Menezes J. Immunosuppressive effect of human herpesvirus 6 on T-cell functions: suppression of interleukin-2 synthesis and cell proliferation. *Blood.* 1995 Mar 1;85(5):1263–71.
192. Flamand L, Gosselin J, D'Addario M, Hiscott J, Ablashi DV, Gallo RC, et al. Human herpesvirus 6 induces interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha, but not interleukin-6, in peripheral blood mononuclear cell cultures. *J. Virol.* 1991 Sep;65(9):5105–10.
193. Lüttichau HR, Clark-Lewis I, Jensen PØ, Moser C, Gerstoft J, Schwartz TW. A highly selective CCR2 chemokine agonist encoded by human herpesvirus 6. *J. Biol. Chem.* 2003 Mar 28;278(13):10928–33.
194. Ljungman P, Aschan J, Lewensohn-Fuchs I, Carlens S, Larsson K, Lönnqvist B, et al. Results of different strategies for reducing cytomegalovirus-associated mortality in allogeneic stem cell transplant recipients. *Transplantation.* 1998 Nov 27;66(10):1330–4.
195. Schirmer EC, Wyatt LS, Yamanishi K, Rodriguez WJ, Frenkel N. Differentiation between two distinct classes of viruses now classified as human herpesvirus 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991 Jul 1;88(13):5922–6.
196. Sakai R, Kanamori H, Motohashi K, Yamamoto W, Matsuura S, Fujita A, et al. Long-term outcome of human herpesvirus-6 encephalitis after allogeneic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2011 Sep;17(9):1389–94.
197. Howell KB, Tiedemann K, Haeusler G, Mackay MT, Kornberg AJ, Freeman JL, et al. Symptomatic generalized epilepsy after HHV6 posttransplant acute limbic encephalitis in children. *Epilepsia.* 2012 Jul;53(7):e122–126.

## **ANNEXE**

**AUTEUR : DULERY**

**Rémy**

**Date de Soutenance : 15 octobre 2012**

**Titre de la Thèse : Impact de la réactivation précoce de l'herpèsvirus 6 après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques**

**Thèse, Médecine, Lille,**

**Cadre de classement : DES de Spécialités Médicales, Hématologie clinique**

**Mots-clés : Herpèsvirus humain 6, infection, allogreffe, réaction du greffon contre l'hôte**

**Résumé :**

**Contexte :** L'herpèsvirus humain 6 (HHV6) infecte plus de 95% de la population et sa réactivation peut être symptomatique, particulièrement chez les patients immunodéprimés. Néanmoins, peu d'études se sont intéressées à l'impact clinique de sa réactivation après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH).

**Méthodes :** Une étude rétrospective a été réalisée chez les patients traités par allogreffe de CSH au CHRU de Lille entre 2004 et 2009. La détection du virus a été effectuée par PCR quantitative hebdomadaire pendant la période d'aplasie, puis en fonction des signes cliniques.

**Résultats :** Sur les 235 patients analysés, 112 (48%) ont présenté une réactivation de l'HHV6 dans les cent premiers jours après la greffe (groupe A) et 123 n'ont pas eu de PCR HHV6 positive pendant cette période (groupe B). La réactivation de l'HHV6 a été moins fréquente chez les patients recevant un conditionnement non myéloablatif ( $p=0,028$ ). Dans le groupe A, seulement 6 patients (5%) sont restés asymptomatiques pendant la réactivation, alors qu'il a été observé de la fièvre ( $n=60$ ), une éruption cutanée ( $n=57$ ), une diarrhée ( $n=51$ ), des complications pulmonaires ( $n=19$ ) et/ou des troubles neurologiques ( $n=12$ ) chez les autres. Les patients du groupe A ont eu un retard dans la prise de greffe des plaquettes ( $p<0,001$ ) et ont développé une réaction aiguë du greffon contre l'hôte (GVH) de grade II à IV plus souvent que ceux du groupe B (respectivement 47% et 30% des patients,  $p=0,009$ ). En analyse multivariée, les principaux facteurs associés à la GVH aiguë de grade II à IV sont la réactivation précoce de l'HHV6 [RR=1,59; IC 95% : 1,04 – 2,43] ( $p=0,03$ ) et un donneur non-apparenté [RR=2,5; IC 95%: 1,59 – 3,91] ( $p<0,001$ ). Par ailleurs, la survie globale à 6 mois des patients du groupe A est inférieure à celle des patients du groupe B [RR=2,1; IC 95%: 1,05 – 4,03] ( $p=0,04$ ). Sur les 38 patients évaluable traités par un traitement antiviral, 34 ont eu une diminution significative de leur charge virale et une régression complète de la symptomatologie. De plus, la durée de réactivation a été plus courte chez les patients recevant un traitement antiviral que chez les autres (respectivement 50 jours contre 72 jours,  $p=0,04$ ).

**Conclusion :** La réactivation de l'HHV6 est associée à un retard dans la prise de greffe des plaquettes, au développement de la GVH aiguë, et à une augmentation de la mortalité précoce après allogreffe de CSH. Une surveillance de la PCR HHV6 paraît nécessaire dans les premiers mois après la greffe, particulièrement en cas de tableau clinique atypique pour une GVH aiguë.

**Composition du Jury :**

**Président de Thèse : JOUET Jean-Pierre**

**Asseseurs : BAUTERS Francis  
DEWILDE Anny  
COITEUX Valérie**

**Directeur de Thèse: YAKOUB-AGHA Ibrahim**