



**HAL**  
open science

# Développement d'un modèle murin transgénique d'infection par l'herpèsvirus 6A et étude des mécanismes d'induction de la neuroinflammation

Joséphine Reynaud

► **To cite this version:**

Joséphine Reynaud. Développement d'un modèle murin transgénique d'infection par l'herpèsvirus 6A et étude des mécanismes d'induction de la neuroinflammation. Biologie cellulaire. Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON, 2013. Français. NNT : 2013ENSL0813 . tel-00998378

**HAL Id: tel-00998378**

**<https://theses.hal.science/tel-00998378v1>**

Submitted on 2 Jun 2014

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

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

# THÈSE

en vue de l'obtention du grade de

**Docteur de l'Université de Lyon, délivré par l'École Normale Supérieure de Lyon**

**Discipline** : Sciences de la vie

**Laboratoire** : Centre international de recherche en infectiologie, Inserm U1111 - ENS de Lyon

**École Doctorale** : Biologie moléculaire et intégrative de la cellule (BMIC)

## **Développement d'un modèle murin transgénique d'infection par l'herpèsvirus 6A et étude des mécanismes d'induction de la neuroinflammation**

présentée et soutenue publiquement le 31 mai 2013

par **Joséphine REYNAUD**

Directeur de thèse :

***Mme Branka HORVAT***

Après l'avis de :

***M. Henri AGUT***

***Mme Anne ASTIER***

Devant la commission d'examen formée de :

***M. Henri AGUT, rapporteur***

***Mme Anne ASTIER, rapporteur***

***Mme Branka HORVAT, directeur***

***Mme Evelyne MANET, membre***

***M. Patrice MARCHE, membre***



## *Remerciements*

Je souhaite tout d'abord remercier le Dr. Branka Horvat pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, m'avoir fait confiance pour mener un travail de thèse, laissé suffisamment de liberté dans ce travail pour devenir autonome, et souvent soutenue pour l'obtention de diverses bourses et financements.

Merci également aux membres du jury d'avoir accepté de juger mon travail : le Dr. Evelyne Manet, qui a accepté de présider ce jury, le Dr. Patrice Marche, venu de Grenoble pour juger mon travail en tant qu'examinateur, le Pr. Henri Agut et le Dr. Anne Astier qui ont généreusement relu et corrigé ce mémoire en tant que rapporteurs, et m'ont donné de précieux conseils afin de l'améliorer.

J'aimerais de plus adresser de sincères remerciements à Pascale Giraudon, pour son soutien inestimable d'un point de vue scientifique mais aussi humain quand j'en avais le plus besoin, à Alberto Epstein et Denis Gerlier, pour leurs conseils avisés lors de mes comités de suivi de thèse ou en dehors, et à Thierry Defrance qui a su m'écouter et m'aider à reprendre les choses en mains dans des moments difficiles.

Je tiens aussi à mentionner ici les personnes qui ont, de près ou de loin, participé à ce travail et sans qui je n'aurais probablement pas pu achever cette thèse : Jeff, qui a démarré ce projet, m'a formée et m'a énormément appris lors de mon arrivée dans le laboratoire, Jérémy, qui a obtenu une partie des résultats présentés dans ce mémoire, Louise, Anne, Jean-François et Céline, qui se sont occupés avec grand soin de mes (pauvres) souris, le labo génotypage du PBES (Sophie, Jess, Charlene...), Bariza, pour son soutien sans faille en qPCR et ses nombreuses anecdotes sur le labo, Thibault et Sébastien, pour leur aide en cytométrie, et Isa, grâce à qui j'ai pu obtenir (ou réobtenir) diverses lignées cellulaires.

Un énorme merci à tous ceux qui m'ont entouré au quotidien pendant ces quatre (presque cinq) années et qui ont rendu supportable, voire même agréable, cette période pas forcément facile, en particulier les membres de l'équipe immunobiologie des infections virales: Marie, pour sa bonne humeur constante, son entrain à organiser toutes sortes d'activités, sa confiance, plus récemment son aide technique, le footing du soir et son amitié. Olga, avec qui j'ai pu partager les joies, les peines, les moments de doutes et de ras-le-bol de la vie de thésarde, et qui m'a souvent aidé à relativiser. Louis, avec qui j'apprécie depuis peu de partager un bureau, qui comprend si bien les vicissitudes de la thèse et des manips qui durent, qui durent..., pour son humour (et sa moustache). Joanna, qui est toujours là pour les conseils mode et les bonnes soirées, mais aussi quand j'ai besoin d'un coup de main en biomol. Kévin, qui m'impressionnera toujours par son calme et ses compétences en questions administratives (et pas seulement), merci pour toutes les histoires étonnantes et les cafés partagés. Carine, pour son aide au quotidien, sa façon d'être toujours agréable, et surtout ses talents cachés (!) Cyrille, qui est là depuis le tout début, pour sa générosité, son aide scientifique et ses conseils pour la thèse en général. Jérémy, qui a pu comprendre et partager la plupart de mes incertitudes et

exaspérations, je ne dirai qu'une chose : une thèse n'est pas si « redondante » que ça, même si elle présente de nombreuses « prospérités » ;-). Jade, pour sa zénitude, et ses sourires. Erica, nouvelle arrivée (et je l'espère future thésarde), merci pour ta gentillesse et tes nombreux doutes (qui me permettent de me rendre compte que non, ce n'est pas que moi). Enfin, merci à Géraldine, pour sa bonne humeur, sa vitalité, son honnêteté et son travail efficace dans la gestion des commandes, inventaires et stocks, à Ludovic et à Araf.

Merci également à ceux qui sont passés par le labo il y a quelques temps ou plus récemment : Vanessa, avec qui il fut très agréable de cohabiter dans ce petit bureau-aquarium, Phil, qui n'est pas vraiment parti, et qui continue à venir papoter régulièrement à mon grand plaisir, Boyan dont les remarques et critiques en labmeeting m'ont été utiles, Jess, pour son énergie et sa motivation, Ben, Cindy, Thomas, Diane, Joëlle, Christine, Céline, Julien, Colin, Fahran, Kasia, Linda, Lamia et sûrement d'autres que j'ai oublié.

Merci aux membres d'autres équipes à l'étage, dans la tour ou à l'ENS, toujours prêts à dépanner d'un tube, un anticorps, une hotte ou un conseil : Hasan, Morgan, Laurent, Manuuu, Paul, Michelle, Robin, Mercedes, Reem, Bertrand, Julien, Aurélie ...

Merci à mes amis, qui savent très bien ce que c'est, eux aussi, de faire une thèse et dont le soutien et la solidarité à toute épreuve ont été indispensable au maintien de ma santé mentale: Marion R, avec qui j'ai partagé tellement de choses, la prépa, l'ENS, un appart, le CERVI, les virus, Marion M, avec qui j'ai aussi partagé un appart (ou plutôt une chambre) il y a de cela des lustres il me semble, Charlène, dont la thèse a tant de « points communs » avec la mienne et dont l'EVJF historique m'a contrainte à écrire ces remerciements au dernier moment, et Marina, qui est toujours là pour m'écouter me plaindre et aller se détendre au Ninkasi. Heureusement que vous avez toutes été là pour décompresser et faire la fête, sinon je ne suis pas sûre que j'aurais réussi à finir. Merci aussi à celles et ceux qui sont moins concernés, mais compatissent et me permettent de vraiment décrocher de temps en temps: Emilie, Zozo, Elo, Anne-So, Elise, Pauline, Mag, Adeline, sans oublier Elsa, Jérôme, Antho, Olivier, Cynthia, Ben, Yannick, Béa, Julien etc.

J'aimerais également remercier mes parents et ma famille, qui m'ont fait confiance et m'ont soutenue dans mon choix de faire une thèse, m'ont écouté m'en plaindre et m'ont toujours donné raison.

Enfin, un merci tout particulier à Ludo, qui a trouvé le moyen d'être toujours là pour moi, sans pour autant être présent physiquement et qui a incroyablement bien supporté toutes mes crises de nerfs, pétages de plomb et autres craquages, alors qu'il avait lui-même une thèse à gérer. Merci pour sa façon de voir toujours le bon côté des choses et de relativiser qui nous a permis de vaincre ces « maudits » 500 km. Merci pour son obsession du ménage qui a évité à mon appartement d'être enseveli sous une épaisse couche de poussière, pour les blagues incongrues qui ont réussi à me faire rire même quand le moral était au plus bas. L'achèvement de cette thèse et de la sienne devrait marquer le début d'une vie à deux plus posée, du moins je l'espère et l'attends avec hâte.

## **Résumé en français : Développement d'un modèle murin transgénique d'infection par l'herpèsvirus 6A et étude des mécanismes d'induction de la neuroinflammation**

L'herpèsvirus humain (HHV) 6 est un betaherpèsvirus largement répandu, associé à plusieurs maladies neuroinflammatoires, telles que des encéphalites ou la sclérose en plaques (SEP). Cependant, les mécanismes impliqués dans la neuropathologie induite par les deux espèces d'HHV-6, HHV-6A et HHV-6B, sont peu connus. De plus, l'absence de modèle d'infection chez le petit animal a ralenti l'étude de la pathogénèse virale. Dans ce contexte, nous avons développé un modèle d'infection par HHV-6 chez des souris transgéniques, qui expriment la protéine CD46 humaine, identifiée comme récepteur cellulaire pour HHV-6. Nous avons pu démontrer une persistance de l'ADN viral d'HHV-6A, mais pas d'HHV-6B, dans le cerveau de souris transgéniques pendant plusieurs mois. De plus nos résultats montrent qu'HHV-6A induit la sécrétion de chimiokines pro-inflammatoires par les cellules neurales murines et provoque l'infiltration de cellules immunitaires dans le cerveau de souris infectées. Enfin, HHV-6A, mais pas HHV-6B, pourrait induire des réponses cellulaires chez les cellules murines via le récepteur de l'immunité innée TLR9 (toll-like receptor 9). En collaboration avec une équipe de Grenoble, nous avons ensuite montré que l'infection par HHV-6A induit l'expression de rétrovirus endogènes humains (HERV) dans des cellules mononucléées et des lignées neurales humaines. Ces HERV, en particulier leurs protéines d'enveloppe qui présentent des propriétés pro-inflammatoires, sont associés à diverses maladies autoimmunes dont la SEP. HHV-6A pourrait donc participer au développement de pathologies inflammatoires via l'induction de ces HERV. L'ensemble de ces travaux supporte ainsi l'existence d'un lien entre l'infection par HHV-6A et la neuroinflammation, et apporte de nouvelles pistes quant aux mécanismes potentiellement impliqués.

Mots clés : HHV-6, Herpesviridae, neuroinflammation, modèle animal, souris, CD46, rétrovirus endogène humain, sclérose en plaques, encéphalite



## **Résumé en anglais: Development of a transgenic murine model for human herpesvirus 6A infection and study of the mechanisms of induction of neuroinflammation**

Human herpesvirus (HHV) 6 is a widely spread betaherpesvirus, which has been associated to several neuroinflammatory diseases, such as encephalitis or multiple sclerosis (MS). However, the mechanisms explaining the neuropathology induced by the two species of HHV-6, HHV-6A and HHV-6B, remain to be elucidated. Moreover, the lack of small animal model for HHV-6 infection has considerably hampered the study of viral pathogenesis. In this context, we have generated several lines of mice expressing the human CD46 protein, identified as a cellular receptor for HHV-6, and characterized the infection. We demonstrated that DNA of HHV-6A, but not HHV-6B, can persist in the brain of CD46 transgenic mice for several months after intracranial injection. Moreover our results show that HHV-6A induces chemokine secretion by *in vitro* cultured murine brain cells and provokes leucocyte infiltration in the brain of infected mice. Finally, HHV-6A, but not HHV-6B, could activate cellular responses in murine cells through binding to toll-like receptor 9. In collaboration with the team of P. Marche in Grenoble, we then showed that HHV-6A and HHV-6B infection induce the expression of envelope genes from human endogenous retrovirus W (HERV-W) in human blood mononucleated cells and human neural cell lines. Envelope proteins of HERV-W are known to exhibit strong pro-inflammatory properties and were associated to various autoimmune diseases, including multiple sclerosis. HHV-6A and HHV-6B could therefore participate in the development of inflammatory disorders via the activation of these HERV genes. Altogether this work supports the hypothesis of a link between HHV-6 infection neuroinflammation and opens new perspectives in the study of the mechanisms potentially involved.

Key words: HHV-6, Herpesviridae, neuroinflammation, animal model, mouse, CD46, human endogenous retrovirus, multiple sclerosis, encephalitis



## Table des matières

Liste des abréviations .....	11
<b>Introduction bibliographique</b> .....	<b>13</b>
1 <sup>ère</sup> Partie : Le sixième herpèsvirus humain .....	15
A. Historique .....	15
B. Aspects structuraux .....	19
C. CD46, un récepteur cellulaire d'HHV-6 .....	21
D. Cycle Viral .....	28
E. Tropisme cellulaire .....	36
2 <sup>ème</sup> Partie : HHV-6A et HHV-6B, deux pathogènes du système nerveux central.....	37
A. Epidémiologie .....	37
B. Association à des maladies neurologiques.....	41
C. Deux virus neurotropes .....	44
3 <sup>ème</sup> Partie : HHV-6 et système immunitaire .....	49
A. La réponse immunitaire à l'infection virale.....	49
B. Inhibition de la réponse immunitaire par HHV-6 .....	58
C. Stimulation de la réponse immunitaire par HHV-6 .....	60
D. Interaction avec les rétrovirus endogènes humains .....	63
4 <sup>ème</sup> Partie : Modèles animaux d'infection par HHV-6 .....	68
A. Modèles simiens .....	68
B. Modèles murins .....	71
C. Autres modèles ? .....	72
<b>Objectifs principaux et modèles d'étude</b> .....	<b>73</b>
<b>Résultats expérimentaux</b> .....	<b>77</b>
1 <sup>ère</sup> partie : Analyse de l'infection par HHV-6A et HHV-6B chez les souris CD46-transgéniques : conséquences neuroinflammatoires .....	79
ARTICLE 1: Human Herpesvirus-6A infection in CD46 transgenic mice: viral persistence in the brain and increased production of proinflammatory chemokines via TLR9.....	81
Résultats supplémentaires.....	125
2 <sup>ème</sup> Partie : Analyse de l'expression de gènes d'enveloppe de rétrovirus endogènes dans différents types de cellules humaines.....	137
ARTICLE 2: Human herpesvirus 6-induced transactivation of human endogenous retrovirus-W envelope genes .....	139
Résultats supplémentaires.....	163
<b>Discussion et perspectives</b> .....	<b>165</b>

I.	La souris CD46 transgénique comme modèle d'infection par HHV-6 .....	167
A.	Infection des cellules murines CD46 .....	167
B.	Infection <i>in vivo</i> chez la souris CD46-transgénique.....	170
II.	Effets neuroinflammatoires de l'infection par HHV-6A .....	173
A.	Induction de l'expression de chimiokines dans le système nerveux central .....	173
B.	Implication d'HHV-6A dans les processus de neuroinflammation.....	174
C.	Mécanisme d'induction de la sécrétion de chimiokines par HHV-6A.....	175
D.	Modèle d'induction de neuroinflammation par HHV-6A.....	177
III.	HHV-6 et expression de <i>env</i> de HERV-W dans le modèle cellulaire humain .....	179
A.	HHV-6A et HHV-6B induisent l'expression de gènes <i>env</i> d'HERV dans les lymphocytes humains .....	179
B.	Rôle de CD46.....	180
C.	Induction de l'expression de <i>env</i> dans les cellules gliales humaines .....	181
D.	Intérêt dans le contexte de la sclérose en plaques.....	182
	Conclusions générales .....	183
	<b>Références</b> .....	185
	<b>Annexes</b> .....	213
	ARTICLE 3 (Revue): Human Herpesvirus 6 and neuroinflammation.....	215
	ARTICLE 4 (Revue): Animal models for human herpesvirus 6 infection.....	227
	ARTICLE 5: Type I interferon signaling protects mice from lethal henipavirus infection.....	239

## Liste des abréviations

<b>AAV</b>	Adeno-associated virus
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>APC</b>	Cellule présentatrice d'antigène
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>BCR</b>	B-cell receptor
<b>BHE</b>	Barrière hémato-encéphalique
<b>CBMC</b>	Cord blood mononuclear cells
<b>CD</b>	Cluster of differentiation
<b>CMH</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité
<b>Cyt</b>	Domaine cytoplasmique
<b>DC</b>	Cellule dendritique
<b>DR</b>	Direct repeat
<b>E</b>	Early
<b>EBV</b>	Epstein-Barr virus
<b>ERK</b>	Extracellular-signal-regulated kinase
<b>FISH</b>	Fluorescence in situ hybridization
<b>HBLV</b>	Human B-lymphotropic virus
<b>HCMV</b>	Human cytomegalovirus
<b>HDAC</b>	Histone deacetylase
<b>HEK</b>	Human embryonic kidney
<b>HERV</b>	Human endogenous retrovirus
<b>HHV</b>	Human herpesvirus
<b>HSV</b>	Herpes simplex virus
<b>IE</b>	Immediate-early
<b>IFN</b>	Interféron
<b>IFNAR</b>	IFNalpha/beta receptor
<b>Ig</b>	Immunoglobuline
<b>IL</b>	Interleukine
<b>IR</b>	Internal repeat
<b>IRF</b>	IFN regulatory factor 7
<b>ISG</b>	IFN-stimulated gene
<b>ISGF</b>	IFN-stimulated gene factor
<b>ISRE</b>	IFN-stimulated response elements
<b>L</b>	Late
<b>LCR</b>	Liquide cephalo-rachidien
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>LT</b>	Latency-associated transcript
<b>LTR</b>	Long terminal repeat
<b>MAMP</b>	Microbe-associated molecular pattern
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinase
<b>MD</b>	Myeloid differentiation factor
<b>MMTV</b>	Mammary tumor virus

<b>MSRV</b>	Multiple sclerosis-associated retroviral element
<b>MyD88</b>	Myéloïd différenciation primary-response protein 88
<b>NF-κB</b>	Nuclear factor kappa B
<b>NK</b>	Natural killer
<b>ORF</b>	Open reading frame
<b>PBL</b>	Peripheral blood lymphocytes
<b>PBMC</b>	Peripheral blood mononuclear cells
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>pDC</b>	Cellule dendritique plasmacytoïde
<b>PRR</b>	Pattern recognition receptor
<b>qPCR</b>	PCR quantitative
<b>R</b>	Repeat
<b>RANTES</b>	Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted
<b>RSV</b>	Virus respiratoire syncytial
<b>RT</b>	Retro-transcription
<b>SCR</b>	Short consensus repeat
<b>SEP</b>	Sclérose en plaques
<b>SNC</b>	Système nerveux central
<b>STP</b>	Serine-Threonine-Proline rich
<b>TCR</b>	T-cell receptor
<b>TGF</b>	Transforming growth factor
<b>Th</b>	T helper
<b>TIR</b>	Toll/IL-1R
<b>TLR</b>	Toll-like receptor
<b>TNF</b>	Tumor necrosis factor
<b>TPA</b>	Tetradecanoyl-phorbol-13-acetate
<b>VIH</b>	Virus de l'immunodéficience acquise
<b>VR</b>	Virus de la rougeole
<b>VZV</b>	Virus varicelle-zona

# **Introduction**

# **bibliographique**

---



# 1<sup>ère</sup> Partie : Le sixième herpèsvirus humain

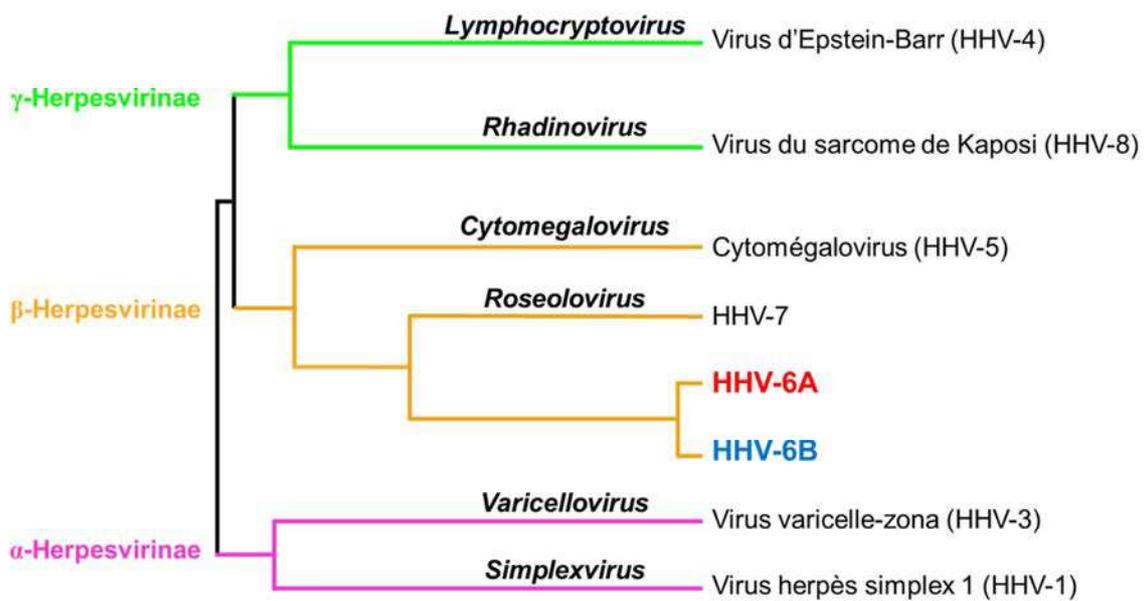
## A. Historique

### 1. Découverte

Le sixième herpèsvirus humain (HHV-6) a été découvert en 1986 par le groupe de Robert C. Gallo (Salahuddin et al., 1986). Pendant la période faisant suite à la découverte du virus de l'immunodéficience humaine en 1983 (Barré-Sinoussi et al., 1983), cette équipe a développé de nombreux outils permettant de cultiver *in vitro* différents types de cellules sanguines humaines, dans le but de découvrir de nouveaux virus. Dans des cultures générées à partir de cellules de six patients atteints de désordres lymphoprolifératifs, dont deux souffraient du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), de grosses cellules réfractiles, gonflées, à faible durée de vie ont pu être observées. L'analyse de ces cellules en microscopie électronique à transmission a montré qu'il s'agissait de cellules infectées par un virus d'environ 200 nm de diamètre, dont l'apparence morphologique le rapproche des herpèsvirus (Figure 1). En outre, des analyses en immunofluorescence et hybridation *in situ* ont permis de détecter la présence d'antigènes viraux et d'ADN viral dans ces cellules qui possédaient par ailleurs des marqueurs de surface caractéristiques des lymphocytes B. A la différence du virus d'Epstein-Barr qui infecte également les lymphocytes B, ce nouveau virus n'induisait pas leur immortalisation. De plus, aucune réactivité croisée avec les autres herpèsvirus humains connus n'a été remarquée au niveau sérologique. Ainsi, les auteurs ont conclu à la découverte d'un nouvel herpèsvirus, différant des autres virus de cette famille déjà connus par son tropisme cellulaire et ses propriétés antigéniques, et l'ont initialement nommé HBLV, pour human B-lymphotropic virus.

### 2. Classification

Au moment de la découverte du virus HBLV, plusieurs dizaines de virus de la famille des Herpesviridae avaient été décrits, dont cinq herpèsvirus humains: Les virus herpès simplex (HSV) 1 et 2 (ou HHV-1 et 2), le virus varicelle-zona (VZV ou HHV-3), le virus d'Epstein-Barr (EBV ou HHV-4) et le cytomégalovirus humain (HCMV ou HHV-5). HBLV a tout d'abord été considéré comme un virus proche de l'EBV, car il semblait, comme ce dernier, infecter préférentiellement les lymphocytes B (Lopez et al., 1988; Salahuddin et al., 1986), et a donc été classé parmi les Gammaherpesvirinae. Par la suite, des études plus poussées ont contredit les premières observations et ont montré qu'HHV-6 se répliquait plus efficacement dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Ablashi et al., 1988; Lusso et al., 1988; Takahashi et al., 1989).



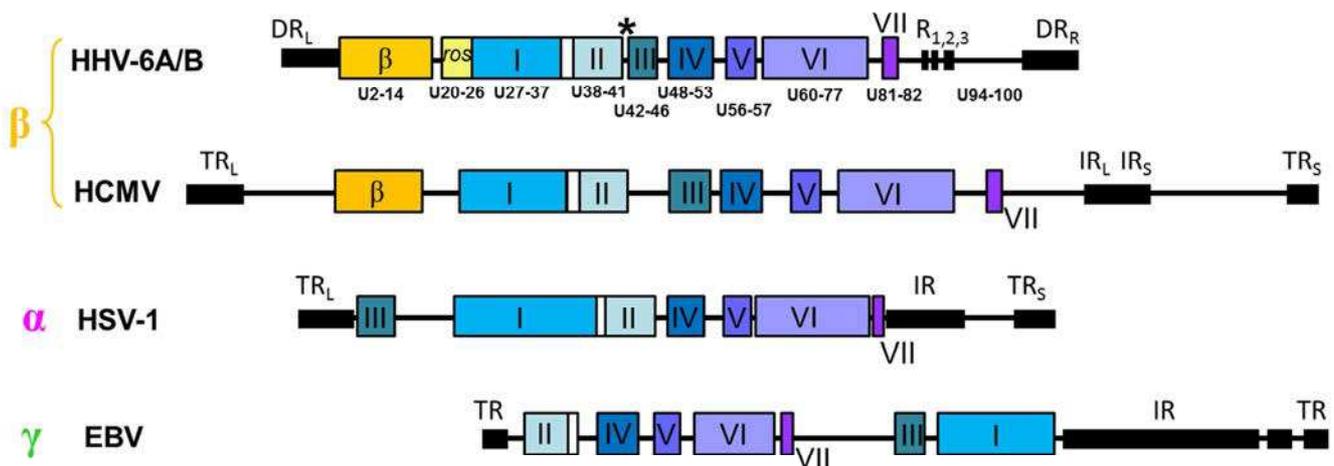
**Figure 1. Relation phylogénétique entre HHV-6A, HHV-6B et les autres Herpesviridae humains.** Phylogénie basée sur l'alignement des séquences de la glycoprotéine gH. Les trois sous-familles Alpha, Beta et Gammaherpesvirinae sont représentées, ainsi que les genres au sein de chaque sous-famille. Adapté d'après Braun et al., 1997.

Le nom d'HBLV a ainsi été rapidement abandonné, et seule la désignation taxonomique de sixième herpèsvirus humain (HHV-6) a été conservée. Grâce au séquençage d'une partie d'environ 20 kb du génome d'HHV-6, contenant dix-sept cadres de lecture, une analyse comparative entre les différents herpèsvirus a pu être réalisée (Lawrence et al., 1990). Parmi les cadres de lectures analysés, certains se sont avérés spécifiques au génome d'HHV-6, certains étaient au contraire conservés chez tous les herpèsvirus, et enfin certains ne possédaient d'homologue que chez le HCMV. L'analyse de la similarité entre les séquences homologues et de l'organisation des séquences génomiques ont permis de conclure que le HCMV, qui appartient à la sous-famille des Betaherpesvirinae, est le plus proche homologue d'HHV-6 (figure 1).

En 1990, un septième herpèsvirus humain (HHV-7) a été découvert par Frenkel *et al.* (Frenkel et al., 1990). Ce nouveau membre des Herpesviridae constitue le plus proche homologue d'HHV-6 identifié à ce jour (Berneman et al., 1992). Ainsi HHV-6 et HHV-7 appartiennent tous deux à la sous-famille des Betaherpesvirinae, et forment le genre des Roseolovirus.

### **3. HHV-6A, HHV-6B**

Suite à la description de la première souche d'HHV-6 (souche GS) (Salahuddin et al., 1986), de nombreuses autres souches ont été isolées. Les souches U1102 et Z29, par exemple, ont été obtenues à partir de cellules de patients atteints de SIDA, vivant en Ouganda et au Zaïre, respectivement (Downing et al., 1987; Lopez et al., 1988). Plusieurs études, cherchant à caractériser ces souches, ont indiqué des différences dans les profils de restriction de certaines souches et dans leur réactivité à plusieurs anticorps monoclonaux (Ablashi et al., 1991; Aubin et al., 1991, 1993; Chandran et al., 1992; Schirmer et al., 1991). Des différences de tropisme cellulaire entre les souches ont également été observées : certaines se répliquent efficacement dans la lignée lymphoblastique T HSB2, mais pas dans la lignée de même type MOLT3, tandis que l'inverse est constaté avec d'autres (Ablashi et al., 1991). En accord avec les observations précédentes, l'analyse par Gompels *et al.* de trois régions génomiques séquencées à partir de quinze souches différentes d'HHV-6 confirme la ségrégation de ces souches en deux groupes distincts mais proches, avec des variations de l'ordre de 4 à 6% au niveau des séquences nucléotidiques (Gompels et al., 1993). Ces différents paramètres ont ainsi permis de classer les différentes souches d'HHV-6 en deux variants : le variant HHV-6A, dont les prototypes sont les souches GS et U1102, et le variant HHV-6B, dont le prototype est la souche Z29. Depuis, la distinction entre les deux variants s'est confirmée et amplifiée, notamment avec le séquençage complet des génomes des



**Figure 2. Organisation du génome d'HHV-6 et comparaison avec les autres sous-familles d'Herpesviridae.** Le génome d'HHV-6 contient une séquence codante U (U1 à U100) encadrée et entrecoupée par des séquences répétées (DR<sub>L</sub>, DR<sub>R</sub>, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>). L'étoile représente la localisation de l'origine du cycle lytique de réplication. Les organisations globales des génomes d'HCMV (Betaherpesvirinae), HSV-1 (Alphaherpesvirinae) et EBV (Gammaherpesvirinae) sont également présentées. Sept « blocs » de gènes sont communs à tous (I à VII), un bloc est retrouvé chez les Betaherpesvirinae (β), et les gènes U20-24,26 (*ros*) sont spécifiques au genre des Roseolovirus.

souches U1102 (variant A) (Gompels et al., 1995), Z29 et HST (variant B) (Dominguez et al., 1999; Isegawa et al., 1999), et la mise en évidence de différences au niveau épidémiologique (Dewhurst et al., 1993). Finalement, en 2012, HHV-6A et HHV-6B ont officiellement été reconnus par le comité international sur la taxonomie des virus comme deux espèces virales distinctes.

## B. Aspects structuraux

### 1. Génome

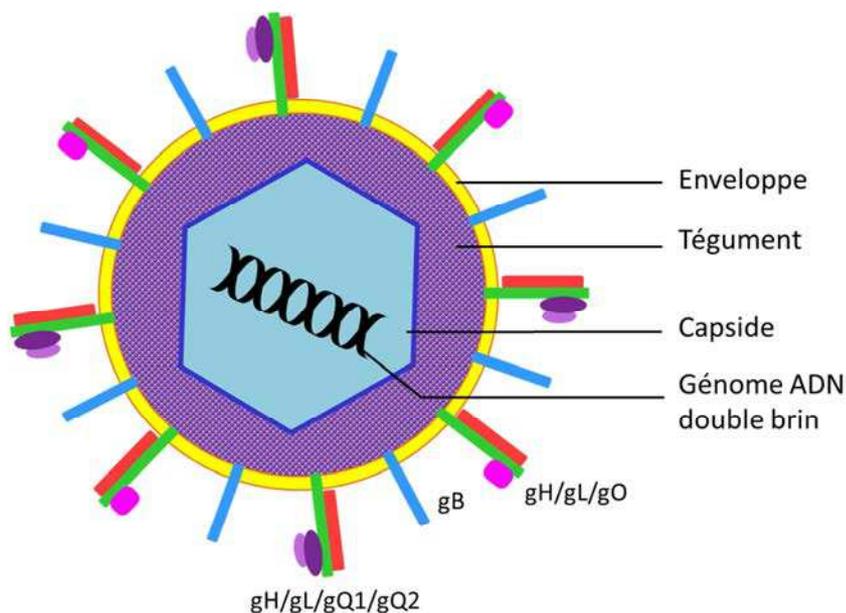
Les génomes d'HHV-6A et HHV-6B, sont composés d'un segment linéaire d'ADN double brin d'environ 160 kb. Ils sont constitués de trois régions principales : une région unique (U) d'environ 140 kb, encadrée par deux régions répétées (DR). La région U est plus interrompue par 3 régions répétées intermédiaires (R1, R2 et R3). En tout, les génomes des deux virus contiennent 119 cadres ouverts de lectures (ORF, pour open reading frame), dont 97 à 102 codent potentiellement pour des protéines (Dominguez et al., 1999; Gompels et al., 1995; Isegawa et al., 1999). Un « cœur » de gènes, qui peut être divisé en sept « blocs », est commun à tous les Herpesviridae. Il contient notamment des gènes essentiels qui codent, par exemple, pour la polymérase virale, pour des protéines structurales ou pour des protéines impliquées dans le « packaging » de l'ADN et l'assemblage des particules. L'organisation globale du génome d'HHV-6A et HHV-6B est similaire à celle d'autres Betaherpesvirinae comme le HCMV, et diffère de celle des Alphaherpesvirinae et des Gammaherpesvirinae (figure 3). De plus, plusieurs gènes, dont la fonction n'est pas toujours bien connue, sont retrouvés uniquement chez les Betaherpesvirinae (figure 2, gènes  $\beta$ ), et certains gènes sont spécifiques aux Roseolovirus (figure 2, gènes *ros*). Six gènes ne sont retrouvés que chez HHV-6A et HHV-6B : les gènes DR3, U6, U9, U22, dont les fonctions sont inconnues, le gène U83 qui code pour une chimiokine virale, et U94, homologue du gène *rep* de l'AAV (adeno-associated virus). Les génomes d'HHV-6A et HHV-6B partagent en moyenne 90% d'identité de séquence nucléotidique. La divergence est accentuée dans certains gènes, en particulier la région IE-1 (U86-U95), et la région qui code pour les glycoprotéines d'enveloppe gQ1 et gQ2 (U97-U100). En outre, 9 ORF du génome d'HHV-6B n'ont pas d'homologues chez HHV-6A, et à l'inverse, 9 ORF décrits chez HHV-6A ne sont pas retrouvés chez HHV-6B. Les fonctions de la plupart de ces ORF « espèce-spécifiques » n'ont pas été étudiées.

## 2. Structure des particules virales

HHV-6A et B sont des virus enveloppés, dont les particules virales matures mesurent environ 200 nm de diamètre (Figure 3). Le génome viral est contenu dans une capsid de symétrie icosaédrique de 90 à 110 nm de diamètre, composée de 162 capsomères (Biberfeld et al., 1987). Plusieurs protéines, dont la « major capsid protein » (pU57), participent à la formation de la capsid complète.

Au cours de leur maturation, les virions acquièrent une enveloppe lipidique, dans laquelle sont ancrées (ou associées) de nombreuses glycoprotéines virales, dont les protéines gB, gH, gL, gM, gN, gO, gQ1 et gQ2. Certaines de ces glycoprotéines peuvent s'associer en complexes multiprotéiques. Notamment les complexes gH/gL/gO et gH/gL/gQ1/gQ2 ont été décrits et semblent importants pour l'entrée du virus.

Entre la capsid et l'enveloppe virale, se trouve une matrice protéique dense, le tégment. Il peut contenir de nombreuses protéines, telles que la « large tegument protein » (pU31), ou la « major antigenic phosphoprotein » (pU11). Les protéines présentes dans le tégment sont souvent également impliquées dans divers processus du cycle viral, tels que la réplication virale, l'empaquetage de l'ADN ou le blocage du cycle cellulaire.



**Figure 4. Représentation schématique de la structure des virions HHV-6.** Les particules virales sont enveloppées, et contiennent un génome ADN double brin dans une capsid de symétrie icosaédrique. Entre l'enveloppe et la capsid se trouve le tégment. Diverses glycoprotéines sont associées à l'enveloppe virale : gB (bleu), gH (vert), gL (rouge), gO (rose), gQ1 et gQ2 (violet). gM et gN ne sont pas représentées ici.

## C. CD46, un récepteur cellulaire d'HHV-6

### 1. Une protéine de régulation du complément

CD46 a initialement été identifiée comme une protéine impliquée dans la régulation de l'activation du système du complément, à l'instar de CD55, CD35 ou CD59, dont les séquences génomiques sont toutes regroupées en un cluster, situé au locus q3.2 du chromosome 1 (Liszewski et al., 1991).

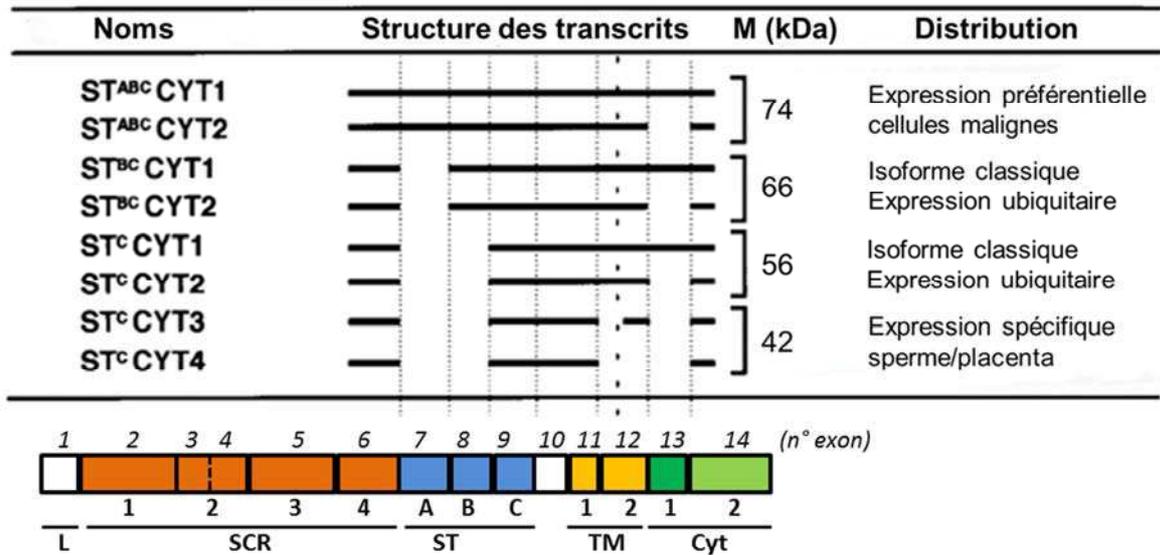
L'activation du système du complément par l'une des trois voies connues, à savoir la voie classique, la voie des lectines et la voie alterne conduit, par l'intermédiaire de cascades réactionnelles, à la formation d'un complexe d'attaque membranaire et à la lyse cellulaire. L'une des étapes indispensables à la formation du complexe d'attaque membranaire est le dépôt à la surface cellulaire des fragments C4b et C3b du complément. La voie classique et la voie de la MBL nécessitent la présence de complexes immuns ou de pathogènes extracellulaires pour être activées. En revanche, l'activation de la voie alterne se fait par l'hydrolyse spontanée de la protéine C3, naturellement présente à forte concentration dans le plasma. Le fragment C3b ainsi libéré peut alors se déposer à la surface des cellules même en l'absence de pathogène. Afin d'éviter l'autolyse de cellules saines, des mécanismes de régulation sont nécessaires. La protéine CD46, présente à la surface de toutes les cellules nucléées de l'organisme, est capable de lier les fragments C3b et C4b du complément, et de faciliter leur clivage par une sérine protéase, aussi appelée facteur I (Seya et al., 1986). Ce clivage prévient ainsi l'activation des cascades du complément qui mènent à la formation du complexe d'attaque membranaire et protège les cellules de la lyse.

### 2. Structure et isoformes

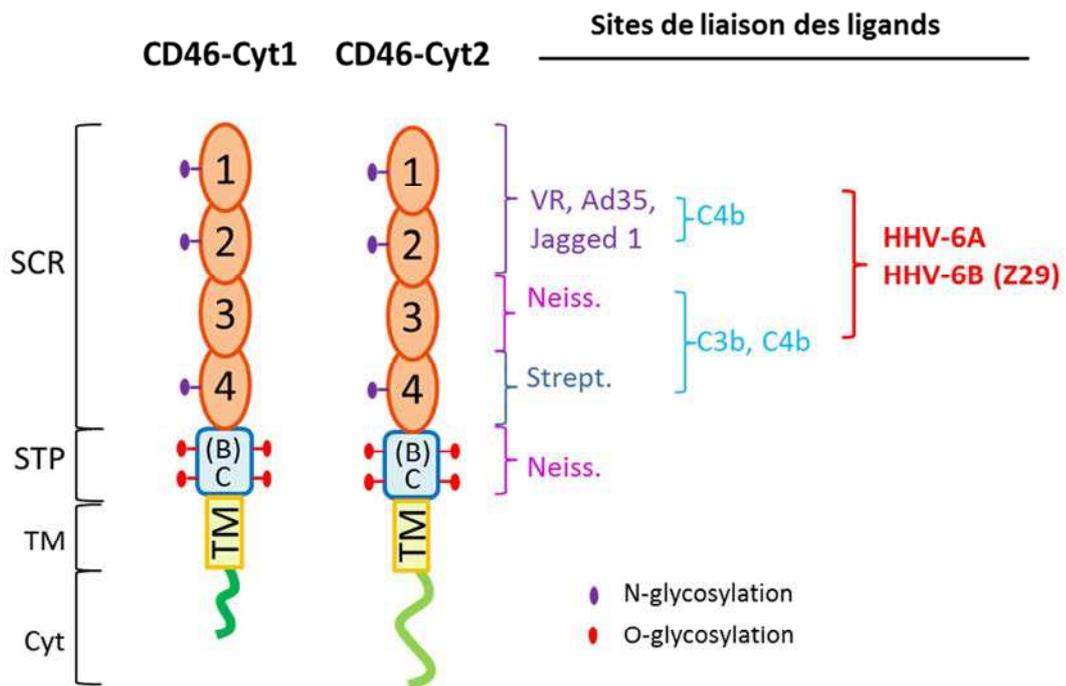
CD46 est une glycoprotéine transmembranaire composée de trois domaines principaux : un domaine extracellulaire, une partie transmembranaire (TM) et une queue intra-cytoplasmique. Le domaine extracellulaire de CD46 comprend quatre régions consensus répétées (SCR, pour « short consensus repeat ») dont trois possèdent des sites de N-glycosylation (SCR 1, 2 et 4), suivies de régions riches en sérine, thréonine et proline (STP), fortement O-glycosylées. Comprise entre la région STP et la partie TM, se trouve une petite région de fonction encore inconnue (figure 4).

La séquence génomique de CD46 est composée en tout de quatorze exons, et peut, grâce à des mécanismes d'épissage alternatif, mener à la production d'une multitude d'isoformes de la protéine (Russell et al., 1992). Tout d'abord, trois exons (n°7, 8 et 9) codent

## A. Structure et distribution des isoformes de CD46



## B. Isoformes classiques et sites de liaison aux ligands



**Figure 5. Structure de la protéine CD46.** **A.** Structure et distribution des différents transcrits de CD46. Les quatre transcrits classiques, sont exprimés de façon ubiquitaire. L'organisation de la séquence génomique de CD46, qui comprend 14 exons est représentée sous le tableau (adapté d'après Seya, 1999). **B.** Représentation schématique de la structure des isoformes classiques CD46-Cyt1 et CD46-Cyt2 (ST<sup>BC</sup> ou ST<sup>C</sup>), et des sites de fixation du virus de la rougeole (VR), de l'Adénovirus (Ad35), de Neisseria (Neiss.), de Streptococcus (Strept.) et des ligands endogènes C3b, C4b et Jagged 1.

pour les régions STP (A, B et C, respectivement) et peuvent être délétés lors de l'épissage. Les isoformes les plus courants possèdent la région C, parfois la région B, mais très rarement la région A, qui n'est retrouvée que dans des types cellulaires particuliers (cellules malignes, glandes salivaires). De plus, deux queues intra-cytoplasmiques cyt1 et cyt2, codées par les exons 13 et 14, et de taille sensiblement différente (16 aa et 23 aa, respectivement) peuvent être exprimées. La structure tridimensionnelle de la région SCR entière (SCR 1, 2, 3 et 4) a été décrite en 2010, et a révélé une organisation linéaire des domaines SCR 1, 2 et 3, puis une courbure entre les domaines SCR 3 et 4. La partie extracellulaire aurait ainsi une forme de « crosse de hockey », qui pourrait jouer un rôle important dans son activité (Persson et al., 2010).

La protéine CD46 est exprimée de façon ubiquitaire par toutes les cellules humaines analysées jusqu'à présent, excepté les érythrocytes (Seya et al., 1999). Elle est fortement exprimée dans le sperme (Anderson et al., 1993), au niveau du trophoblaste et du tractus génital où elle pourrait jouer un rôle important dans la fertilité (Hsi et al., 1991). Il existe également une forme soluble de CD46, qui a été détectée dans le plasma, les larmes et le liquide séminal (Hara et al., 1992).

Plusieurs isoformes peuvent être exprimés à la surface d'une même cellule, néanmoins certains tissus présentent des spécificités. En effet, seules les isoformes Cyt2 sont exprimées dans les testicules (Riley et al., 2002) et dans le cerveau (Johnstone and Loveland, 1993).

### **3. Un récepteur pour divers pathogènes**

#### **a. CD46 se lie à des pathogènes variés**

Le nom d'« aimant à pathogènes » (ou pathogen's magnet) a été attribué à CD46 du fait de sa capacité à se lier à une multitude de pathogènes, aussi bien virus que bactéries (Cattaneo, 2004). Le virus de la rougeole (VR) fut le premier pathogène ligand de CD46 identifié. Naniche *et al.* ont tout d'abord identifié un anticorps monoclonal capable de bloquer l'attachement du VR aux cellules humaines (Naniche et al., 1992). L'immunopurification de la protéine reconnue par cet anticorps a ensuite permis le séquençage de sa partie N-terminale et a montré qu'il s'agissait de la glycoprotéine CD46 (Naniche et al., 1993). Seules les souches vaccinales du VR utilisent CD46 comme récepteur d'entrée (Bartz et al., 1998), les souches sauvages se liant quant à elles à la protéine CD150 (ou SLAM), dont l'expression est plus restreinte que CD46 (Tatsuo et al., 2000).

CD46 a par la suite été identifié comme récepteur de plusieurs bactéries. L'attachement à la membrane des kératinocytes de la bactérie gram-positif *Streptococcus pyogenes* (streptococcus de groupe A), impliquée dans diverses infections cutanées, est dû à l'interaction entre CD46 et la protéine M bactérienne (Okada et al., 1995). Deux espèces pathogènes de bactéries neisseria (*N. gonorrhoeae* et *N. meningitidis*) utilisent également CD46 comme récepteur d'attachement aux cellules épithéliales (Källström et al., 1997). Plusieurs études ont de plus montré que différents sérotypes d'adénovirus (Ad) pouvaient se lier à CD46, (Gaggar et al., 2003; Segerman et al., 2003; Sirena et al., 2004; Wu et al., 2004).

#### **b. Un récepteur pour HHV-6A et HHV-6B**

En 1999, CD46 a été identifié comme récepteur cellulaire à la fois pour HHV-6A et HHV-6B (Santoro et al., 1999). Santoro *et al.* ont analysé l'expression de plusieurs protéines à la surface de lymphocytes T au cours de l'infection par HHV-6A, et ont observé une diminution spécifique de l'expression de CD46. En outre l'infection a pu être bloquée en présence d'un anticorps monoclonal dirigé contre CD46, et de la protéine CD46 soluble. Un test de fusion cellulaire basé sur l'expression du gène rapporteur de la  $\beta$ -galactosidase, a ensuite confirmé l'importance de CD46 pour l'entrée du virus. Au cours de ce test, des cellules effectrices infectées avec HHV-6A, et exprimant ainsi les glycoprotéines virales à leur surface, ne semblent fusionner qu'avec des cellules cibles exprimant CD46.

Pour HHV-6B, les données semblent variables selon les souches étudiées. Dans le cas des souches PL-1 et Z29, CD46 est nécessaire pour l'entrée et la fusion induite par HHV-6B (Pedersen et al., 2006; Santoro et al., 1999). A l'inverse, CD46 ne semble pas jouer de rôle dans l'infection par la souche HST (Mori et al., 2002).

#### **c. Un récepteur, plusieurs sites de fixation**

Ces pathogènes représentent ainsi de multiples ligands pour CD46, qui interagit avec chacun d'eux via des domaines protéiques différents (figure 5). Plusieurs études ont montré que les sites de liaison des fragments C3b et C4b sont distincts (Liszewski et al., 2000), et que la région SCR 1 n'en fait pas partie. La résolution de la structure de l'intégralité des domaines SCR a permis de localiser plus précisément les sites probables d'interaction avec C3b et C4b au niveau de la jonction entre les régions SCR 3 et 4 (Persson et al., 2010). Au contraire, les sites de fixation de l'hémagglutinine du VR, et de la fibre knob de l'adénovirus se situent au niveau des régions SCR 1 et 2 (Buchholz et al., 1997; Fleischli et al., 2005; Manchester et al., 1997). *Streptococcus*, quant à lui, se lie à la région SCR4 (Giannakis et al., 2002), et l'interaction entre les pili de *Neisseria* et CD46 dépend à la fois de la région SCR3 et de la région STP (Källström et al., 2001).

En ce qui concerne HHV-6, une série d'expériences de fusion, réalisées avec la souche GS d'HHV-6A, ont montré que l'interaction entre CD46 et les glycoprotéines virales était indépendante de l'isoforme Cyt1 ou Cyt2 exprimé (Greenstone et al., 2002). De plus, l'utilisation de protéines recombinantes, dans lesquelles certaines régions SCR ont été délétées ou remplacées par les domaines homologues de la protéine CD55 (ou DAF, autre membre de la famille des protéines de régulation de l'activation du complément) a permis de déterminer les sites nécessaires à la liaison d'HHV-6A et à la fusion induite par le virus. Ainsi, contrairement au virus de la rougeole, HHV-6A se lie à CD46 au niveau des régions SCR 2 et 3. En parallèle, une seconde étude a montré que la région SCR 4, en plus des régions SCR 2 et 3, est nécessaire à la fusion cellulaire induite par l'interaction entre CD46 et HHV-6A (souche U1102) (Mori et al., 2002).

#### **d. Signalisation via CD46**

Les deux domaines intra-cytoplasmiques possibles de CD46, Cyt1 et Cyt2, contiennent des motifs de signalisation, et confèrent à CD46 la capacité de transmettre des signaux intracellulaires et d'induire des modifications phénotypiques dans différents types cellulaires.

##### **a. Signalisation dans les lymphocytes T humains**

Dans les lymphocytes T, l'engagement de CD46 seul conduit à l'activation de voies de signalisation intracellulaires. La stimulation de CD46 à l'aide d'un anticorps monoclonal induit la phosphorylation des protéines adaptatrice p120<sup>CBL</sup> et LAT (linker of activated T cell), qui sont impliquées dans la régulation de l'activation des lymphocytes (Astier et al., 2000). De plus, l'engagement de CD46 affecte la polarisation cellulaire, notamment en induisant la translocation du centre organisateur des microtubules (MTOC) (Oliaro et al., 2006).

Lorsqu'il coïncide avec la stimulation du TCR, l'engagement de CD46 peut également constituer un signal de co-stimulation pour l'activation des lymphocytes T. La co-stimulation CD46-CD3 chez les cellules T est fortement activatrice. Elle induit leur prolifération (Astier et al., 2000), affecte leur polarisation (Oliaro et al., 2006) et provoque des changements morphologiques, probablement modifiant l'organisation des filaments d'actines (Zaffran et al., 2001). L'engagement simultané de CD46 et de CD3 chez des lymphocytes CD4<sup>+</sup> naïfs induit un phénotype de type Th1, avec une forte production d'IFN $\gamma$  (Cardone et al., 2010). Lorsque cette stimulation est réalisée en présence d'IL-2, elle provoque de plus la sécrétion d'IL-10, cytokine caractéristique d'un profil régulateur. CD46 exerce ainsi probablement un rôle de transition depuis un phénotype Th1 pro-inflammatoire vers un phénotype régulateur, lorsque les lymphocytes sont activés et sécrètent de fortes concentrations d'IL-2. Récemment, une étude a démontré que cette activité de modulation du phénotype des

lymphocytes T était dépendante de l'interaction entre CD46 et certaines protéines de la voie Notch, qui joue un rôle important lors du développement embryonnaire (Le Friec et al., 2012). Dans les lymphocytes T naïfs, CD46 interagit avec la protéine membranaire Jagged 1. La stimulation de CD46 induit notamment une augmentation de l'expression de Jagged 1 et de son ligand Notch 1, tandis que l'expression en surface de CD46 est contrairement diminuée. Jagged 1 serait ainsi « libérée » de son interaction avec CD46, et pourrait se lier à Notch 1. Cette étude indique que ces interactions entre CD46 et les protéines du système Notch sont indispensables à la régulation du phénotype des lymphocytes T via CD46.

De plus, la cinétique de l'engagement de CD46 semble avoir une importance capitale dans les effets induits : une stimulation de CD46 effectuée avant la stimulation de CD3 inhibe la formation de la synapse immunologique, et donc l'activation des lymphocytes. Ceci est probablement la conséquence de la relocalisation des radeaux lipidiques induite par la stimulation de CD46 (Ludford-Menting et al., 2011).

En intracellulaire, la co-stimulation CD46-CD3 induit la phosphorylation de la protéine Vav, et l'activation de Rac, qui jouent un rôle critique dans l'activation des lymphocytes T, ce qui conduit à l'activation des MAPK (Mitogen-activated protein kinases) ERK (extracellular-signal-regulated kinases) 1 et 2, probablement en lien avec l'activation de la prolifération (Zaffran et al., 2001). En outre, dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> l'engagement simultané de CD46, CD3 et CD28 augmente la phosphorylation de ZAP70 (Zeta-chain-associated protein kinase 70) et active les MAPK ERK, JNK (c-Jun N-terminal kinase) et p38 (Sánchez et al., 2004).

#### **b. Signalisation dans d'autres types cellulaires**

CD46 étant exprimé à la surface de toutes les cellules nucléées humaines, sa stimulation peut également avoir un impact sur d'autres types cellulaires. La stimulation de cellules dendritiques avec des anticorps anti-CD46, par exemple, augmente la sécrétion des cytokines IL-12 et IL-23 (Vaknin-Dembinsky et al., 2008). Au contraire, elle inhibe la production d'IL-12 p40 dans les macrophages (Karp et al., 1996). Par ailleurs, la stimulation de CD46 dans la lignée astrocytaire U251 active la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 (Ghali and Schneider-Schaulies, 1998).

#### **c. Internalisation**

Lors de la stimulation de CD46 par plusieurs ligands, dont HHV-6A et HHV-6B, son expression à la surface de la cellule est inhibée. Crimeen-Irwin *et al.* ont montré que l'engagement CD46 déclenche la formation de pseudopodes et une internalisation de type macropynocytose (Crimeen-Irwin et al., 2003). D'autre part, un clivage du domaine extracellulaire de CD46 a été décrit dans des cellules nécrotiques ou apoptotiques (Cole et al., 2006; Hakulinen and Keski-Oja, 2006), certainement afin de faciliter la lyse de ces cellules

par le système du complément. Ce clivage se produit également après stimulation de CD46 dans les lymphocytes T, probablement grâce à l'action de metalloprotéases (Ni Choileain et al., 2011), et permet la production d'une forme soluble de CD46, détectée dans les larmes, le liquide séminal et le plasma (Hara et al., 1992).

#### **d. Cyt1 vs Cyt2**

Les domaines Cyt1 et Cyt2 possèdent des sites de phosphorylation par des protéines kinases différents (Riley-Vargas et al., 2004), et peuvent induire des voies de signalisation intracellulaires distinctes. L'engagement de CD46 sur les lymphocytes T conduit à la phosphorylation spécifique de l'isoforme Cyt2 par une kinase src (Lck) (Wang et al., 2000). D'autre part, seul l'isoforme Cyt1 interagit avec la protéine DLG4 (disks large homolog 4), potentiellement impliquée dans des mécanismes de polarisation cellulaire (Ludford-Menting et al., 2002).

De plus, les isoformes Cyt1 et Cyt2 semblent avoir des propriétés inflammatoires distinctes. Afin d'étudier chaque isoforme séparément, Marie *et al.* ont généré des lignées de souris transgéniques qui expriment soit CD46-Cyt1, soit CD46-Cyt2 (Marie et al., 2002). La co-stimulation CD3/CD46 induit la prolifération cellulaire dans des lymphocytes T issus des souris CD46-Cyt1, ainsi que la production d'IL-10, cytokine anti-inflammatoire. Au contraire, l'expression de CD46-Cyt2 seul est associée à une inhibition de la prolifération et de la sécrétion d'IL-10. De façon globale, l'expression de CD46-Cyt1 *in vivo* inhibe l'inflammation provoquée par l'induction d'une réaction d'hypersensibilité, alors qu'au contraire, l'expression de CD46-Cyt2 augmente cette inflammation.

Une seconde étude montre que la stimulation spécifique de Cyt1 induit la production d'IL-10 tandis que la stimulation de Cyt2 inhibe la sécrétion d'IFN $\gamma$  et augmente l'expression de CTLA4 dans les lymphocytes T (Ni Choileain et al., 2011). De plus, ces effets dépendent du clivage de Cyt1 et Cyt2 par un complexe préséniline/ $\gamma$ -sécrétase. Le clivage de Cyt1 jouerait ainsi un rôle activateur, en provoquant une augmentation la prolifération et la production d'IL-10, puis le clivage de Cyt2 inhiberait la sécrétion d'IFN $\gamma$ .

D'autre part, Joubert *et al.* ont montré que la stimulation de CD46 peut induire l'autophagie via son interaction avec la protéine GOPC (Golgi-associated PDZ and coiled-coil motif-containing protein) (Joubert et al., 2009). De façon intéressante, seul CD46-Cyt1 semble se lier à GOPC, ce qui représente une différence supplémentaire entre les isoformes Cyt1 et Cyt2.

## D. Cycle Viral

### 1. Entrée

#### a. **Glycoprotéines virales impliquées dans l'entrée**

En général, l'infection de cellules cibles par les herpèsvirus nécessitent en premier lieu une étape d'attachement, par la liaison plus ou moins spécifique de glycoprotéines d'enveloppe à des molécules présentes à la surface cellulaire. Cette première étape facilite ensuite l'interaction spécifique entre le récepteur d'entrée et son ligand viral, qui permet la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane lipidique cellulaire (membrane plasmique ou de l'endosome), et l'initiation d'un cycle de réplication.

Les modalités d'attachement d'HHV-6A et HHV-6B à la membrane des cellules cibles sont encore peu connues à ce jour, et semblent complexes. De nombreuses glycoprotéines sont présentes à la surface des particules virales, ancrées ou non dans l'enveloppe, et souvent organisées en complexes multi-protéiques (figure 5).

#### ***HHV-6A***

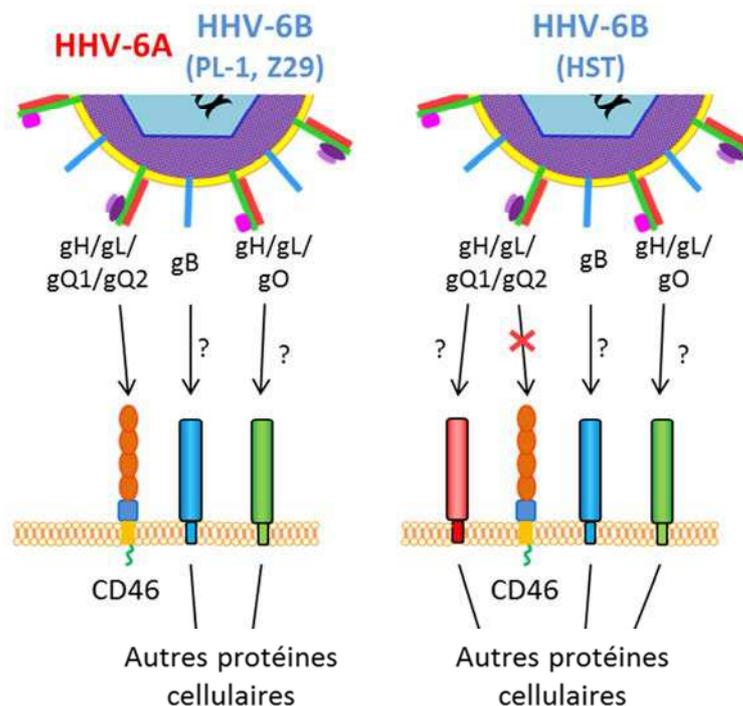
La glycoprotéine B (gB) semble jouer un rôle important dans l'attachement de la particule virale à la cellule cible. En effet un anticorps neutralisant, reconnaissant spécifiquement la protéine gB du virus HHV-6A, a été décrit (Takeda et al., 1996). Cette glycoprotéine est très conservée chez tous les Herpesviridae et pourrait, par analogie avec la gB d'HSV-1, participer aux étapes d'attachement et de fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire.

D'autre part, la glycoprotéine H (gH) est impliquée dans la liaison au récepteur cellulaire puisque qu'elle peut être co-immunoprécipitée avec CD46. De plus, les anticorps reconnaissant la gH sont neutralisants pour l'infection (Santoro et al., 2003). Cette protéine transmembranaire est ancrée dans la bicouche lipidique de l'enveloppe virale, et se trouve associée à la glycoprotéine L (gL) (Anderson 1996). De plus, les glycoprotéines Q1 (gQ1) et Q2 (gQ2), spécifiques aux HHV-6, peuvent s'associer à gH et gL et former le complexe gH/gL/gQ1/gQ2, capable de se lier à CD46 (Mori et al., 2003a). Ainsi, ce complexe représente le ligand viral du récepteur CD46 pour HHV-6A.

Un second complexe impliquant la protéine gH a été décrit. Il est composé du complexe gH/gL et de la glycoprotéine O (gO), commune à la sous-famille des Betaherpesvirinae. Cependant, ce complexe gH/gL/gO ne semble pas interagir avec CD46, et pourrait donc se lier à un autre récepteur cellulaire (Mori et al., 2004).

## HHV-6B

Les travaux de Santoro *et al.* indiquent que CD46 est un récepteur cellulaire à la fois pour HHV-6A et pour HHV-6B (souches PL-1 et Z29) (Santoro *et al.*, 1999). Toutefois, selon d'autres études, il ne semble pas impliqué dans l'entrée de la souche HST d'HHV-6B (Mori *et al.*, 2002). Comme chez HHV-6A, les complexes gH/gL/gQ1/gQ2 et gH/gL/gO sont présents dans les virions de la souche HST. Cependant le complexe gH/gL/gQ1/gQ2 de cette souche ne se lie pas à CD46 (Mori *et al.*, 2004). Ces données contradictoires pourraient s'expliquer par des différences intrinsèques entre les souches, mais aussi par le mode de production des particules virales. En effet, le type cellulaire utilisé pourrait influencer les modalités d'épissage et de maturation des protéines gQ1 et gQ2. Ainsi l'implication de CD46 dans l'entrée d'HHV-6B semble controversée, et les glycoprotéines virales mises en jeu dans la liaison au récepteur restent à élucider.



**Figure 5. Glycoprotéines virales impliquées dans l'entrée** (adapté d'après Mori *et al.*, 2009 et Pedersen *et al.*, 2006). Le complexe gH/gL/gQ1/gQ2 d'HHV-6A se lie à CD46, mais pas celui d'HHV-6B (souche HST), qui pourrait donc interagir avec un autre récepteur. Au contraire, les complexes gH/gL/gO des deux virus ne se lient pas à CD46 et pourraient être les ligands d'une autre protéine cellulaire. La protéine gB semble également impliquée dans l'entrée, mais son ligand cellulaire n'a pas été identifié.

## **b. Entrée par endocytose**

### ***HHV-6A***

Les mécanismes précis d'entrée pour HHV-6A et B n'ont pas encore été complètement élucidés. Néanmoins, quelques études ont indiqué que la présence de cholestérol, à la fois dans l'enveloppe virale et dans la membrane de la cellule cible, est nécessaire à l'infection par HHV-6A (Huang et al., 2006; Tang et al., 2008). Après infection, les protéines virales gB et gH, ainsi que le récepteur CD46, sont retrouvés au niveau des radeaux lipidiques (Tang et al., 2008), des microdomaines de la membrane plasmique très riches en cholestérol et en sphingolipides. Ceci suggère donc que l'entrée des virions se déroule au niveau de ces radeaux lipidiques.

En général, pour les herpèsvirus, la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire peut avoir lieu soit à la surface de la cellule, soit après une première étape d'endocytose. Le mécanisme mis en jeu dépend le plus souvent du récepteur cellulaire utilisé pour l'entrée, et du type cellulaire infecté (Karasneh and Shukla, 2011).

Une seule étude concernant le mécanisme d'entrée des virus HHV-6 a été réalisée (Cirone et al., 1992). Dans cette étude, l'internalisation de particules HHV-6A a été observée par microscopie électronique lors de l'infection de cellules HSB2. Aucune fusion directement à la membrane plasmique n'a été observée, alors que des virions enveloppés étaient présents, à l'intérieur de vésicules. Ces observations suggèrent fortement la mise en jeu de l'endocytose dans l'entrée d'HHV-6A dans les cellules HSB2. Ce mécanisme d'internalisation a été confirmé pour l'infection de lymphocytes primaires humains grâce à des expériences d'inhibition de l'endocytose pH-dépendante.

### ***HHV-6B***

Comme pour HHV-6A, des mécanismes d'endocytose sont utilisés lors de l'internalisation des virions dans la lignée de lymphocytes T humains J-Jhan et dans les lymphocytes primaires humains (Cirone et al., 1992). L'importance des radeaux lipidiques dans l'infection par HHV-6B n'a pas été déterminée.

Ainsi, l'entrée d'HHV-6A et HHV-6B dans certaines cellules, dont les lymphocytes T, peut se faire par endocytose, ceci n'excluant pas la possibilité que d'autres mécanismes soient mis en jeu lors de l'infection d'autres types cellulaires.

## 2. Transcription et répllication du génome

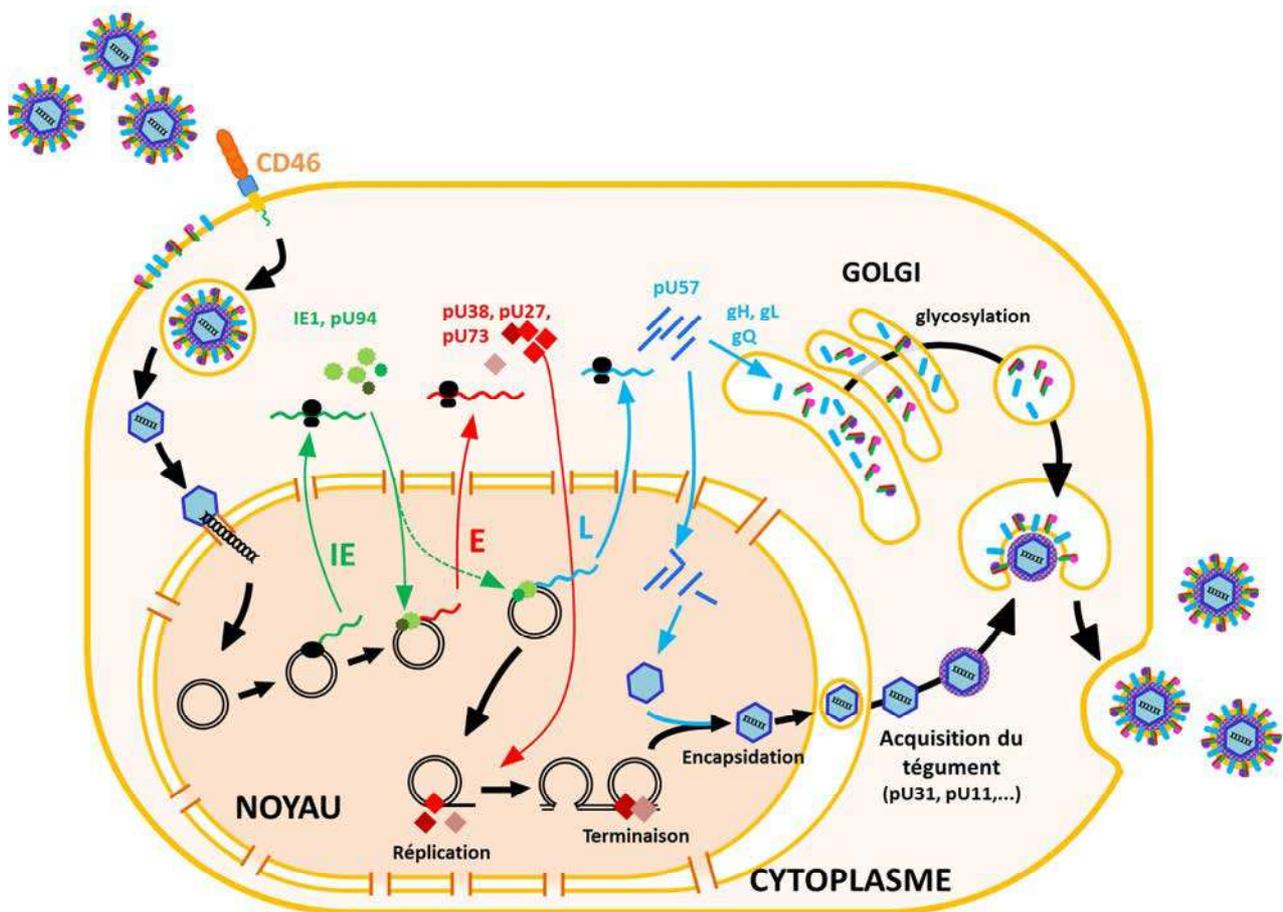
Suite à la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'endosome, la nucléocapside est libérée dans le cytoplasme et est transportée vers le noyau. Les modalités de transport de cette nucléocapside vers le noyau n'ont pas été décrites pour HHV-6A et B, mais sont probablement proches de celles observées pour d'autres herpesvirus, qui utilisent le réseau de microtubules. La nucléocapside est acheminée jusqu'aux pores nucléaires, où le génome viral est libéré dans le nucléoplasme, puis circularisé (Boehmer and Villani, 2003). Le génome viral est ensuite transcrit et répliqué (figure 6).

### **a. Transcription et traduction des gènes viraux**

La transcription et la traduction des gènes viraux sont effectuées par les protéines de la machinerie cellulaire, et se déroule en 3 étapes cinétiques (figure 6): très précoce (IE, pour immediate-early), précoce (E, pour early) et tardive (L, pour late). Les protéines IE sont les premières produites au cours du cycle viral, et régulent la transcription d'autres gènes viraux. Les protéines E sont les protéines impliquées dans la répllication du génome viral, et leur expression dépend de l'expression des protéines régulatrices IE. Après leur production dans le cytoplasme, les protéines E, dont la polymérase virale pU38, migrent dans le noyau pour effectuer la répllication. Les protéines L sont produites plus tardivement au cours du cycle viral. Ce sont en général des protéines structurales (protéines de capsid, glycoprotéines d'enveloppe) et certaines sont glycosylées. Contrairement à l'expression des gènes E, la transcription des gènes L est dépendante de l'activité de la polymérase virale (De Bolle et al., 2005a).

### **b. Répllication du génome viral**

La répllication de l'ADN viral nécessite la présence de 7 protéines virales (De Bolle et al., 2005a). La protéine pU73, codée par le gène U73, se lie à l'origine de répllication et induit l'ouverture du double brin d'ADN. Un complexe hélicase/primase, composé des produits des gènes U43, U74 et U77, maintient cette ouverture et assure la synthèse des amorces d'ARN nécessaires au fonctionnement de la polymérase virale. L'ADN simple brin est alors stabilisé par la protéine de liaison à l'ADN pU41 (major DNA binding protein, produit du gène U41), et l'ADN polymérase virale pU38, accompagnée d'un facteur de processivité, p41 (ou pU27 car codée par le gène U27), synthétise le brin complémentaire. Dans le génome d'HHV-6, la région U79-U80 code pour quatre protéines supplémentaires, probablement impliquées dans la répllication virale. Bien que ces protéines ne semblent pas nécessaires à la répllication, elles pourraient y participer en augmentant son efficacité (Taniguchi et al., 2000).



**Figure 6. Cycle viral d'HHV-6A et HHV-6B** (adapté d'après De Bolle *et al.*, 2005). Grâce à l'interaction de glycoprotéines virales avec le récepteur CD46, les particules virales entrent dans la cellule par des mécanismes d'endocytose (au moins dans certains cas). La capside est acheminée vers le noyau où l'ADN viral est libéré et circularisé. Les protéines IE sont synthétisées rapidement, puis régulent la transcription des gènes E, impliqués dans la réplication virale. Les protéines produites, notamment pU38 (polymérase), pU27 (facteur de processivité), pU73 (protéine de liaison à l'origine de réplication), relocalisent dans le noyau pour effectuer la réplication virale. Plus tardivement, les gènes L, codant principalement pour des protéines structurales sont transcrits. Les protéines de capsides (pU57, notamment) migrent dans le noyau et s'assemblent autour des génomes répliqués, tandis que les glycoprotéines sont glycosylées dans l'appareil de golgi. La capside sort probablement du noyau en acquérant une enveloppe transitoire par bourgeonnement dans l'espace périnucléaire. L'acquisition du tégument se fait dans le cytoplasme, et celle l'enveloppe définitive par bourgeonnement dans des vésicules golgiennes dans lesquelles sont ancrées les glycoprotéines glycosylées. Les virions matures sont ensuite exocytés.

La réplication du génome des herpèsvirus se fait ensuite suivant le modèle du « cercle tournant », produisant ainsi des concatémères ADN double brin de plusieurs génomes viraux. Grâce à des séquences signal situées en fin de génome dans les régions DR, ce concatémère est clivé. L'encapsidation de chacun des génomes linéaires obtenus est ensuite réalisée à l'intérieur du noyau (De Bolle 2005).

### **3. Assemblage et sortie des particules virales**

Une fois le génome encapsidé, la nucléocapside est exportée vers le cytoplasme et acquiert un tégument et une enveloppe pour former des virions matures. Pour HHV-6A et HHV-6B, les voies d'assemblage et de sortie des particules virales ont peu été étudiées, et restent encore hypothétiques (figure 6).

L'acquisition du tégument semble pouvoir se faire à l'intérieur du noyau, dans des organites spécialisés appelés tégusomes, ou dans le cytoplasme après l'export de la nucléocapside (Maeki and Mori, 2012). En ce qui concerne le transport de la nucléocapside depuis le noyau vers le cytoplasme, un modèle, basé sur des observations en microscopie électronique, a été proposé: la nucléocapside bourgeonnerait dans l'espace périnucléaire et acquerrait une première enveloppe lisse (sans glycoprotéine) puis serait désenveloppée et parviendrait dans le cytoplasme sous forme de capsidie nue. Plusieurs études décrivent de potentiels mécanismes d'acquisition de l'enveloppe virale finale. Une des hypothèses, proposée par Mori *et al.*, serait que l'enveloppement ait lieu par bourgeonnement de la nucléocapside dans des vésicules du réseau trans-golgien dans lesquelles sont ancrées les glycoprotéines d'enveloppe, formant ainsi des vacuoles contenant plusieurs virions matures. Les virions seraient ensuite relargués dans le milieu extérieur par exocytose, grâce à la fusion des vacuoles avec la membrane plasmique (Mori et al., 2008).

## **4. Latence**

### **a. Mécanismes de mise en latence classique**

L'infection de cellules par HHV-6 ne mène pas toujours à un cycle réplicatif complet. Comme la plupart des herpèsvirus, HHV-6 peut établir une infection latente dans certains types cellulaires. *In vivo*, les sites probables d'infection latente sont les monocytes, les macrophages (Kondo et al., 1991), et les progéniteurs myéloïdes (Luppi et al., 1999). *In vitro*, l'établissement d'une infection latente par HHV-6B, sans production de particules virales ni d'antigènes viraux, mais avec une persistance de l'ADN viral a pu être établie dans des monocytes/macrophages humains (Kondo et al., 1991) et dans des lignées de cellules

myéloïdes (Yasukawa et al., 1999). En revanche, HHV-6A n'établirait pas d'infection latente dans les monocytes/macrophages (Kondo and Yamanishi, 2007), mais une étude a décrit une infection latente par ce virus dans une lignée d'oligodendrocyte (Ahlqvist et al., 2005). L'infection par HHV-6A et HHV-6B peuvent donc toutes deux conduire à une mise en latence virale.

Par définition, pendant les phases de latence, la transcription des gènes viraux et la production des protéines virales sont abolis. Cependant, l'expression de quelques transcrits, probablement impliqués dans la maintenance de la latence, peut être détectée. Kondo *et al.*, ont identifié plusieurs transcrits exprimés pendant la latence (LT, pour latency-associated transcripts), produits à partir des ORF qui codent pour deux protéines, IE1 et E2, exprimées pendant le cycle productif. Lorsque l'infection est latente, des sites d'initiation de la transcription différents, situés en amont des gènes IE1 et IE2, sont utilisés et conduisent à la production de transcrits dont la région 5' est modifiée (Kondo et al., 2002). Le gène U94 est également exprimé pendant la latence. Cet homologue du gène rep de l'AAV (adeno-associated virus) est exprimé dans les PBMC de donneurs avec une infection HHV-6 latente (Rotola et al., 1998) et faiblement lors d'infections productives (Rapp 2000). De plus, Caselli *et al.* ont montré que l'ajout de protéine pU94 produite *in vitro* dans des cultures de cellules infectées par HHV-6A, HHV-6B ou HMCV inhibe fortement la réplication virale (Caselli et al., 2006). Ainsi, plusieurs types de transcrits de latence ont été décrits, toutefois les mécanismes précis impliqués dans la mise en latence d'HHV-6A et B sont encore peu connus.

Il est possible d'induire un cycle réplicatif dans des cellules infectées de façon latente par HHV-6. Notamment la stimulation avec du tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) induit l'expression d'antigènes viraux et l'apparition d'effets cytopathiques (Kondo et al., 1991). De même la réplication d'HHV-6B peut être réactivée par surinfection avec HHV-7 (Katsafanas et al., 1996). Lors de la réactivation, une augmentation de l'expression des LT codés par IE1 et IE2 est observée à des temps précoces, et précède l'expression des transcrits impliqués dans le cycle réplicatif. Ceci suggère que ces LT jouent un rôle dans la réactivation du cycle viral (Kondo et al., 2002).

#### **b. Intégration chromosomique**

Il est maintenant admis qu'il existe un nouveau mécanisme de latence pour HHV-6A et B : l'intégration du génome viral dans le génome des cellules infectées. A plusieurs reprises, la présence de génomes d'HHV-6 intégrés (iHHV-6) dans le génome humain a été détectée par PCR ou analyse en FISH (fluorescence in situ hybridization) dans des cellules de patients qui présentaient des niveaux anormalement élevés d'ADN viral dans le sang

(Daibata et al., 1998; Nacheva et al., 2008). En outre, une étude récente par Arbuckle *et al.* a montré la capacité du génome d'HHV-6 à s'intégrer spécifiquement dans certaines régions télomériques lors de l'infection de cellules Jhan (lymphoblaste T) et HEK (human embryonic kidney) *in vitro*. Dans le génome d'HHV-6A et B, deux régions directes répétées (DR) encadrent la région unique (U). Ces deux régions contiennent des séquences répétées TTAGGG, qui sont également retrouvées dans les télomères des chromosomes humains (Arbuckle and Medveczky, 2011). Le séquençage du site d'intégration du génome viral dans le chromosome suggère que l'intégration est réalisée par recombinaison homologue entre les séquences TTAGGG des régions DR du génome viral et les mêmes séquences répétées dans les télomères des chromosomes. Le génome viral semble s'intégrer préférentiellement dans certains chromosomes (chromosomes 9, 17, 18, 19 et 22), mais les raisons de cette spécificité ne sont pas encore connues (Arbuckle and Medveczky, 2011).

Dans la population saine, environ 0,8% des donneurs présentent une intégration d'HHV-6 (Leong et al., 2007). Ce nombre est légèrement augmenté chez les patients hospitalisés (jusqu'à 3,3% (Ward, 2005)), ce qui suggère un rôle potentiel du iHHV-6 dans certaines pathologies. Ainsi, il est important de déterminer si un cycle viral réplicatif peut être activé à partir du génome intégré latent. Quelques études suggèrent que la stimulation à l'aide de TPA ou de trichostatin A (TSA), un inhibiteur d'histone déacétylase (HDAC), peut provoquer une réactivation virale dans des cellules de patients avec HHV-6 intégré. Ces stimuli activent en effet la transcription de plusieurs gènes viraux, la réplication du génome viral, et induisent la production de nouvelles particules virales capables d'infecter la lignée cellulaire productrice MOLT3 (Arbuckle et al., 2010; Daibata et al., 1998).

De plus, l'iHHV-6 peut se transmettre verticalement à la descendance par intégration dans des cellules de la lignée germinale. Certaines personnes possèdent ainsi une copie du génome d'HHV-6 par cellule (ce qui explique par ailleurs le nombre anormalement élevé de copies d'ADN viral par cellule dans le sang de ces individus par rapport aux individus présentant une infection latente sans intégration). La transmission verticale de ce type a été décrite pour la première fois par Daibata *et al.* (Daibata et al., 1999), et a par la suite été confirmée par plusieurs études qui montrent que différents membres d'une même famille possèdent le génome d'HHV-6 intégré au même site, dans le même chromosome (Arbuckle et al., 2010).

Les mécanismes moléculaires qui gouvernent l'intégration d'HHV-6 n'ont pas encore été analysés, mais quelques hypothèses peuvent être émises. Par exemple, le gène U94 est l'homologue du gène *rep* de l'AAV et est impliqué dans l'intégration du génome de ce virus dans le génome de la cellule infectée. Ce gène est l'un des seuls gènes exprimés pendant la

latence d'HHV-6 (Rotola et al., 1998). De plus, la protéine pU94 est capable de se lier à l'ADN simple brin (Caselli et al., 2006; Dhepakson et al., 2002) et à des facteurs de transcription humains (Mori et al., 2000). Ainsi il est possible que pU94 soit impliquée dans la liaison entre le génome viral et le génome humain, et participe au processus de recombinaison homologue.

Bien que quelques cas d'intégration aléatoire du génome complet de l'EBV aient été rapportés (Gao et al., 2006), HHV-6 est, à ce jour, le seul herpesvirus humain capable d'établir une infection latente par intégration dans le génome humain, et d'être transmis à la descendance.

## E. Tropicisme cellulaire

### 1. Cellules immunes

Bien que HHV-6 ait initialement été identifié comme un virus infectant les lymphocytes B, les cellules dans lesquelles l'infection par HHV-6A et HHV-6B est la plus efficace sont les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Wang and Pellett, 2007). Les lignées cellulaires de lymphoblastes T sont d'ailleurs souvent utilisées pour la propagation virale, et il est intéressant de noter que les différents isolats HHV-6A et HHV-6B se répliquent préférentiellement dans des lignées lymphocytaires différentes. Par exemple certaines souches d'HHV-6A, notamment GS et U1102 se répliquent mieux dans les lignées HSB2 ou J-Jhan, respectivement, tandis que les lignées MT4 ou MOLT3 sont utilisées pour propager les souches d'HHV-6B. HHV-6A et HHV-6B se répliquent aussi tous deux dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> primaires (Wang and Pellett, 2007). En revanche, quelques études suggèrent que l'infection des lymphocytes CD8<sup>+</sup> est plus efficace par HHV-6A que par HHV-6B (Grivel et al., 2003; Yasukawa et al., 1998).

HHV-6A et HHV-6B peuvent également infecter les monocytes et les macrophages, dans lesquels HHV-6B semble établir une infection latente (Kondo et al., 1991), mais aussi les cellules dendritiques (Wang and Pellett, 2007). Lusso *et al.* ont de plus montré qu'HHV-6A peut infecter les cellules NK (Lusso et al., 1993).

### 2. Autres types cellulaires

L'infection par HHV-6A et HHV-6B a été testée sur divers autres types cellulaires. Notamment, l'infection par HHV-6A et HHV-6B dans des lignées cellulaires hépatiques a été rapportée (Cermelli et al., 1996), ainsi que l'infection par HHV-6A dans des fibroblastes

(Robert 1996), des cellules endothéliales (Caruso et al., 2002) et différentes cellules épithéliales (Caselli et al., 2012; Chen et al., 1994). De façon intéressante, HHV-6A et HHV-6B peuvent également infecter plusieurs types de cellules neurales (détaillé dans la partie 2.C.2).

## 2<sup>ème</sup> Partie : HHV-6A et HHV-6B, deux pathogènes du système nerveux central

### A. Epidémiologie

#### 1. Répartition, prévalence

HHV-6 est en général considéré comme un virus ubiquitaire présent dans la grande majorité de population adulte. La séroprévalence d'HHV-6 est en effet supérieure à 90% dans la majeure partie du monde (Braun et al., 1997). La détection de l'ADN par PCR dans les PBMC a permis dans certaines études de déterminer quelle espèce (A ou B) d'HHV-6 est présente. HHV-6B est ainsi fréquemment détecté dans les PBMC, contrairement à HHV-6A (Aberle et al., 1996; Di Luca et al., 1994). Les tests sérologiques disponibles pour les études épidémiologiques n'étant pas discriminants entre les espèces A et B, il est difficile de déterminer avec certitude la prévalence de chacune des espèces d'HHV-6. Récemment, des tests sérologiques permettant de différencier HHV-6A et HHV-6B ont été développés (Burbelo et al., 2012; Thäder-Voigt et al., 2011). Les résultats obtenus grâce à ces tests montrent une prédominance d'HHV-6B, avec une séroprévalence d'environ 85%, par rapport à HHV-6A, dont la séroprévalence est inférieure à 10%. Il apparaît cependant que l'infection par HHV-6A pourrait être plus fréquente dans certaines régions. La séroprévalence pour HHV-6A est par exemple nettement plus élevée au Mali qu'aux Etats-Unis (48% contre <10%) (Burbelo et al., 2012). L'infection par HHV-6B serait donc largement répandue dans le monde, tandis que l'infection par HHV-6A serait plus restreinte (tableau 1).

#### 2. Infection primaire

La roséole, ou *exanthem subitum*, est une maladie infantile commune, décrite pour la première fois en 1910. Elle consiste principalement en une rapide montée de fièvre durant quelques jours, suivie d'une éruption cutanée. D'autres symptômes, tels que diarrhées, toux ou gonflement des ganglions lymphatiques peuvent s'y ajouter, mais la maladie reste bénigne dans la majorité des cas.

**Tableau 1. Prévalence chez l'adulte des différents herpèsvirus humains et maladies associées** (adapté d'après Agut, 2011a).

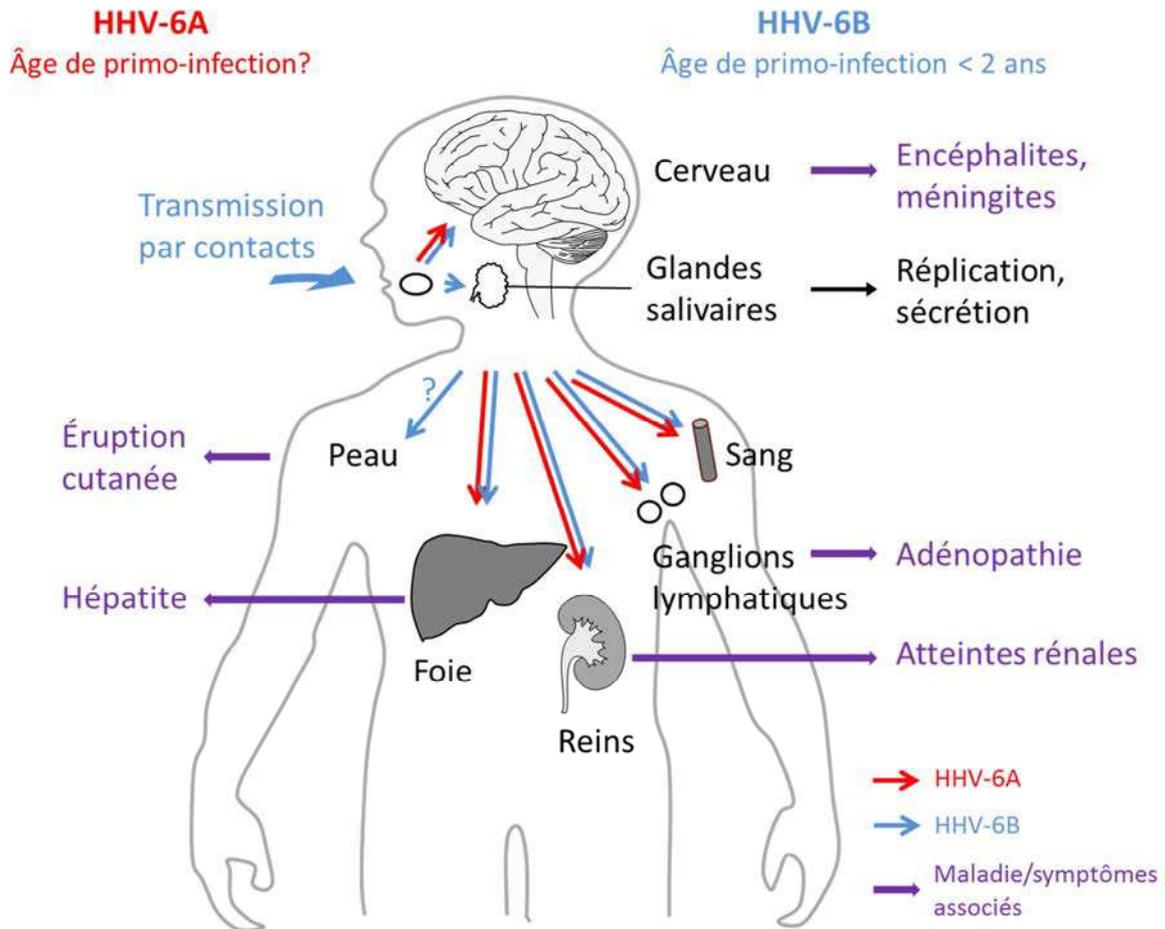
	Nom	Prévalence dans la population adulte	Maladies associées		
			Chez les sujets immunocompétents	Chez les sujets immunodéprimés	Chez les nouveau-nés
<b>α-herpesvirinae</b>	HSV-1 (HHV-1)	~70%	Herpès labial, herpès cutané, conjonctivite, gingivostomatite	Herpès cutanéomuqueux, atteintes viscérales	Herpès néonatal
	HSV-2 (HHV-2)	~20%	Herpès génital, herpès cutané, méningite	Herpès cutanéomuqueux, atteintes viscérales	Herpès néonatal
	VZV (HHV-3)	>90%	Varicelle, zona	Varicelle maligne, zona généralisé	Varicelle néo-natale
<b>β-herpesvirinae</b>	HCMV (HHV-5)	~50%	Fièvre, syndrome mononucléosique, hépatite	Pneumopathie, rétinite, encéphalite, colite	infection congénitale symptomatique
	<b>HHV-6A</b>	?	syndrome mononucléosique?	Encéphalite, hépatite	?
	<b>HHV-6B</b>	>90%	syndrome mononucléosique?	Encéphalite, hépatite	Roséole infantile ( <i>exanthem subitum</i> )
	HHV-7	>90%	?	?	?
<b>γ-herpesvirinae</b>	EBV (HHV-4)	>90%	Mononucléose infectieuse, hépatite	syndrome lymphoprolifératif	?
	KSV (HHV-8)	<5%	syndrome mononucléosique	maladie de Kaposi, lymphome des séreuses, maladie de Castelman	?

En 1988, HHV-6 a été identifié par Yamanishi *et al.* comme l'agent infectieux responsable de cette maladie (Yamanishi et al., 1988). Des PBMC de patients souffrant de roséole ont été prélevées pendant la phase fébrile et cultivées pendant plusieurs jours jusqu'à l'apparition d'effets cytopathiques. Des observations en microscopie électronique ont confirmé la présence de particules virales typiques d'herpèsvirus, et les analyses sérologiques ont indiqué une réactivité antigénique contre HHV-6B (souche Z29). En 1993, une étude menée sur de jeunes enfants aux Etats-Unis a montré que le virus HHV-6B, et non HHV-6A, était responsable de la majorité des infections primaires symptomatiques (Dewhurst et al., 1993). L'infection primaire par HHV-6B se déroule généralement chez les enfants avant l'âge de deux ans (Ward, 2005). Cependant, il peut arriver qu'elle soit plus tardive, et peut dans ce cas causer des maladies de type mononucléose (Akashi et al., 1993) (tableau 1).

L'âge de primo-infection par HHV-6A n'a pas été déterminé avec précision. Pour cause, l'infection primaire par ce virus est le plus souvent asymptomatique. Quelques cas d'infection par HHV-6A ont cependant été rapportés et décrivent des signes cliniques similaires à ceux causés par HHV-6B (Hidaka et al., 1997).

### **3. Persistance virale chez l'adulte**

Après l'infection primaire, le virus est disséminé dans l'organisme et semble pouvoir persister dans différents organes (figure 7). Bien qu'HHV-6A et HHV-6B n'aient pu être isolé qu'à partir de cellules sanguines, en particulier à partir des lymphocytes CD4<sup>+</sup> (Takahashi et al., 1989), les tissus dans lesquels il est possible de détecter la présence d'ADN *in vivo* sont plus variés. En effet, l'ADN viral peut être détecté dans le sang, principalement dans les monocytes, les macrophages (Kondo et al., 1991) et les lymphocytes, mais aussi dans les ganglions lymphatiques, les reins (Kurata et al., 1990), le foie (Härmä et al., 2003), les poumons (Cone et al., 1996), la thyroïde (Caselli et al., 2012) ou encore le cerveau (détaillé dans la partie 2.C.1.). Comme les autres herpèsvirus, HHV-6A et HHV-6B établissent une persistance à long terme dans leurs hôtes. Dans le cas d'HHV-6B, il est probable que deux types de persistance virale aient lieu au sein d'un même individu. Tout d'abord, les monocytes/macrophages sont un site potentiel de latence moléculaire vraie, avec une persistance de l'ADN viral sans réplication et sans expression des gènes viraux, excepté certains gènes de latence (Kondo et al., 1991). D'autre part, HHV-6B semble établir une infection répliquative chronique dans les glandes salivaires. Il est fréquemment retrouvé dans la salive (Aberle et al., 1996), et cette sécrétion constituerait une voie de transmission horizontale du virus (Clark, 2000). Dans le cas d'HHV-6A, les mécanismes de persistance



**Figure 7. Infection par HHV-6A et HHV-6B, principaux sites d'infection et maladies associées.** Le virus HHV-6B est transmis par contacts rapprochés (salive). Suite à la primo infection, HHV-6A (rouge) et HHV-6B (bleu) sont disséminés dans différents organes. Lors de complications de l'infection primaire, ou de réactivation virale, différents symptômes et maladies peuvent être développés, selon le site d'infection (flèches violettes).

virale sont moins clairs. HHV-6A est très rarement retrouvé dans la salive (Aberle et al., 1996), et son mode de transmission n'a pas encore été élucidé.

## **B. Association à des maladies neurologiques**

Contrairement à HHV-6B, HHV-6A n'a jamais été clairement identifié comme l'agent étiologique d'une maladie particulière. Il fait pourtant régulièrement l'objet d'études épidémiologiques qui cherchent à corrélérer certains paramètres virologiques avec des pathologies dont l'origine est inconnue. Sa présence, ou sa réactivation ont ainsi souvent été associées au développement ou à l'exacerbation de différentes maladies, et en particulier à des maladies qui affectent le système nerveux central (SNC). De même, HHV-6B semble lui aussi impliqué dans certaines maladies neurologiques, que ce soit lors d'infections primaires, ou lors de réactivation chez l'adulte.

### **1. Complications lors de l'infection primaire**

Bien que la roséole soit une maladie généralement bénigne, elle peut parfois entraîner des complications neurologiques sévères. Plusieurs cas d'encéphalites, d'ataxie et de convulsions (Asano et al., 1994; Barone et al., 1995; Hall et al., 1994) qui peuvent parfois mener à des syndromes épileptiques (Asano et al., 1992; Yanagihara et al., 1995) ont été rapportés, et montrent que l'infection par HHV-6B peut mener à des symptômes neurologiques importants. Les formes les plus sévères d'encéphalites faisant suite à une roséole peuvent avoir des conséquences létales (Asano et al., 1992; Matsumoto et al., 2011; Yoshikawa et al., 2009).

### **2. Réactivation chez les patients immunodéprimés**

Comme pour la plupart des herpèsvirus présents chez l'homme sous forme latente, HHV-6 est capable de se réactiver. En effet, en conditions d'immunosuppression, chez des patients sous chimiothérapie, ou chez des patients infectés par le VIH et présentant un syndrome d'immunodéficience acquise, les virus HHV-6A et B sont susceptibles d'être réactivés et parfois de causer différentes maladies. En général, la réactivation virale est déterminée essentiellement grâce à la quantification par PCR en temps réel (qPCR) de l'ADN viral dans le sang, dont l'augmentation au cours du temps est le témoin d'une infection herpétique active (Agut, 2011b). Pour HHV-6, la fréquence de réactivation est particulièrement élevée chez les receveurs de cellules souches hématopoïétiques, et peut

atteindre 50% (Ogata, 2009; Yoshikawa et al., 2002; Zerr, 2006). Dans certains cas, cette réactivation a été associée à des atteintes neurologiques, telles que des encéphalites, des méningites, ou des convulsions. Cette association est le plus souvent étayée par la présence d'ADN viral dans le liquide céphalo-rachidien, et dans quelques cas, par la détection de protéines virales dans les zones affectées du cerveau par analyse histologique après autopsie (Drobyski et al., 1994; Forest et al., 2011; Fotheringham et al., 2007). De plus, certaines études épidémiologiques ont indiqué une corrélation entre la réaction d'HHV-6 et le risque de développer des complications neurologiques (Ogata et al., 2006; Zerr et al., 2001).

### **3. Réactivation dans la population « immunocompétente » ?**

#### **a. Encéphalites**

La nature ubiquitaire d'HHV-6 rend difficile l'établissement d'un lien direct entre sa réactivation et certaines maladies neurologiques chez l'adulte. Des études épidémiologiques sur des patients souffrant d'encéphalites de cause inconnue ont suggéré que HHV-6 pourrait être impliqué dans une partie des cas (McCullers 1995, Yao 2009, Tavakoli 2007). En se basant sur la présence d'ADN viral dans le LCR et le sérum, quelques cas d'encéphalites et de méningites ont ainsi été associés à la réactivation d'HHV-6 et ont parfois pu être traités à l'aide de médicaments antiviraux (Patnaik 1995, Birnbaum 2005, Isaacson 2005).

#### **b. Association avec la sclérose en plaques**

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune démyélinisante. Dans les pays développés, elle est la maladie neurologique la plus fréquente chez les jeunes adultes et la première cause de handicap non traumatique. Bien que plusieurs facteurs génétiques et environnementaux aient été proposés, la cause exacte de cette maladie n'a pas encore été complètement élucidée.

HHV-6 a souvent été cité comme l'un des agents étiologiques potentiels de la SEP. De nombreuses études ont décrit une corrélation entre l'infection par HHV-6 et cette maladie, grâce à l'analyse de différents paramètres viraux. Les niveaux d'ADN viral dans le sérum, caractéristiques d'une infection active, et potentiellement d'une réactivation virale, sont significativement augmentés chez les patients SEP, en comparaison avec les donneurs sains ou les patients souffrant d'autres maladies neurologiques (Chapenko et al., 2003; Garcia-Montojo et al., 2011; Soldan et al., 1997; Wilborn et al., 1994). L'ADN viral est également détecté plus fréquemment dans le LCR et dans les PBMC de patients SEP (Ablashi et al., 1998; Chapenko et al., 2003; Wilborn et al., 1994).

Il semble de plus que les réponses immunitaires développées contre HHV-6 soient augmentées chez les patients SEP : la réponse lymphoproliférative contre HHV-6 est accrue, et les niveaux d'IgG et d'IgM spécifiques dans le sérum et dans le LCR sont plus élevés (Ablashi et al., 1998; Friedman et al., 1999; Soldan et al., 1997), bien que ce dernier phénomène semble ne pas être spécifique à HHV-6. En effet certains groupes ont montré des augmentations similaires avec le virus d'Epstein-Barr et le virus varicelle-zona.

Par analyse histologique sur des biopsies de cerveau, ou sur tissus prélevés post-mortem, la présence d'ADN viral est plus fréquente dans le cerveau des patients SEP que chez les contrôles, et également plus fréquente dans les zones lésées que dans les régions saines d'un même cerveau. Contrairement à ce qui est décrit pour les patients sains, chez les patients SEP, des protéines virales sont détectées dans les oligodendrocytes et les astrocytes (Challoner et al., 1995; Goodman et al., 2003; Opsahl and Kennedy, 2005; Sanders et al., 1996).

Il existe en outre une corrélation entre la réactivation virale et les poussées de SEP, au cours desquelles les patients souffrent de symptômes cliniques exacerbés. Plusieurs études ont montré que la détection d'ADN viral était plus fréquente, et les quantités d'IgG spécifiques dans le sérum augmentées chez les patients au moment des poussées (Alvarez-Lafuente et al., 2004; Berti et al., 2002; Chapenko et al., 2003; Simpson et al., 2012).

Une corrélation a par ailleurs été établie entre l'infection par HHV-6, la SEP et CD46, récepteur cellulaire du virus. La quantité de CD46 soluble dans le plasma et le LCR est augmentée chez les patients SEP (Soldan et al., 2001) et une étude a montré qu'il est possible de co-purifier de l'ADN d'HHV-6 avec CD46 à partir du serum de ces patients (Fogdell-Hahn et al., 2005). De plus, la signalisation via CD46 semble altérée chez les patients SEP : comme il a été mentionné précédemment, la costimulation de CD46 et CD3 sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> induit la sécrétion d'IL-10 et un profil régulateur de type Tr1. Cette stimulation est inhibée chez les lymphocytes de patients SEP (Astier et al., 2006). Au contraire, la costimulation CD3/CD46 de lymphocytes T de ces patients semble favoriser la sécrétion d'IL-17 et donc un profil de type Th17, fortement pro-inflammatoire (Yao et al., 2010a). Il est ainsi possible que l'infection par HHV-6 ait un impact sur la signalisation induite par son récepteur CD46, par exemple en induisant son clivage et la sécrétion de CD46 soluble, ce qui pourrait avoir des conséquences inflammatoires importantes et participerait à la progression de la SEP.

La distinction entre HHV-6A et HHV-6B ayant été adoptée tardivement, le variant du virus n'a pas été évoqué dans bon nombre des études citées. Néanmoins quelques-unes mentionnent qu'HHV-6A serait trouvé plus fréquemment qu'HHV-6B dans le sérum des

patients SEP (Akhyani et al., 2000), particulièrement pendant les périodes d'exacerbation de la maladie (Alvarez-Lafuente et al., 2004).

L'existence d'un lien entre HHV-6 et SEP a été beaucoup discutée, et reste à ce jour controversée. Certaines études ont fourni des résultats contradictoires, et mettent parfois en cause certains problèmes méthodologiques et techniques. Toutefois, la corrélation entre la SEP et certains paramètres liés à l'infection par HHV-6 reste frappante, même si elle n'apporte pas de preuve concrète d'un rôle pour HHV-6 dans le déclenchement de la maladie.

Ainsi, de nombreuses données épidémiologiques suggèrent une forte association entre les virus HHV-6A et HHV-6B et le développement de maladies neuroinflammatoires. Cependant les mécanismes permettant à ces virus de déclencher ou de participer au développement de telles maladies sont encore peu connus. Un premier élément permettant d'expliquer ce lien est leur capacité à infecter le système nerveux central.

## C. Deux virus neurotropes

### 1. Présence d'HHV-6A et HHV-6B dans le cerveau

Suite à l'infection primaire, le cerveau a été identifié comme l'un des sites de persistance pour HHV-6A et HHV-6B *in vivo*. En effet, plusieurs études indiquent une présence d'ADN viral dans différentes régions du cerveau d'adultes sains (Challoner et al., 1995; Chan et al., 1999, 2001; Chi et al., 2012a; Cuomo et al., 2001; Luppi et al., 1994, 1995) dans 30 à 85% des cerveaux analysés. Ceci suggère que le virus peut atteindre le système nerveux central après l'infection primaire, sans conséquences pathologiques immédiates. Plusieurs sites d'infection au sein du système nerveux central ont été décrits, tels que le cortex frontal, les noyaux de la base, et les zones périventriculaires (Luppi et al., 1995), mais en général, l'infection ne semble pas avoir de spécificité de localisation particulière au sein du SNC (Chan et al., 2001). Dans quelques cas, des transcrits viraux ont aussi pu être détectés par hybridation *in situ* et RT-PCR, indiquant que l'infection dans le cerveau peut être associée à la transcription de gènes viraux (Opsahl and Kennedy, 2005). Toutefois, il semble que le virus soit majoritairement présent sous forme latente, étant donné que les antigènes viraux ne semblent pas exprimés dans le cerveau des individus sains (Challoner et al., 1995; Cuomo et al., 2001).

La présence dans le SNC humain a été montrée aussi bien pour HHV-6A, que pour HHV-6B. De plus, il semble que les deux virus ont une capacité neuro-invasive similaire. En effet

HHV-6B, dont la prévalence dans la population adulte est la plus élevée, est également retrouvé dans le cerveau plus fréquemment que le virus A (Challoner et al., 1995; Chan et al., 1999, 2001). Cependant, L'analyse du LCR d'enfants pendant une infection primaire indique que lorsque l'ADN d'HHV-6A est présent dans le SNC, il est très rarement détectable en périphérie, ce qui n'est pas le cas pour HHV-6B (Hall et al., 1998). L'infection par HHV-6A serait donc plus souvent restreinte au cerveau. Dans quelques cas, les deux virus peuvent coexister dans le cerveau d'un même individu, et sont alors détectés dans des régions distinctes (Chan et al., 2001; Hall et al., 1998).

La voie d'entrée d'HHV-6 dans le SNC n'a pas été clairement identifiée. Il est probable que les deux virus se propagent jusqu'au cerveau directement lors de l'infection primaire (Caserta et al., 1994), grâce à des mécanismes encore non élucidés. Selon une étude récente, HHV-6A serait capable d'infecter des cellules gliales spécialisées, situées dans la cavité nasale, et pourrait ainsi atteindre le cerveau en passant par le bulbe olfactif (Harberts et al., 2011).

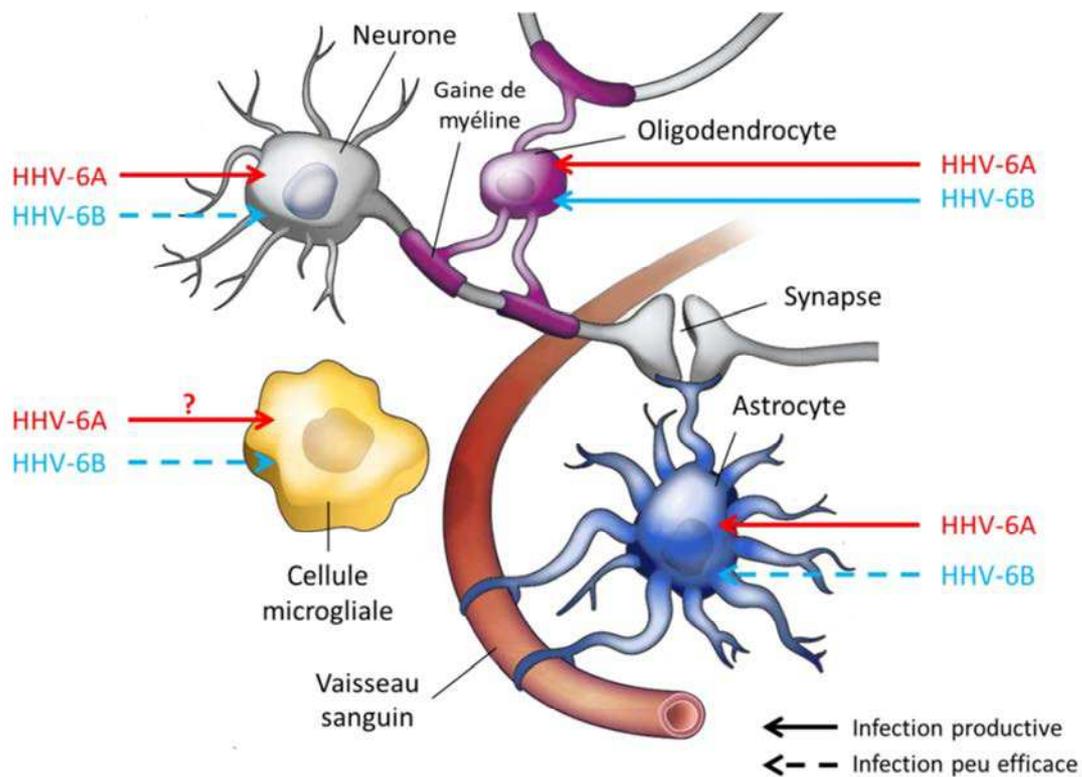
## 2. Types de cellules neurales infectées

### 1. Infection des cellules gliales

Deux types cellulaires principaux sont présents dans le système nerveux central : Les neurones, et les cellules gliales. Les neurones sont les cellules les plus représentées dans le SNC. Elles sont excitables et assurent la transmission des signaux nerveux. Les cellules gliales assurent quant à elles des fonctions de maintien, de nutrition, en apportant nutriments et oxygène aux neurones, mais aussi des fonctions immunitaires. Trois types de cellules gliales sont présents dans le SNC : Les astrocytes, les oligodendrocytes, et les cellules microgliales. Plusieurs études décrivent l'infection par HHV-6A et HHV-6B chez ces différents types de cellules gliales *in vivo* et *in vitro*.

#### ***Oligodendrocytes***

D'après plusieurs analyses histologiques HHV-6 semble infecter les oligodendrocytes *in vivo* (Challoner et al., 1995; Opsahl and Kennedy, 2005). En particulier, l'expression d'ARNm et la production de protéines virales, typiques d'une infection répliquative, ont pu être détectés dans ces cellules. *In vitro*, HHV-6A et HHV-6B peuvent tous deux induire la formation de syncytia et l'arrêt du cycle cellulaire dans des lignées cellulaires oligodendrogiales (Ahlqvist et al., 2005; De Bolle et al., 2005b; Gardell et al., 2006), ainsi que dans des oligodendrocytes primaires (Albright 1998) et dans des précurseurs d'oligodendrocytes (Dietrich et al., 2004).



**Figure 8. Les cellules gliales du système nerveux central et leur susceptibilité à l'infection par HHV-6** (adapté d'après (Allen and Barres, 2009)). Les oligodendrocytes produisent les principaux constituants de la myéline, et leur membrane plasmique forme la gaine en s'enroulant autour des axones des neurones. Ils peuvent être infectés par HHV-6A et HHV-6B de façon productive. Les neurones et les astrocytes, qui assurent le maintien de la BHE, et participent au recyclage des neurotransmetteurs libérés dans les synapses, sont susceptibles à l'infection par HHV-6A et, avec une efficacité moindre par HHV-6B. Les cellules microgliales sont susceptibles à l'infection par HHV-6B, mais leur infection par HHV-6A n'a pas été étudiée.

La fonction principale des oligodendrocytes est d'isoler les neurones du milieu environnant. Leur rôle est essentiel puisqu'ils produisent les constituants protéiques majeurs de la myéline. Leur membrane plasmique s'enroule autour des axones des neurones et forme la gaine de myéline qui permet la propagation efficace des signaux nerveux (figure 8). Ces cellules ont donc une place primordiale dans la pathogénèse de maladies neurodégénératives comme la SEP (Fancy et al., 2011). Ainsi, l'infection lytique de ces cellules par HHV-6, de même que l'inhibition de leur renouvellement via l'arrêt du cycle cellulaire des progéniteurs oligodendrogliaux, peut induire une démyélinisation ou empêcher la remyélinisation, et avoir un impact sévère sur la conduction des signaux nerveux.

### ***Astrocytes***

Les astrocytes sont importants dans le support physique des neurones, mais remplissent également de nombreuses autres fonctions. Ils assurent notamment le recyclage de neurotransmetteurs après leur sécrétion par les neurones au niveau des synapses et produisent de nombreux facteurs neurotrophiques et neuroprotecteurs. Ils participent au maintien de la barrière hémato-encéphalique (BHE) (figure 8), au guidage axonal et à la cicatrisation en cas de lésions (Minagar et al., 2002). Les astrocytes ont de plus la capacité de sécréter diverses cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (Benveniste, 1992; Dong and Benveniste, 2001), et en cas d'infection, peuvent avoir une fonction de présentation de l'antigène (Constantinescu et al., 2005; Fontana et al., 1984).

Des antigènes viraux ont été détectés dans des astrocytes au sein du cerveau de patients atteints d'épilepsie du lobe temporal (Donati et al., 2003). *In vitro*, l'inoculation de virus A induit une infection productive dans des astrocytes fœtaux primaires (Donati et al., 2005; De Filippis et al., 2006; He et al., 1996), et induit l'apoptose à la fois dans des astrocytes primaires et des lignées d'astrogliome (Gardell et al., 2006; Gu et al., 2011). Au contraire, l'infection des astrocytes par HHV-6B semble être moins efficace. Elle conduit à une diminution de la quantité d'ADN viral et à peu de changements morphologiques (De Bolle et al., 2005b; De Filippis et al., 2006).

### ***Cellules microgliales***

Les cellules microgliales sont les seules cellules du SNC issues de la lignée hématopoïétique. Ces cellules partagent de nombreuses caractéristiques avec les macrophages. En conditions normales, les cellules microgliales sont dites quiescentes. En cas d'infection, elles sont capables de détecter la présence de pathogènes et deviennent

activées. Elles sécrètent alors de nombreuses cytokines et assurent des fonctions de phagocytose et de présentation d'antigène (Olson and Miller, 2004).

Peu de données concernant l'infection de ces cellules par HHV-6 sont disponibles. Une étude sur des cultures primaires suggère néanmoins qu'HHV-6B pourrait infecter ce type cellulaire (Albright et al., 1998), les résultats restant à confirmer.

## **2. Infection des neurones**

Des neurones infectés par HHV-6 ont été détectés grâce à des analyses en immunofluorescence chez des patients décédés des suites d'encéphalites (Drobyski et al., 1994). *In vitro*, quelques études suggèrent que HHV-6A se réplique dans des lignées de neuroblastomes, en induisant des effets cytopathiques et l'apoptose. HHV-6B, en revanche, ne semble pas capable d'infecter les lignées neuronales (De Bolle et al., 2005b; Gardell et al., 2006).

HHV-6A et HHV-6B sont donc tous deux capables d'infecter le système nerveux central. L'infection des astrocytes et des neurones par HHV-6A semble plus efficace que par HHV-6B. Il est donc possible que les deux espèces d'HHV-6 aient un tropisme distinct au sein du SNC, ce qui pourrait conduire à des pathologies différentes. L'infection des différents types de cellules du SNC peut de plus causer des perturbations dans leurs activités, voire affecter leur renouvellement et induire leur apoptose, ce qui pourrait expliquer l'implication d'HHV-6A et HHV-6B dans certaines maladies neurologiques.

Les deux virus pourraient par ailleurs jouer un rôle dans ces maladies en participant à l'établissement de l'inflammation observée au sein du SNC lors d'encéphalites ou dans la sclérose en plaques, grâce à leur capacité à induire et à moduler les réponses immunitaires.

## 3<sup>ème</sup> Partie : HHV-6 et système immunitaire

### A. La réponse immunitaire à l'infection virale

#### 1. Réponse immunitaire innée

La réponse immunitaire innée constitue la première ligne de défense de l'organisme contre l'infection virale. Elle est caractérisée notamment par sa rapidité et sa spécificité limitée. Cette rapidité d'action est permise par la présence au sein des tissus et dans la circulation de différents acteurs cellulaires et humoraux (Janeway, 2001).

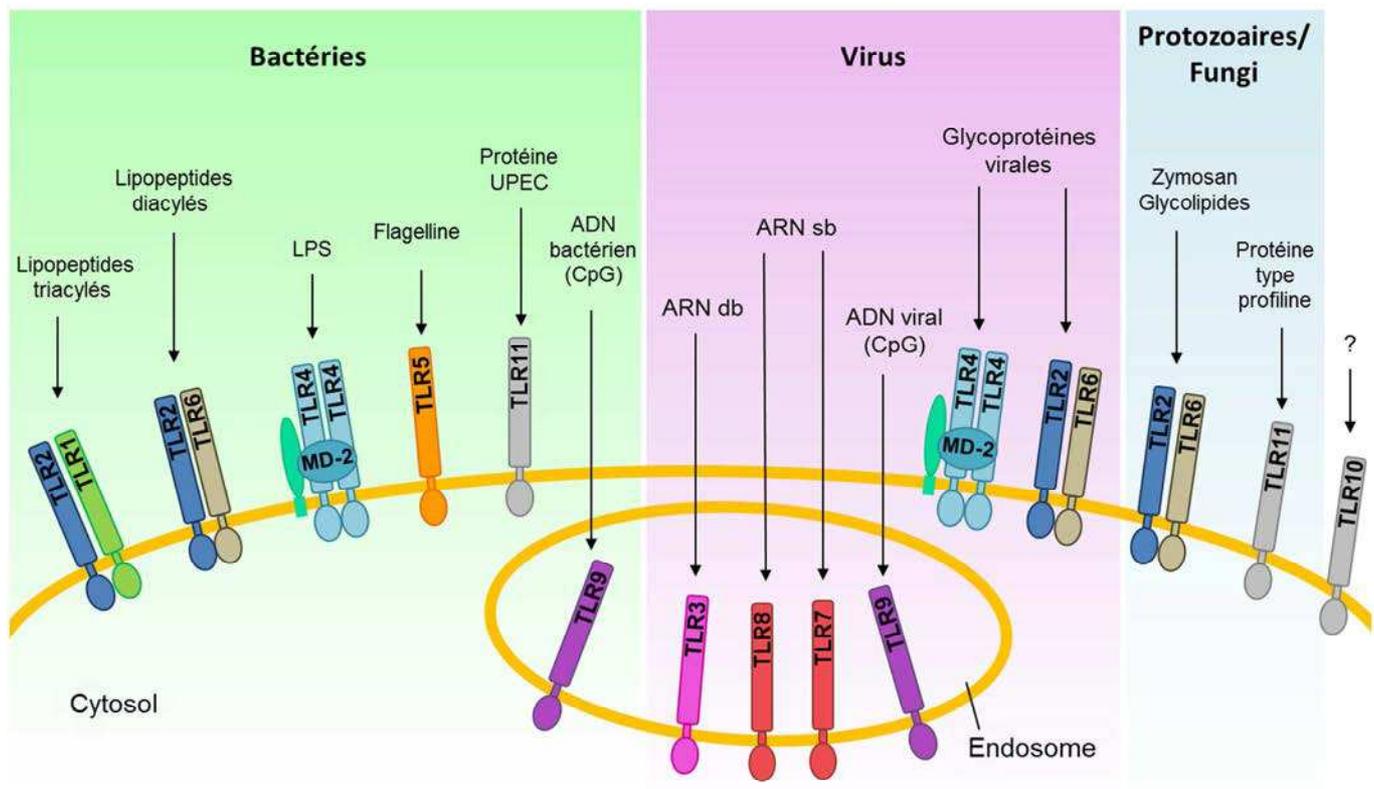
La réponse innée humorale aux infections virales est assurée essentiellement par le système du complément. Ce système est composé d'une multitude de facteurs solubles circulants capables de détecter la présence de pathogènes et d'induire la lyse de cellules infectées via différentes cascades d'activation.

La réponse innée repose également sur un réseau de cellules immunitaires aux fonctions diverses, telles que les macrophages, les cellules dendritiques (DC) et les cellules NK. Ces cellules, ainsi que certaines cellules résidentes des tissus, sont impliquées dans la reconnaissance des pathogènes grâce à une panoplie de récepteurs appelés PRR (pattern recognition receptors). Ces récepteurs sont capables de détecter des signaux de danger, qu'ils soient exogènes (e.g. micro-organisme pathogène) ou endogènes (e.g. cellule infectée ou nécrotique), en se liant à certains motifs moléculaires associés à des pathogènes (MAMP, pour microbe-associated molecular pattern). Ces structures particulières, en général communes à plusieurs pathogènes d'un même type et absentes des hôtes, permettent ainsi la reconnaissance du type de pathogène présent (virus, bactérie, parasite...), sans pour autant être spécifique d'un micro-organisme particulier. Plusieurs récepteurs reconnaissent ainsi des structures particulières aux virus et peuvent alors initier une réponse immunitaire antivirale qui dépend du type de récepteur engagé, et de la cellule qui l'exprime.

##### **a. Les récepteurs de type Toll (TLR)**

Les PRR sont variés et peuvent être solubles ou membranaires, et exprimés de façon intracellulaire ou extracellulaire. Parmi les récepteurs membranaires, la famille des récepteurs de type Toll (TLR) joue un rôle important dans la réponse antivirale (Arpaia and Barton, 2011) (figure 10).

La détection des virus par le système inné est basée essentiellement sur la reconnaissance des acides nucléiques viraux qui présentent des particularités structurales par rapport aux acides nucléiques de l'hôte. Plusieurs TLR peuvent détecter les génomes ou les transcrits viraux : TLR3 se lie à l'ARN double brin, les TLR7 et 8 se lient à l'ARN simple brin



**Figure 9. Ligands et localisation des TLR impliqués dans la reconnaissance des différents types de pathogènes.** La plupart des TLR sont exprimés à la surface cellulaire et sont ancrés dans la membrane plasmique. Seuls les TLR3, 7, 8 et 9 sont au contraire localisés dans l'endosome. TLR2 forme des hétérodimères avec TLR1 ou TLR6, capable de reconnaître une large gamme de MAMP, dont des lipopeptides bactériens, le zymosan (glucane présent à la surface des levures). En particulier, l'association avec TLR1 ou TLR6 permet la distinction entre les lipopeptides diacylés ou triacylés. TLR5 et TLR11 reconnaissent des ligands protéiques, notamment la flagelline, une protéine de type profiline (du parasite *Toxoplasma gondii*), mais aussi un composant encore inconnu de bactéries uropathogéniques (UPEC). TLR9, 3, 7, 8, 4, et le complexe TLR2/6 sont impliqués dans la reconnaissance des virus. TLR9 détecte l'ADN double brin à motifs CpG non méthylé, TLR7 et 8 reconnaissent l'ARN simple brin, et TLR3 l'ARN double brin. TLR4 et TLR2 sont quant à eux capables de reconnaître des protéines virales, telles que la protéine F du RSV, mais aussi probablement des composants encore non identifiés de plusieurs herpèsvirus (HSV, HCMV, EBV).

et TLR9 se lie à l'ADN double brin riche en CpG non méthylés, présent notamment chez les herpèsvirus. De plus, la reconnaissance virale par ces TLR a souvent lieu au sein de compartiments cellulaires définis, afin de faciliter la distinction avec les acides nucléiques du soi. La quasi-totalité des TLR impliqués dans la reconnaissance virale sont ainsi localisés dans la membrane des endosomes (figure 9). Dans certains cas, des protéines virales, par exemple l'hémagglutinine du virus de la rougeole (Bieback et al., 2002), peuvent également être reconnues par les TLR4 et 2. Ces derniers sont quant à eux exprimés à la surface cellulaire (Arpaia and Barton, 2011).

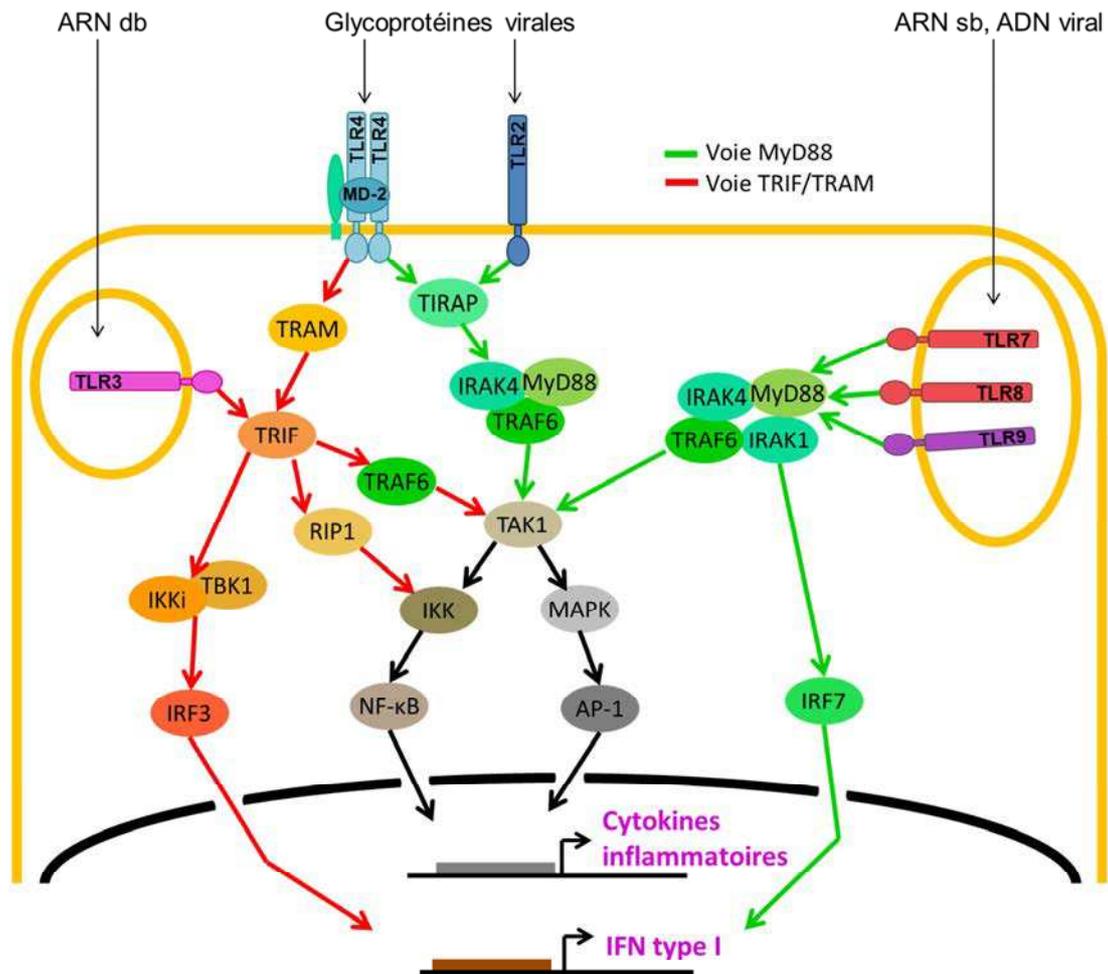
Les TLR sont des protéines transmembranaires dont la structure consiste en 3 domaines principaux : un domaine extracellulaire caractérisé par des régions riches en leucine (LRR) et impliqué dans la liaison aux ligands, un domaine transmembranaire d'ancrage dans la membrane lipidique, et un domaine intracellulaire de signalisation. La partie cytosolique présente une forte homologie avec celle du récepteur à l'IL-1 et contient un domaine conservé appelé TIR (pour Toll/IL-1R), impliqué dans les interactions avec les adaptateurs moléculaires qui permettent la signalisation intracellulaire.

Afin de transmettre des signaux intracellulaires, tous les TLR, excepté TLR3, recrutent la protéine adaptatrice MyD88 (myéloïd differentiation primary-response protein 88) (Thompson et al., 2011). Cette protéine initie l'activation de plusieurs cascades de signalisation qui aboutissent à la translocation dans le noyau de plusieurs facteurs de transcription, capables d'induire l'expression de gènes cibles. La voie MyD88 conduit à la fois à l'activation des facteurs NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B) et AP-1 (activator protein 1) qui induisent l'expression de cytokines pro-inflammatoires, et à l'activation du facteur IRF7 (IFN regulatory factor 7) qui induit l'expression d'IFN de type I.

Les TLR3 et 4 emploient une seconde voie de signalisation. Cette voie passe par le recrutement d'autres protéines adaptatrices, les protéines TRIF et TRAM, et peut de même induire l'expression de cytokines pro-inflammatoires via l'activation de NF- $\kappa$ B et AP-1. La voie TRIF/TRAM induit également l'expression d'IFN de type 1 via le facteur IRF3.

L'engagement des différents TLR conduit *in fine* à l'activation des réponses immunitaires en induisant la maturation des DC, ainsi qu'en activant les autres cellules du système immunitaire grâce à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  ou l'IL-6. En particulier, l'IFN de type 1 joue un rôle prépondérant dans la réponse antivirale. La reconnaissance des pathogènes par les TLR mène également à l'expression de certaines chimiokines qui participent au recrutement des leucocytes au site d'infection (cf. ci-après).

Dans la partie qui suit, nous nous intéresserons plus particulièrement à deux représentants de cette famille de récepteurs : TLR9 et TLR4.



**Figure 10. Principales voies de signalisation induites par les TLR impliqués dans la reconnaissance virale** (adapté d'après (Kawai and Akira, 2007)). A l'exception de TLR3, tous les TLR recrutent la protéine adaptatrice MyD88. Dans le cas de TLR2 et 4 la protéine TIRAP (TIR domain-containing adaptor protein) est utilisée pour faire le lien entre les récepteurs et MyD88. MyD88 s'associe avec IRAK1 (Il-1R-associated kinase 1) et IRAK-4 qui phosphoryle IRAK-1, ce qui conduit à l'activation de TRAF6 (TNF $\alpha$  receptor-associated factor 6). TRAF6 interagit notamment avec TAK1 (TGF $\beta$ -activated kinase 1), qui active le complexe IKK (inhibitor of NF- $\kappa$ B kinase), responsable de la translocation de NF- $\kappa$ B vers le noyau. TAK1 active également la voie des MAPK (mitogen-activated protein kinase), impliquée dans l'induction du facteur AP-1. La fixation des facteurs NF- $\kappa$ B et AP-1 induit alors l'expression de cytokines pro-inflammatoire. Dans les pDC, un complexe composé de MyD88, TRAF6, IRAK4, IRAK1 et IRF7 est formé. Dans ce complexe, IRF7 est directement phosphorylé par IRAK1, et peut ainsi être transporté dans le noyau et activer l'expression d'IFN I. TLR3 utilise la protéine adaptatrice TRIF (TIR domain-containing adapter-inducing IFN $\beta$ ). TRIF peut interagir directement avec TRAF6 et activer NF- $\kappa$ B, d'une manière similaire à la voie MyD88, et peut également recruter RIP1 (receptor interacting protein 1), qui active NF- $\kappa$ B en interagissant avec IKK. TRIF active également TBK1 (TANK-binding kinase 1) et IKKi ( ) qui phosphorylent IRF3 (IFN regulated factor 3) et IRF7. Les deux facteurs peuvent alors induire l'expression d'IFN $\beta$ , en coopération avec NF- $\kappa$ B et AP-1.

### ***Reconnaissance de l'ADN viral par TLR9***

Chez les Mammifères, l'ADN contient des motifs CpG dans lesquels la cytosine (C) est fréquemment méthylée. Au contraire, les génomes viraux et bactériens sont riches en motifs CpG non méthylés, qui sont reconnus par TLR9 (Hemmi et al., 2000).

TLR9 est exprimé principalement par les lymphocytes B et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) (Barber, 2011), une catégorie de DC capables de sécréter de grandes quantités d'IFN de type I, et qui joue un rôle majeur dans la réponse aux infections virales (Bao and Liu, 2013). La forme inactive de TLR9 est localisée dans le réticulum endoplasmique. Il est ensuite transporté vers le compartiment endosomal grâce à la protéine UNC93B (Kim et al., 2008), où il acquiert sa forme active (Ewald et al., 2008). Afin d'être reconnu par TLR9, l'ADN viral doit donc être internalisé, puis transporté vers les compartiments cellulaires appropriés. L'engagement de TLR9 provoque le recrutement de MyD88 et les différentes voies de signalisation décrites plus haut, et peut aboutir à l'activation des facteurs NF- $\kappa$ B et IRF7 (figure 10). Il semble que l'activation de l'un ou l'autre de ces facteurs, qui conduit à l'expression d'IFN de type 1 ou d'autres gènes pro-inflammatoires, respectivement, soit dépendante du compartiment cellulaire dans lequel est exprimé TLR9 (Sasai et al., 2010).

Il a été montré que plusieurs virus à ADN, tels que les adénovirus (Zhu et al., 2007) ou les poxvirus (Samuelsson et al., 2008) peuvent activer TLR9. Notamment, l'ADN de différents herpèsvirus, dont HSV-1, -2 ou l'EBV, peut activer la production d'IFN I via TLR9 dans les pDC (Fiola et al., 2010; Krug et al., 2004; Lund et al., 2003).

En plus des pDC et des lymphocytes B, TLR9 peut également être exprimé dans d'autres types cellulaires, comme les monocytes et les macrophages. En particulier, dans le cerveau, l'expression de TLR9 a été montrée chez la souris dans les astrocytes et les cellules microgliales (Bowman et al., 2003; El-Hage et al., 2011; McKimmie and Fazakerley, 2005). De même, il semble que TLR9 soit exprimé au niveau transcriptionnel dans la microglie et les astrocytes humains (Jack et al., 2005). Cette expression au sein du SNC suggère que TLR9 pourrait jouer un rôle important dans la neuroinflammation induite par les infections virales.

### ***Reconnaissance de protéines virales par TLR4***

Le récepteur TLR4 a initialement été caractérisé comme le récepteur au LPS (lipopolysaccharide), motif moléculaire présent à la surface des bactéries à Gram négatif (Poltorak et al., 1998). Depuis, plusieurs études ont montré qu'il peut également reconnaître certaines protéines virales. Les protéines de fusion du virus respiratoire syncytial (RSV), et la protéine d'enveloppe du rétrovirus MMTV (mammary tumor virus), par exemple, peuvent se

lier à TLR4 (Kurt-Jones et al., 2000; Rassa et al., 2002). La protéine d'enveloppe du rétrovirus endogène MSRv est également un ligand de TLR4 (voir la partie 3.D.3).

TLR4 est exprimé à la membrane plasmique, et est associé à plusieurs partenaires. La protéine MD-2 (myeloid differentiation factor 2) se lie au domaine extracellulaire de TLR4 et est indispensable à l'expression en surface de TLR4 ainsi qu'à la reconnaissance du LPS (Park et al., 2009). CD14 est considéré comme un co-récepteur du LPS. Cette protéine transmembranaire est associée à TLR4, mais n'est pas indispensable à la reconnaissance du LPS. Elle intervient toutefois quand le ligand est présent en faible quantité. La LBP (LPS binding protein) est une protéine circulante qui se lie également à la partie extracellulaire de TLR4 et qui facilite le transfert du LPS vers CD14 (Dunzendorfer et al., 2004).

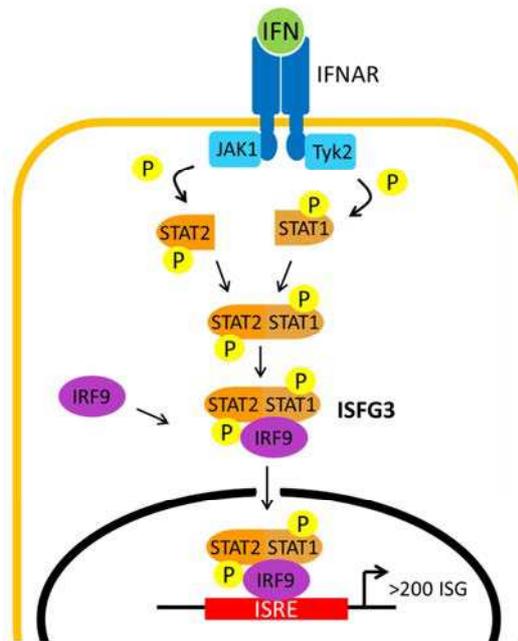
Le TLR4 est le seul TLR à pouvoir induire à la fois la voie de signalisation dépendante de MyD88 et la voie TRAM/TRIF (Thompson 2011). La voie activée classiquement est la voie MyD88, qui induit la translocation des facteurs NF- $\kappa$ B et AP-1 dans le noyau (figure 11). L'activation de la voie TRAM/TRIF quant à elle nécessite l'internalisation du récepteur dans des endosomes suite à la liaison de la protéine adaptatrice TRAM. La signalisation se poursuit alors via la protéine TRIF et active le facteur de transcription IRF3 qui peut induire l'expression de l'IFN de type 1, et ainsi déclencher une réponse antivirale.

TLR4 est fortement exprimé par la plupart des cellules du système immunitaire, mais peut également être présent sur d'autres types cellulaires, tels que les cellules endothéliales cérébrales (Nagyoszi et al., 2010) ou certaines cellules gliales du système nerveux central (Bsibsi et al., 2002).

#### **b. Les interférons de type I, cytokines antivirales majeures**

La sécrétion d'IFN de type I est primordiale dans la réponse antivirale précoce. Comme il a été décrit ci-dessus, elle peut être activée par les TLR, dont l'expression est souvent restreinte à certains types cellulaires, mais aussi par tous les autres PRR impliqués dans la reconnaissance virale, notamment les récepteurs cytosoliques de type RIG (RLR), dédiés à la reconnaissance des ARN, qui sont exprimés plus largement (Holm et al., 2013). Les IFN de types I peuvent donc être sécrétés par les pDC, qui expriment fortement les différents TLR, mais aussi par les cellules infectées. De plus, il existe une classe grandissante de récepteurs cytosoliques capables de reconnaître l'ADN viral lors de l'infection. Ces récepteurs et leur fonctionnement sont encore peu connus, mais leur signalisation via notamment les facteurs STING (stimulator of IFN gene), TBK1 et IRF3 entraîne également la sécrétion d'IFN I (Holm et al., 2013).

Les IFN I comprennent plusieurs cytokines, dont l'IFN $\alpha$  et l'IFN $\beta$ , dont l'activation est régulée par différents complexes de transactivation. L'activation de l'IFN $\beta$  est en général la



**Figure 11. Voie d'activation de la réponse interféron de type I.** Le récepteur IFNAR est composé de deux sous-unités (IFNAR-1 et-2) capables de recruter les kinases JAK1 (Janus kinase 1) et Tyk2 (tyrosine kinase 2). L'engagement de ce récepteur par l'IFN $\alpha$  ou l'IFN $\beta$  entraîne la phosphorylation, par JAK1 et Tyk2, des facteurs de transcription STAT1 et STAT2 (signal transducer and activator of transcription) qui s'associent alors avec un troisième facteur IRF9, pour former le complexe ISGF3 (IFN-stimulated gene factor 3). Ce complexe est ensuite transporté dans le noyau, où il se lie à des promoteurs appelés ISRE (IFN-stimulated response elements), et active l'expression de nombreux gènes (ISG, pour IFN stimulated genes).

plus précoce et nécessite la fixation des facteurs NF- $\kappa$ B/AP-1, et IRF3/IRF7. Au contraire l'activation de l'IFN $\alpha$  repose essentiellement sur les facteurs IRF (Levy et al., 2011).

Lorsque l'IFN $\alpha$  et l'IFN $\beta$  sont sécrétés dans le milieu extracellulaire, ils agissent de façon autocrine et paracrine pour signaler l'infection aux autres cellules du tissu. L'IFN $\alpha$  et l'IFN $\beta$  se lient à un même récepteur appelé IFNAR (IFNalpha/beta receptor), et qui est exprimé par toutes les cellules de l'organisme. La liaison des IFN de types 1 à ce récepteur mène à l'activation de ISGF3, un complexe composé de STAT1, STAT2 et IRF9, qui stimule ensuite la transcription de centaines de gènes appelés ISG (interferon stimulated genes) (figure 11). Bien que la fonction d'une grande partie de ces gènes reste à élucider, les protéines stimulées par les IFN de type I agissent globalement de façon à promouvoir un « état antiviral » dans les cellules, dans le but d'empêcher la propagation de l'infection. Elles peuvent par exemple participer à la dégradation des ARN cellulaires, inhiber certaines

fonctions de la machinerie cellulaire utilisées par les virus pour se répliquer, ou encore augmenter la sensibilité des cellules infectées à l'apoptose (Levy et al., 2011).

Le système de l'IFN de type I est d'une importance capitale pour la survie face aux multiples infections virales auxquelles l'organisme est régulièrement soumis.

### **c. Chimiokines et recrutement des cellules immunitaires**

Une autre conséquence importante de l'activation de récepteurs du système immunitaire inné est la production de petites cytokines, appelées chimiokines. Les cellules infectées sécrètent ces chimiokines et créent un gradient de concentration dans le milieu environnant. La liaison des chimiokines à leur récepteur sur les cellules immunitaires entraîne la migration de ces cellules vers la concentration la plus élevée. De cette manière, l'expression de chimiokines permet le recrutement des cellules immunitaires vers le site d'infection par chimiotactisme, d'où leur nom.

Il existe en tout quatre types de chimiokines, classées selon la distance qui sépare les deux premiers résidus cystéines au niveau de la région N-terminale (Karpus, 2001). Les chimiokines de type CC présentent deux cystéines adjacentes, alors que les chimiokines de type CXC présentent un motif où un résidu X (où X désigne un résidu quelconque) est intercalé. Deux autres catégories moins représentées ont été décrites : les chimiokines de type CX<sub>3</sub>C et XC. Ces différentes molécules sont sécrétées par les cellules immunitaires activées, mais aussi par la plupart des autres cellules au sein des tissus, notamment les cellules endothéliales qui occupent une position stratégique pour le recrutement des cellules immunitaires circulantes.

Les récepteurs de chimiokines sont des protéines à sept domaines transmembranaires couplées à des protéines G. Leur nomenclature est basée sur le type de chimiokines qu'ils reconnaissent (CCR, récepteurs de chimiokine CC ou CXCR, récepteurs de chimiokines CXCR). La plupart des cellules du système immunitaire expriment plusieurs de ces récepteurs, et sont donc sensibles à l'action de multiples chimiokines (Karpus, 2001).

### ***Chimiotactisme et infection virale dans le SNC***

En cas d'infection virale dans le SNC, le recrutement des cellules immunitaires est d'une importance capitale. Le cerveau est en effet un organe immunoprivilégié, et le passage des cellules immunes au travers de la barrière hémato-encéphalique est régulé. Selon le tropisme et les propriétés intrinsèques du virus présent, différents types de cellules résidentes du SNC sont capables de sécréter des chimiokines : les cellules microgliales et les astrocytes principalement (Aravalli et al., 2005; Christensen et al., 2009), mais aussi parfois les neurones (Klein et al., 2005).

Différentes chimiokines peuvent être produites en réponse à l'infection par un virus neurotrope. La production de CXCL10 (ou IP10), par exemple, est drastiquement augmentée lors de l'infection par différents virus, et est associée à l'infiltration des lymphocytes T activés, qui expriment le récepteur CXCR3 (Asensio and Campbell, 1997; Zhang et al., 2008). La chimiokine CCL5 (ou RANTES pour regulated upon activation normal T cell expressed and secreted) est souvent produite en réponse aux infections et est liée à la migration de lymphocytes et de macrophages (Dénes et al., 2010; Glass et al., 2005). CXCL1 (ou MIP-2 pour macrophage inflammatory protein 2) peut également être sécrétée et attire les neutrophiles qui expriment fortement son récepteur CXCR2 (Hosking et al., 2009).

En induisant le recrutement des leucocytes, l'expression de chimiokines assure donc la protection du SNC en favorisant l'élimination des pathogènes. Cependant, elle peut également avoir des conséquences néfastes en permettant l'infiltration de cellules cytotoxiques qui peuvent causer des dommages importants et irréversibles (Hosking and Lane, 2010). L'activation du système immunitaire inné lors d'infections virales dans le système nerveux central peut ainsi jouer un rôle important dans l'induction de neuropathologies.

## 2. Réponse adaptative

Contrairement à la réponse innée, la réponse adaptative est très spécifique, s'active lentement, et s'accompagne de la mise en place d'un phénomène de mémoire. Elle repose principalement sur deux types de cellules effectrices : les lymphocytes T et les lymphocytes B. Ces cellules expriment à leur surface des récepteurs (TCR pour T cell receptor et BCR pour B cell receptor, respectivement), capables de reconnaître des antigènes viraux. Pour être reconnus par le TCR, les antigènes doivent être apprêtés et présentés sous forme de peptides associés au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) par des cellules présentatrices d'antigènes (APC), principalement les cellules dendritiques (DC) et les macrophages (Janeway, 2001).

Au contact de l'antigène, les cellules T et B naïves sont activées, prolifèrent et se différencient en cellules mémoires ou en cellules effectrices, dont la fonction principale est alors d'éliminer l'infection. Les lymphocytes B se différencient en plasmocytes et sécrètent des anticorps spécifiques de l'antigène reconnu. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> activés deviennent cytotoxiques et sont capables de lyser les cellules infectées.

En ce qui concerne les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, plusieurs types de cellules effectrices ont été décrits. Les lymphocytes T « helper » (Th) participent à l'activation des lymphocytes B et des macrophages. Parmi eux, les lymphocytes de profil dit Th1, qui sécrètent de grandes

quantités d'IFN $\gamma$ , stimulent les macrophages et les lymphocytes CD8<sup>+</sup>. Les lymphocytes Th2, quant à eux, sont associés à la réponse anticorps et produisent des cytokines qui facilitent la maturation et l'activation des lymphocytes B. Découverts plus tardivement, les lymphocytes Th17 sécrètent entre autre l'IL-17, une cytokine pro-inflammatoire, et jouent un rôle prépondérant dans diverses maladies autoimmunes, telles que la sclérose en plaques ou le diabète de type 1 (Shao et al., 2012; Wang et al., 2013). Enfin, il existe des lymphocytes T suppresseurs, capables de moduler la réponse immunitaire, appelés T régulateurs (Treg) (Hall et al., 2011). Deux types principaux de lymphocytes Treg ont été décrits : les Treg « naturels », directement dérivés du thymus, qui expriment le facteur de transcription Foxp3, et les Treg « induits ». Ces derniers peuvent présenter différents profils, dont les profils Tr1 et Th3, et sont caractérisés notamment par la production de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 (pour les lymphocytes Tr1) ou le TGF $\beta$  (pour les lymphocytes Th3).

## **B. Inhibition de la réponse immunitaire par HHV-6**

Les herpèsvirus ont la capacité de persister à long terme dans le corps humain sans être éliminés par le système immunitaire. Pour cela, diverses stratégies virales ont été développées par ces virus afin d'échapper à la surveillance immunitaire. Plus particulièrement, HHV-6 est capable d'inhiber la réponse immunitaire grâce à plusieurs mécanismes.

### **1. Infection de cellules immunitaires**

HHV-6 est en général considéré comme un virus immunosuppresseur. L'infection primaire par HHV-6B est en effet souvent associée à une diminution du taux de lymphocytes dans le sang (Ward, 2005). HHV-6A et -6B se répliquent efficacement dans des cellules du système immunitaire, en particulier les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Plusieurs études ont montré que l'infection par HHV-6A et HHV-6B inhibent leur prolifération en altérant la production d'IL-2 (Flamand 1995) et en provoquant l'arrêt du cycle cellulaire (Li et al., 2011; Øster et al., 2005). Les deux virus pourraient également induire leur apoptose (Inoue et al., 1997; Yasukawa et al., 1998). HHV-6A est également capable d'infecter plusieurs types de cellules effectrices du système immunitaire, telles que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Lusso et al., 1991), les cellules NK (Lusso et al., 1993) et les lymphocytes  $\gamma/\delta$  (Lusso et al., 1995) et pourrait donc potentiellement altérer leurs fonctions.

## **2. Altération des fonctionnalités des cellules présentatrices d'antigènes**

Chez les macrophages, l'infection par HHV-6A inhibe la production d'IL-12, cytokine cruciale dans l'induction du profil Th1 (Smith et al., 2003). De la même façon, l'infection par HHV-6A et par HHV-6B inhibe la production d'IL-12 dans les cellules dendritiques et altère leur maturation (Smith et al., 2005), ainsi que leur capacité à présenter les antigènes (Niiya et al., 2006).

## **3. Impact sur les fonctions des lymphocytes T**

En se liant à CD46 à la surface des lymphocytes T, HHV-6 (A et B) pourrait induire la sécrétion d'IL-10 et le phénotype de T régulateur décrit par Kemper *et al.* (Kemper et al., 2003). Une étude menée par Wang *et al.* sur les lymphocytes T infectés par HHV-6 supporte cette hypothèse. En effet, selon cette étude, les lymphocytes T infectés par HHV-6A et B pourraient sécréter de l'IL-10 et auraient un effet immunosuppresseur sur des lymphocytes T naïfs (Wang et al., 2006).

D'autre part, la protéine U24 codée par HHV-6A est capable d'inhiber l'expression à la surface des lymphocytes T du complexe CD3/TCR (T cell receptor) (Sullivan and Coscoy, 2008). Ce complexe est essentiel pour l'activation des cellules T, et l'altération de son expression constitue une voie supplémentaire d'inhibition de la réponse immunitaire adaptative.

## **4. Inhibition de la réponse innée**

La sécrétion d'interféron de type I est déclenchée par la reconnaissance de signaux de danger par des récepteurs de l'immunité innée et constitue l'une des premières réponses cellulaires à l'infection virale. Une étude réalisée par Jaworska *et al.* montre que les cellules infectées par HHV-6B présentent une résistance particulière à l'interféron de type I (Jaworska et al., 2010). La protéine IE-1 d'HHV-6B peut se lier à la protéine STAT-2 et ainsi inhiber la signalisation via cette molécule, ce qui empêche l'expression des gènes de réponse à l'interféron. HHV-6B est ainsi capable d'inhiber une étape importante de la réponse immunitaire antivirale. Contrairement à HHV-6B, HHV-6A ne semble pas capable d'induire une telle résistance à l'interféron de type I.

## C. Stimulation de la réponse immunitaire par HHV-6

Paradoxalement, HHV-6A et -6B sont également capables de stimuler le système immunitaire. Les deux virus ont d'ailleurs été cités comme facteurs potentiels dans le développement de plusieurs maladies inflammatoires, par exemple dans certaines hépatites (Potenza et al., 2008), la polyarthrite rhumatoïde (Alvarez-Lafuente et al., 2005; Krueger et al., 1991), le lupus (Broccolo et al., 2009; Krueger et al., 1991), ou encore la thyroïdite de Hashimoto (Caselli et al., 2012). En outre, de nombreuses études *in vitro* indiquent qu'HHV-6A et HHV-6B possèdent des propriétés pro-inflammatoires.

### 1. Stimulation de la réponse immunitaire cellulaire

Au cours de l'infection chez l'homme, une réponse immunitaire humorale et cellulaire spécifique est développée contre HHV-6 (Kumagai et al., 2006; Ward, 2005).

HHV-6 semble capable d'exacerber cette réponse. Plusieurs études montrent que l'infection par HHV-6A provoque une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 $\beta$ , le TNF (tumor necrosis factor)  $\alpha$  et l'IFN $\alpha$  dans les PBMC humaines (Flamand et al., 1991; Kikuta et al., 1990). De plus HHV-6A et HHV-6B induisent l'expression de l'IL-18 et du récepteur à l'IFN $\gamma$ , tandis qu'ils inhibent la sécrétion d'IL-10 et d'IL-14 dans les cellules T (Mayne et al., 2001; Meeuwssen et al., 2005). Ainsi l'infection par HHV-6A ou HHV-6B induirait un phénotype pro-inflammatoire de type Th1 dans les lymphocytes T infectés. De plus, l'engagement de CD46 sur les lymphocytes T peut induire la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-17

Les cellules NK infectées par HHV-6A présentent également une cytotoxicité exacerbée et une sécrétion d'IL-15 augmentée (Flamand et al., 1996). De plus l'infection par HHV-6A provoque une augmentation de l'expression du TNF $\alpha$  et de l'IL-15 dans les monocytes (Arena et al., 1997, 2000).

HHV-6B peut, quant à lui, induire la sécrétion d'IFN de type III, dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes (Nordström and Eriksson, 2012). L'IFN de type III possède des propriétés antivirales similaires à l'IFN de type I et son induction peut donc également mener à l'exacerbation de la réponse immunitaire.

## 2. Implication dans le recrutement des cellules immunitaires au site d'infection

Le recrutement des cellules immunitaires régulatrices et effectrices au site de l'infection constitue un paramètre important pour l'induction de l'inflammation dans un tissu. Plusieurs études indiquent qu'HHV-6 pourrait participer à ce processus en provoquant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines par les cellules infectées.

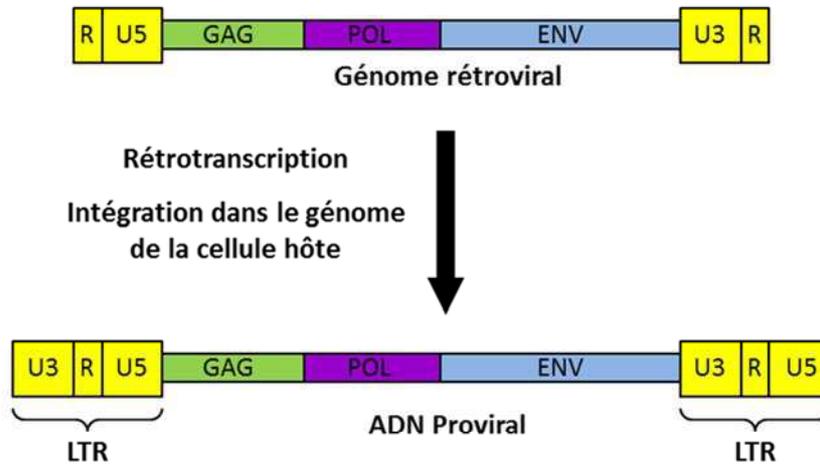
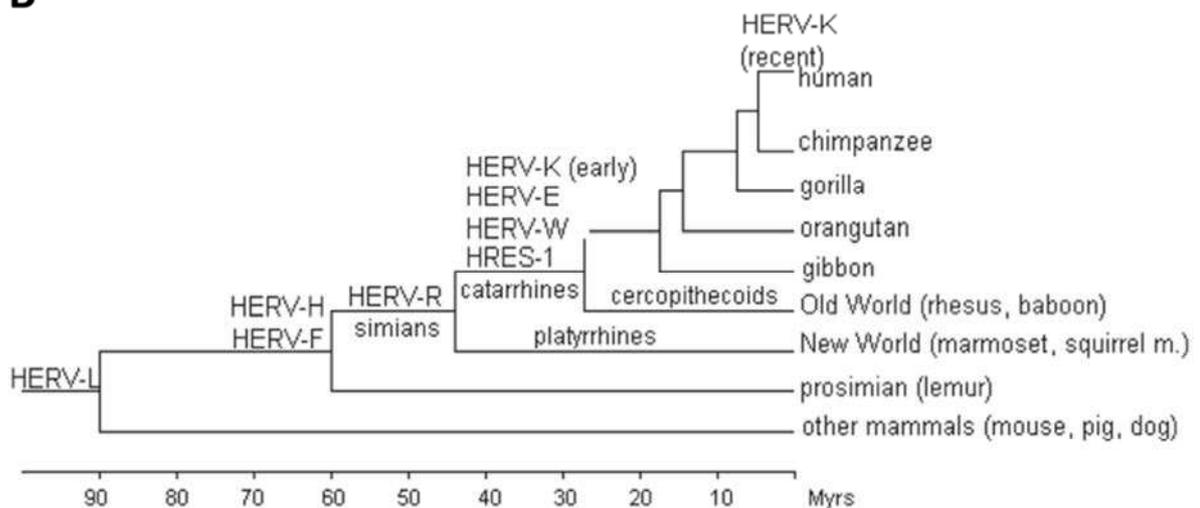
### **a. Induction de la sécrétion de chimiokines**

Grivel *et al.* ont réalisé des cultures *ex vivo* de tissu lymphoïde provenant d'amygdale humaine et ont analysé les effets de l'infection par HHV-6A et HHV-6B. Leurs résultats montrent qu'HHV-6A et HHV-6B peuvent établir une infection productive dans ces cultures, et induire une augmentation de l'expression des chimiokines CCL5 et CCL3 (Grivel *et al.*, 2001, 2003). Dans des cultures de cellules endothéliales primaires, HHV-6A induit également la production de CCL5 de CXCL8 et CCL2 (Caruso *et al.*, 2002, 2003), et l'infection de cellules hépatiques par ce virus provoque une augmentation de la sécrétion de CXCL8 (Inagi *et al.*, 1996).

Une analyse transcriptomique a été réalisée dans des astrocytes primaires humains, afin de déterminer l'impact de l'infection par HHV-6A (Meeuwsen *et al.*, 2005). Les résultats de cette étude montrent qu'HHV-6A augmente la production de cytokines pro-inflammatoires, dont plusieurs chimiokines, lors d'une stimulation TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IFN $\gamma$ . Ceci suggère que la présence d'HHV-6A dans le SNC humain pourrait exacerber une inflammation déclenchée par d'autres facteurs.

### **b. Expression d'une « virokinine »**

Les génomes d'HHV-6A et HHV-6B codent pour une protéine de type chimiokine, la protéine pU83 (Dominguez *et al.*, 1999; Gompels *et al.*, 1995). Le gène U83 du virus B code pour une chimiokine fonctionnellement active, qui se lie spécifiquement au récepteur CCR2 (Lüttichau *et al.*, 2003; Zou *et al.*, 1999), exprimé par les monocytes et les macrophages. Le gène U83 du virus A code quant à lui pour une protéine homologue qui est aussi une chimiokine, mais qui est capable de se lier à plusieurs types de récepteurs de chimiokine, dont CCR1, 4, 5 et 8 (Dewin *et al.*, 2006), exprimés par différents leucocytes. L'expression de la protéine virale pU83 dans les tissus infectés par HHV-6A ou HHV-6B est donc susceptible de provoquer le recrutement de divers types de cellules immunitaires par chimiotactisme. Le gène U83 est l'un des six gènes spécifiques à HHV-6A et HHV-6B, et n'a donc d'homologue chez aucun autre herpesvirus. Ce mécanisme de stimulation de l'inflammation pourrait donc représenter une particularité d'HHV-6.

**A****B**

**Figure 12. Intégration de génomes rétroviraux dans le génome humain. A.** Structure du génome rétroviral intégré (adaptée de Balada *et al.*, 2010). En plus des séquences codantes gag, pol et env, le génome rétroviral contient des extrémités 5' et 3' spécifiques (U5 et U3, respectivement), et des régions répétées (R). L'ADN proviral intégré dans le génome humain contient des extrémités modifiées LTR (long terminal repeats) formées au cours de la synthèse de l'ADN, et qui comprennent la séquence R encadrée de U3 et U5. **B.** Evénements d'intégration de différents HERV dans la ligné germinale (tiré de (Christensen, 2005)). Myrs : Millions d'années.

## D. Interaction avec les rétrovirus endogènes humains

### 1. Les rétrovirus endogènes humains

Les rétrovirus, dont le plus célèbre représentant est le virus de l'immunodéficience acquise humaine (VIH), possèdent un génome ARN qui, pendant le cycle répliatif viral, est rétro-transcrit, puis intégré sous forme d'ADN proviral dans le génome cellulaire grâce à une enzyme spécialisée appelée intégrase. Au cours de l'évolution, des événements d'insertion de génomes rétroviraux dans des cellules de la lignée germinale se sont produits chez de nombreuses espèces (figure 12). Ces séquences virales ont ainsi été transmises de génération en génération selon les lois mendéliennes, et font maintenant partie intégrante du génome humain. On considère aujourd'hui que ces rétrovirus endogènes (HERV, pour human endogenous retroviruses), représentent environ 8% du génome humain (Balada et al., 2010).

Au moment de son intégration, l'ADN proviral présente une structure similaire à celle du génome des rétrovirus exogènes, et contient 3 régions principales, *gag*, *pol* et *env*, encadrées par des séquences terminales répétées LTR (figure 12). La région *gag* code principalement pour des protéines structurales impliquées dans l'assemblage des virions. La région *pol* contient les séquences des trois enzymes nécessaires à la réplication virale : la transcriptase inverse, l'intégrase et la RNase H. La région *env*, quant à elle, code pour un produit protéique clivé en deux protéines qui s'associent en dimères et s'ancrent dans l'enveloppe virale. La plupart des gènes d'origine rétrovirale ont été rendu inactifs au cours du temps, par des mécanismes d'insertions, de délétions ou de mutations. Cependant, dans quelques cas, les gènes viraux ont gardé des fonctionnalités et peuvent être exprimés par les cellules humaines à leur profit. L'exemple de la syncytine est une bonne illustration de ce phénomène. Cette protéine d'origine rétrovirale est codée par le gène *env* d'un HERV et a conservé sa capacité à induire une fusion membranaire. Chez l'homme, elle est exprimée pendant le développement embryonnaire et joue un rôle crucial dans la formation du placenta, en induisant la fusion de cellules spécialisées en une couche multinucléée, appelée syncytiotrophoblaste, qui est nécessaire aux interactions fœto-maternelles (Mallet et al., 2004).

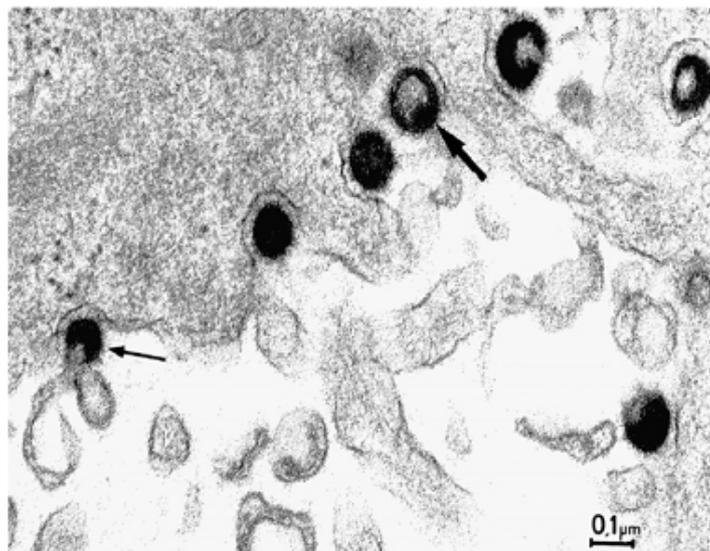
Il existe un grand nombre de HERV qui peuvent être répartis en 3 classes principales, en se basant sur leur homologie avec les rétrovirus exogènes connus. De plus, plusieurs groupes peuvent être distingués au sein de ces classes. Leur nomenclature est définie par une lettre qui correspond à l'acide aminé apporté par l'ARN de transfert qui sert d'amorce à

la transcriptase inverse. Dans le groupe des HERV-W, par exemple, l'ARN de transfert qui participe à l'initiation de la rétrotranscription apporte un triptophane (W).

## 2. Le groupe des HERV-W

### a. **Le MSRV (multiple sclerosis-associated retroviral element)**

Le multiple sclerosis-associated retroviral element (MSRV) a été découvert en 1989 par Perron *et al.* (Perron et al., 1989). Des particules rétrovirales et une activité transcriptase inverse ont alors été observées dans des cultures de cellules leptoméningées isolées à partir du liquide céphalo-rachidien (LCR) de patients SEP (figure 13). A la suite de cette première observation, le même type de particules rétrovirales matures et infectieuses ont été retrouvées à plusieurs reprises dans des monocytes, lymphocytes ou plexus choroïdes de patients atteints de SEP, mais pas chez les individus sains (Perron et al., 1997). Ce nouveau rétrovirus semble ainsi associé à la SEP et des analyses de séquences ont indiqué qu'il est proche, mais bien distinct, des rétrovirus endogènes déjà connus. Il apparaît donc que le MSRV est un HERV capable d'être exprimé et de former des particules virales infectieuses, bien que l'hypothèse que le MSRV soit un génome proviral apporté par un rétrovirus exogène proche des HERV reste difficile à écarter. L'analyse du génome humain a par la suite permis de retrouver toute une famille de rétrovirus endogènes très proches d'MSRV, et qui constituent le groupe des HERV-W (Blond et al., 1999).



**Figure 13. Observation en microscopie électronique de virions MSRV dans des cellules leptoméningées, tiré de Perron et al., 2009.**

### **b. Association entre les HERV-W et la SEP**

Le fait que le MSRV ait été isolé de façon répétée à partir de différents types cellulaires issus de patients SEP suggère intuitivement une association entre les HERV-W et cette maladie (Perron et al., 1989, 1991, 1997). MSRV n'étant pas présent chez tous les patients SEP, il ne peut pas représenter l'unique agent étiologique de la maladie. Cependant plusieurs études cliniques confirment l'existence d'une corrélation entre l'expression des HERV-W et la SEP. En effet des ARN d'HERV-W ont été détectés dans le LCR, le sang et le sérum plus fréquemment chez les patients SEP que chez les contrôles (Dolei et al., 2002; Garson et al., 1998; Serra et al., 2001). En outre la présence d'ARN MSRV dans le LCR de patients en début de SEP semble être corrélée à un mauvais pronostic (Sotgiu et al., 2006).

Les HERV-W pourraient ainsi, comme il a été proposé pour HHV-6A et HHV-6B, jouer un rôle de co-facteur dans l'étiologie de la SEP. Une étude réalisée chez des souris SCID humanisées par une greffe de lymphocytes humains vient renforcer cette hypothèse (Firouzi et al., 2003). L'injection systémique de particules MSRV chez ces souris provoque une hémorragie cérébrale léthale, probablement liée à une surproduction de cytokines pro-inflammatoires. Les HERV-W semblent ainsi posséder la capacité d'induire des réponses inflammatoires qui pourraient expliquer cette association avec une maladie neuroinflammatoire chronique telle que la SEP.

### **3. Les protéines d'enveloppe des HERV-W et leurs propriétés inflammatoires**

La protéine d'enveloppe de MSRV (ENV-MSRV) est une glycoprotéine transmembranaire de 542 acides aminés qui possède trois domaines principaux : un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine intracytoplasmique.

La syncytine-1, mentionnée précédemment, est codée par le gène ERVWE1, et fait également partie du groupe des HERV-W. Sa structure est similaire à celle d'ENV-MSRV. Les deux protéines possèdent en effet plus de 93% d'identité au niveau de leur séquence d'acides aminés.

Plusieurs études ont rapporté une association entre l'expression de ces protéines d'enveloppe des HERV-W et la SEP. Brudek *et al.* ont montré que l'expression de l'*env* de HERV-W est augmentée dans les lymphocytes et les monocytes de patients SEP (Brudek et al., 2009). Ils rapportent de plus une corrélation entre l'expression de l'*env* de HERV-W et les poussées de SEP. L'expression de la syncytine-1 est également augmentée dans le cerveau de patients atteints de SEP, en particulier dans les cellules gliales (Antony et al., 2007).

Les protéines d'enveloppes des HERV-W pourraient ainsi être directement impliquées dans la pathogénèse de pathologies inflammatoires chroniques telles que la sclérose en plaques. La caractérisation de la protéine ENV-MSRV, produite sous forme recombinante, a permis d'étayer cette théorie en mettant en évidence ses propriétés inflammatoires.

#### **a. ENV-MSRV a une activité superantigène**

Le terme de « superantigène » désigne des antigènes particuliers, capables de stimuler de manière polyclonale un grand nombre de lymphocytes T. Dans le cas d'antigènes classiques, la stimulation des lymphocytes T spécifiques se fait via la présentation de l'antigène, sous forme de peptides enchâssés dans le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII), par une cellule présentatrice d'antigènes (APC). Le clone T est stimulé seulement en cas de reconnaissance spécifique du peptide présenté par le TCR (T-cell receptor).

Les superantigènes ont la particularité de pouvoir se lier à la chaîne  $\alpha$  du CMHII, quel que soit le peptide présenté. Ils peuvent également se lier à une région variable de la chaîne  $\beta$  du TCR qui ne fait pas partie de la région de reconnaissance du complexe CMH-peptide. Les superantigènes peuvent donc stimuler tous les clones T qui expriment la version de la chaîne  $\beta$  à laquelle ils se lient.

Une étude indique que la stimulation de PBL humains avec la protéine ENV-MSRV recombinante provoque l'expansion polyclonale de lymphocytes T qui possèdent la région V $\beta$ 16, mais pas de ceux qui possèdent d'autres V $\beta$  (Perron et al., 2001). De plus, la cinétique de cette expansion qui est suivie d'une déplétion rapide à 72h est caractéristique d'une activation par un superantigène. L'ENV-MSRV présente donc des caractéristiques typiques des superantigènes.

#### **b. ENV-MSRV active TLR4**

D'autre part, une analyse des propriétés inflammatoires de la partie extracellulaire d'ENV-MSRV, appelée ENV-SU (unité de surface) a été réalisée par Rolland *et al.* (Rolland et al., 2006). Les résultats de cette étude indiquent qu'un traitement avec ENV-SU provoque la production de cytokines pro-inflammatoires par des monocytes primaires humains. La stimulation avec ENV-SU induit également la maturation des cellules dendritiques et promeut leur capacité à diriger les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> vers un profil Th1. De plus, cette étude montre que les effets provoqués par ENV-SU dépendent de son interaction avec le récepteur de l'immunité innée TLR4 et avec son co-récepteur CD14.

Ainsi la protéine d'enveloppe du MSRV présente des propriétés pro-inflammatoires multiples, du fait de son activité superantigène d'une part, et grâce à sa capacité à se lier à TLR4 et à provoquer des réponses cellulaires pro-inflammatoires d'autre part.

#### 4. Interactions avec les herpèsvirus

Les mécanismes pouvant induire l'expression des séquences rétrovirales endogènes sont encore méconnus. Néanmoins, dans le contexte de la SEP, une hypothèse qui suppose une transactivation des HERV par des facteurs exogènes, comme des infections virales, peut être émise. Les herpèsvirus, en particulier HHV-6 (comme il a été décrit plus haut), ont eux-mêmes été souvent associés à la SEP, et plusieurs études suggèrent un lien entre l'infection par ces virus et l'expression des HERV. En effet, l'infection par HSV-1, par exemple, exercerait une activité transactivatrice au niveau transcriptionnel sur les éléments HERV-W, notamment sur des séquences *gag*, *env* et les séquences LTR (Lee et al., 2003; Nellåker et al., 2006; Ruprecht et al., 2006). D'autres herpèsvirus, comme l'EBV, ont la capacité d'activer l'expression des gènes *env* d'autres HERV (Sutkowski et al., 2001). HHV-6 a également été corrélé à l'expression de gènes d'HERV. Une étude montre qu'il peut induire une augmentation de l'activité transcriptase inverse de HERV-H dans des lymphocytes de patients SEP (Brudek et al., 2007).

L'infection par HHV-6 pourrait donc activer l'expression de HERV ainsi que la production de protéines d'enveloppes aux propriétés pro-inflammatoire. Ceci représente ainsi un mécanisme supplémentaire de stimulation du système immunitaire par HHV-6.

HHV-6A et HHV-6B sont ainsi capables d'induire des réponses pro-inflammatoires chez différents types cellulaires et de stimuler la réponse immunitaire par de nombreux moyens. De plus, comme il a été décrit dans la partie 2, ces deux virus sont capables d'infecter le SNC. Il est donc probable que la présence du virus dans le cerveau puisse déclencher des réponses pro-inflammatoires dans cet organe. Cependant, les mécanismes précis impliqués n'ont pas encore été clairement identifiés, et peu de preuves *in vivo* du lien entre HHV-6 et la neuroinflammation ont été apportées.

## 4<sup>ème</sup> Partie : Modèles animaux d'infection par HHV-6

Les modèles animaux constituent d'excellents outils pour l'étude de la pathogénèse induite par les virus. Dans le cas d'HHV-6, l'utilisation de modèles animaux pourraient être d'une aide précieuse, en particulier dans le contexte de l'infection du SNC. Les pathologies liées à l'infection par HHV-6 ayant été détectées uniquement chez l'Homme, les efforts pour développer des modèles animaux se sont surtout concentrés sur les espèces les plus proches de l'Homme, c'est-à-dire les modèles singes.

### A. Modèles simiens

#### 1. Infection naturelle chez le singe

Dans les années qui ont suivi la découverte du virus, plusieurs groupes ont cherché à déterminer si HHV-6 est capable d'infecter le singe de façon naturelle. Les travaux initiaux de Salahuddin *et al.*, puis de Lusso *et al.* décrivent une absence d'anticorps spécifiques chez plusieurs espèces de primates non humains du nouveau et de l'ancien monde (Lusso *et al.*, 1990; Salahuddin *et al.*, 1986). En contradiction avec ces résultats, une étude menée sur une dizaine d'espèces de singes a révélé la présence d'anticorps anti-HHV-6, suggérant ainsi une infection par HHV-6 ou par un virus homologue (Higashi *et al.*, 1989). Parmi les dix espèces testées, huit se sont ainsi révélées positives en test d'immunofluorescence et de seroneutralisation. Avec des prévalences comprises entre 75 et 100%, les singes verts, les saïmiris, les chimpanzés et les orangs-outans semblent être les plus fréquemment infectés. De plus, plusieurs groupes de singes d'une même espèce, mais provenant de lieux différents ont présenté des taux de prévalence similaires, ce qui suggère que la susceptibilité à l'infection peut varier en fonction de l'espèce.

Lors d'une étude plus récente, visant à rechercher de nouveaux virus chez les singes, Lacoste *et al.* ont isolé un virus proche d'HHV-6 à partir de sang de chimpanzé (Lacoste *et al.*, 2005). Ce nouvel homologue, appelé PanHV6, est particulièrement proche de la souche Z29 d'HHV-6B. Il a été retrouvé chez une vingtaine de chimpanzés nés en liberté, originaires du Cameroun et du Gabon, ou nés en captivité dans un élevage néerlandais, ce qui indique qu'il est répandu dans différentes populations de chimpanzés. La découverte de cet homologue s'ajoute à celle d'autres herpèsvirus simiens proches du cytomégalovirus humain (Davison *et al.*, 2003) et du virus d'Epstein-Barr (Ehlers *et al.*, 2003) et pourrait attester d'un phénomène de co-évolution entre les herpèsvirus et leurs hôtes.

Ainsi la susceptibilité naturelle de certaines espèces de singes à l'infection par HHV-6 ou par un virus simien homologue a permis d'envisager l'utilisation de singes comme modèle pour l'étude de la pathogénèse d'HHV-6A et/ou -6B.

## 1. Infection expérimentale

### a. Infection de cellules simiennes

Les singes représentent à ce jour le seul modèle animal disponible pour l'étude de l'infection par HHV-6. D'après des analyses effectuées sur des cellules mononuclées de sang périphérique (PBMC) provenant de plusieurs espèces de singes, et inoculées *ex vivo*, il semble que les cellules de chimpanzés (*Pan troglodytes*), et de macaques (*Macaca nemestrina* et *M. mulata*) soient les plus susceptibles à l'infection par HHV-6 (Lusso et al., 1990, 1994). L'infection de ces PBMC conduit en effet à une production de protéines virales détectables en immunofluorescence, et de particules virales visibles en microscopie électronique. L'infection semble pourtant particulièrement variable selon l'espèce de singe testée, et le virus utilisé (A ou B). Les PBMC de macaques rhésus (*M. mulata*) se sont par exemple révélées susceptibles à l'infection par HHV-6B seulement, alors que les PBMC de macaques à queue de cochon (*M. nemestrina*) semblent présenter une susceptibilité équivalente aux deux virus.

### b. Infection *in vivo*

Assez rapidement après la découverte d'HHV-6, Yalcin *et al.* ont réalisé une première étude portant sur l'infection de singes verts (*Cercopithecus aethiops*) et de macaques cynomolgus (*M. fascicularis*) avec la souche HST d'HHV-6B (Yalcin et al., 1992) (Tableau 2). L'infection restée asymptomatique chez les deux espèces, mais a conduit au développement d'une réponse anticorps. Un modèle d'infection par HHV-6A a ensuite été développé chez le macaque (*M. nemestrina*) (Lusso et al., 2007). Après inoculation, des symptômes cliniques d'intensité faible à modérée ont été observés : fièvre, écoulement nasal, splénomégalie, lymphadénopathie, et éruption cutanée abdominale (chez un seul animal). De plus l'infection au niveau systémique a été confirmée par la détection d'une virémie plasmatique, le développement d'une réponse anticorps, et la présence de transcrits viraux dans les ganglions lymphatiques.

Récemment, un modèle d'infection par HHV-6A et HHV-6B a été développé chez le ouistiti (*Callithrix jacchus*), et confirme une différence de pathogénèse entre les deux virus (Leibovitch et al., 2013). Pour l'infection par HHV-6A, deux voies d'inoculation, intraveineuse et intranasale, ont été testées. Chez les singes ayant reçu une injection intraveineuse, une réponse IgG et IgM a été détectée, ainsi qu'une présence d'ADN viral dans plusieurs organes

Espèce	Virus analysé	Voie d'inoculation	Signes cliniques observés	Données virologiques	Référence
 Singe vert ( <i>Cercopithecus aethiops</i> )	HHV-6B (HST)	s.c./i.v.	éruption cutanée (1 animal)	réponse IgG virémie plasmatique ADN viral (g.l.)	Yalcin 1992
 Macaque cynomolgus ( <i>Macaca fascicularis</i> )			aucun	réponse IgG virémie plasmatique ADN viral (rate)	
 Macaque à queue de cochon ( <i>Macaca nemestrina</i> )	HHV-6A (GS)	i.v.	fièvre, écoulement nasal, splénomégalie, lymphadénopathie, éruption cutanée abdominale	réponse IgG virémie plasmatique transcrits viraux (g.l.)	Lusso 2007
 Macaque rhésus ( <i>Macaca mulata</i> )	HHV-6A	n.d.	aucun	n.d.	Lusso 1996*
 Marmouset ou Ouistiti ( <i>Callithrix jacchus</i> )	HHV-6A (U1102)	i.v. (4 injections)	faiblesses motrices, anomalies sensorielles, légère paralysie faciale, lésions dans le corps calleux à l'IRM	réponses IgG et IgM faible virémie plasmatique ADN viral (cerveau)	Leibovitch 2013
	HHV-6B (Z29)	i.v. (4 injections)	aucun	réponse IgG, faible réponse IgM faible virémie plasmatique ADN viral (cerveau)	
	HHV-6A (U1102)	i.n. (3 injections)	aucun	faible réponse IgG et IgM, virémie plasmatique ADN viral (salive + PBMC)	
 Tamarin ( <i>Sanguinis labiatus</i> )	HHV-6A	n.d.	aucun	n.d.	Lusso 1996*
 Souris ( <i>Mus musculus</i> )	HHV-6B (Z29)	i.p.	aucun	réponse IgG	Svensson 2010
	HHV-6A	n.d.	aucun	n.d.	Lusso 1996*
 Lapin ( <i>Oryctolagus cuniculi</i> )	HHV-6A	n.d.	aucun	n.d.	Lusso 1996*
 Cochon d'inde ( <i>Cavia porcellus</i> )	HHV-6A	n.d.	aucun	n.d.	Lusso 1996*
 Canard ( <i>Anas platyrhynchos</i> )	HHV-6A	n.d.	aucun	n.d.	Lusso 1996*
 Poulet ( <i>Gallus domesticus</i> )	HHV-6A	n.d.	aucun	n.d.	Lusso 1996*

**Tableau 2. Infection *in vivo* par HHV-6A ou HHV-6B chez différentes espèces d'animaux.** La majorité des expériences d'infection *in vivo* ont été réalisés chez le singe. Chez la quasi-totalité des espèces testées, peu ou aucun signes cliniques de maladie n'apparaissent suite à l'infection. Seule l'infection par HHV-6A chez le marmouset produit des symptômes neurologiques. n.d : non disponible, i.p : injection intrapéritonéale, i.n : intranasale, i.v : intraveineuse g.l : ganglions lymphatiques, \* : les résultats présentés n'ont pas été publiés, mais font référence à la revue de P. Lusso (Lusso, 1996).

(ganglions lymphatiques, reins, foie...), mais très rarement dans le plasma, la salive ou les PBMC. De l'ADN viral a notamment été retrouvé dans le cerveau de l'un d'eux, confirmant les propriétés neuroinvasives du virus *in vivo*. Ces animaux ont développé des symptômes neurologiques clairs, tels que des faiblesses motrices et des problèmes sensoriels. De plus, des anomalies cérébrales ont pu être décelées dans le cerveau d'un des animaux par imagerie à résonance magnétique (IRM). En comparaison, les singes ayant reçu une injection intranasale n'ont développé aucun signe neurologique, et ont plus rarement développé des réponses anticorps. De façon surprenante, de l'ADN viral a été retrouvé dans le plasma, la salive et les PBMC de ces animaux beaucoup plus fréquemment que chez les singes injectés en intraveineux, mais pas dans les autres organes (cerveau inclus).

Dans cette étude, un autre groupe d'animaux a été inoculé avec HHV-6B par voie intraveineuse. Ces animaux n'ont développé aucun signe clinique lors de l'infection. Ils n'ont pas non plus développé de réponse IgM spécifique, et la présence d'ADN viral a été très rarement détectée en périphérie. Néanmoins de l'ADN viral a été détecté dans le cerveau de deux animaux sur quatre, indiquant que le virus HHV-6B est, comme HHV-6A, capable d'infecter le cerveau dans ce modèle simien, sans pour autant causer de symptômes cliniques.

Ce modèle met bien en évidence la différence de pathologie entre HHV-6A et HHV-6B au niveau du système nerveux central, et souligne l'importance de la voie d'inoculation dans la pathogénèse virale. Il constitue à ce jour le seul modèle d'infection par HHV-6A avec de forts signes cliniques associés.

## B. Modèles murins

### 1. Infection de cellules murines

Quelques études ont rapporté l'analyse de l'infection de cellules murines par HHV-6 *in vitro*. De Bolle *et al.* ont comparé la susceptibilité de plusieurs lignées cellulaires humaines et non humaines à l'infection par HHV-6A et HHV-6B (De Bolle *et al.*, 2005b). Ils mentionnent notamment que les deux espèces A et B ne se répliquent pas dans la lignée cellulaire murine FM3A (lignée de carcinome mammaire). De plus, aucun transcrite viral n'est détecté dans ces cellules après infection, ce qui suggère que les cellules murines ne sont pas permissives à l'infection par HHV-6. Toutefois, une autre étude a montré que l'infection par HHV-6A et HHV-6B permet la transcription de gènes viraux dans des précurseurs d'oligodendrocytes primaires murins, bien qu'aucune réplication virale ne soit observée (Mock *et al.*, 2006). En outre, cette étude indique qu'HHV-6A et HHV-6B induisent l'arrêt du cycle cellulaire dans ces

précurseurs oligodendrogliaux murins, de la même façon que dans les précurseurs humains. Ceci suggère donc que certains types cellulaires murins pourraient présenter une certaine susceptibilité à l'infection par HHV-6.

## 2. Infection *in vivo*

La souris a initialement été décrite comme résistante à l'infection par HHV-6 (Lusso, 1996), ceci étant probablement en partie dû à l'expression restreinte à la lignée germinale de l'homologue de CD46 chez cet animal (Tsumimura et al., 1998). Un modèle d'infection a cependant été développé à l'aide de souris immunodéprimées SCID (pour « severe combined immunodeficiency ») (Gobbi et al., 1999). Ces souris présentent une mutation qui provoque une profonde lymphopénie T et B, et qui permet la greffe de tissus hétérologues sans problème de rejet. Ici, les souris ont été humanisées par greffe de tissu thymique et hépatique fœtaux humain sous la capsule rénale. Dans ce modèle, l'infection du tissu humain par HHV-6A et HHV-6B est réalisée sous anesthésie par injection directe dans le greffon, après exposition de l'implant par chirurgie. Ce système a donc permis l'étude de l'infection de tissu humain dans un contexte intégré *in vivo*. Cependant, au cours de ces analyses, l'infection des tissus murins n'a pas été décrite.

D'autre part, une étude portant sur l'infection de souris BALB/c par HHV-6B (souche Z29) a été menée par un groupe suédois (Svensson et al., 2010). Les résultats indiquent que l'inoculation de virus HHV-6B n'a pas conduit à une infection systémique chez ces souris, mais a entraîné le développement d'une réponse anticorps IgG spécifique, même en utilisant un virus irradié non répliquatif. De façon intéressante, le virus irradié injecté en périphérie a un effet protecteur contre l'induction d'un modèle d'allergie, en limitant l'inflammation dans le poumon, probablement en inhibant la réponse de type Th2.

## C. Autres modèles ?

La susceptibilité de plusieurs autres espèces animales, dont le lapin, le cochon d'inde et le poulet a été analysée, mais ces différentes espèces se sont avérées résistantes à l'infection (Lusso, 1996) (tableau 2). Jusqu'à présent, l'infection chez le singe est donc restée la seule véritable alternative pour l'étude de l'infection par HHV-6 *in vivo*. Cependant, l'utilisation de tels animaux comporte de nombreuses contraintes à la fois éthiques, scientifiques et financières. Ainsi le développement de nouveaux modèles plus accessibles reste nécessaire afin de progresser dans la compréhension de la pathogénèse virale.

# **Objectifs principaux et modèles d'étude**

---



HHV-6A et HHV-6B sont deux virus humains principalement lymphotropes dont l'infection primaire reste le plus souvent bénigne ou asymptomatique. Pourtant, tous deux semblent également capables d'induire des pathologies neurologiques inflammatoires, que ce soit suite à une infection primaire chez l'enfant, ou plus tardivement lors de réactivations virales. Ils peuvent ainsi être à l'origine du développement d'encéphalites et de méningites, et ont été associés au développement de la sclérose en plaques. Cependant, les mécanismes impliqués dans l'induction de ces maladies par HHV-6 sont encore peu connus. Il est maintenant admis qu'HHV-6A et HHV-6B sont tous deux capables d'atteindre et d'infecter le cerveau. Toutefois, l'infection des cellules neurales humaines est rarement lytique, et il est donc peu probable qu'HHV-6A ou HHV-6B puisse induire des dommages directs dans le SNC. Les deux virus ont par ailleurs la capacité d'induire diverses réponses pro-inflammatoires dans différents types cellulaires. L'infection par HHV-6 pourrait donc avoir des conséquences inflammatoires dans le SNC et participer au déclenchement de pathologies neurologiques.

Mon travail de thèse s'inscrit dans ce contexte, et a pour objectif principal de **comprendre par quels mécanismes HHV-6 est susceptible d'induire l'inflammation au sein du SNC**. En outre, les études épidémiologiques suggérant de plus en plus une divergence entre HHV-6A et HHV-6B, cette étude a également pour but de **comparer les caractéristiques des deux espèces**. Pour cela, nous avons choisi d'analyser les souches GS d'HHV-6A et Z29 d'HHV-6B, en utilisant deux approches distinctes :

1. La première consiste à analyser l'infection du SNC par HHV-6 et ses conséquences inflammatoires *in vivo*. La souris ayant initialement été décrite comme résistante à l'infection par HHV-6, nous avons décidé de **développer et de caractériser un modèle d'infection par HHV-6A et HHV-6B chez des souris exprimant la protéine humaine CD46**, identifiée comme récepteur pour les deux virus.
2. La seconde est une approche *in vitro*, basée sur l'analyse de cultures cellulaires humaines. Les effets inflammatoires directs de l'infection par HHV-6A et HHV-6B sur différentes cellules humaines ayant déjà été vastement décrits, notre étude s'est axée plus particulièrement sur **l'interaction entre l'infection par HHV-6 et l'expression de gènes *env* de rétrovirus endogènes HERV-W**, qui possèdent des propriétés pro-inflammatoires, et dont l'expression a été associée à des maladies neuroinflammatoires telles que la SEP.

Ces deux méthodes permettent ainsi d'aborder le sujet des conséquences de l'infection par HHV-6 sous différents angles, et pourront aboutir à des résultats complémentaires.



# Résultats expérimentaux

---



# 1<sup>ère</sup> partie : Analyse de l'infection par HHV-6A et HHV-6B chez les souris CD46-transgéniques : conséquences neuroinflammatoires

Très peu d'études ont décrit l'infection par HHV-6 dans le modèle murin. La souris est en général considérée comme résistante à l'infection par HHV-6. Pour cause, l'expression de CD46, seul récepteur cellulaire identifié à ce jour pour HHV-6A et HHV-6B, est restreinte à la lignée germinale. Dans cette étude, nous supposons que l'expression de la protéine CD46 humaine par les cellules murines peut permettre l'infection par HHV-6 dans les cultures *in vitro*, et chez l'animal.

Afin d'évaluer la validité de cette hypothèse, nous avons dans un premier temps analysé l'infection par HHV-6A et HHV-6B dans des cellules M12 (lignée lymphoïde B) qui expriment ou non la protéine CD46 humaine. Nous avons ensuite utilisé plusieurs lignées de souris transgéniques croisées sur un fond génétique C57BL/6, exprimant soit l'isoforme CD46-Cyt1, soit l'isoforme CD46-Cyt2. Une troisième lignée a été générée en introduisant la séquence génomique complète de CD46 (CD46ge), permettant ainsi l'expression des deux isoformes. Etant donné l'importance du système IFN de type I dans le contrôle des infections virales à des temps précoces, nous avons également utilisé une lignée de souris KO pour le récepteur à l'IFN I (IFNAR<sup>-/-</sup>) exprimant CD46-Cyt2. A partir de ces différentes lignées de souris, nous avons généré des cultures primaires de cellules gliales de cerveau, afin d'analyser l'infection des cellules neurales murines *in vitro*.

Dans un deuxième temps, les souris ont été inoculées avec les virus A et B, afin d'analyser l'infection *in vivo*. L'inoculation a été réalisée en deux étapes : une première injection intra-crânienne de virus, afin de cibler le SNC, suivie, une semaine plus tard, d'une injection systémique intra-péritonéale de cellules infectées, afin de favoriser la propagation du virus chez la souris par contact cellulaire.

A l'aide de ces différents dispositifs expérimentaux, nous avons tout d'abord tenté de caractériser l'infection par HHV-6A et HHV-6B chez les souris et dans les cellules murines en analysant différents paramètres viraux, tels que la présence d'ADN viral, l'expression d'ARN et de protéines virales ou encore le développement d'une réponse anticorps. Puis, nous avons étudié les conséquences inflammatoires de la présence d'HHV-6 dans le cerveau, et dans les cultures de cellules neurales. Les résultats de cette première partie ont fait l'objet d'un premier article présenté ci-dessous.



## ARTICLE 1

# **Human Herpesvirus-6A infection in CD46 transgenic mice: viral persistence in the brain and increased production of proinflammatory chemokines via TLR9**

Joséphine M. Reynaud, Jean-François Jégou<sup>a</sup>, Jérémy Welsch and Branka Horvat\*

International Center for Infectiology Research, INSERM U1111, CNRS UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, University of Lyon 1, 69365 Lyon, France

<sup>a</sup>Current address: LITEC, EA 4331, Pôle de Biologie-Santé, University of Poitiers, 86022, Poitiers, France

Manuscrit en préparation



## **Abstract**

Human herpesvirus (HHV)-6 infection has been related to neuroinflammatory diseases, however, the lack of suitable small animal infection model has considerably hampered further studies of HHV-6-induced neuropathogenesis. Here, we have analyzed the susceptibility to infection of several lines of transgenic mice, expressing different isoforms of human CD46, identified as a receptor for both HHV-6A and HHV-6B. We show that HHV-6A (GS) infection results in the expression of viral transcripts in primary brain glial cultures from CD46-expressing mice, while HHV-6B (Z29) infection was inefficient. In the presence of HHV-6A-infected human lymphocytes, murine primary brain cultures produce viral proteins and develop syncytia. Although infected mice did not show visible clinical signs of disease, HHV-6A DNA persisted for up to 9 months in the brain of CD46-expressing mice but not in the non-transgenic littermates, whereas HHV-6B DNA levels decreased rapidly after infection in all mice. Infected mice produced HHV-6-specific antibodies and histological studies revealed the presence of infiltrating lymphocytes and monocytes in periventricular areas of the brain. Surprisingly, absence of interferon type I signaling did not affect the permissiveness of murine cells to HHV-6 infection. Though, HHV-6A stimulated the production of panel of proinflammatory chemokines in primary brain glial cultures, including CCL2, CCL5 and CXCL10 and induced the expression of CCL5 in the brains of CD46-infected mice. This induction of chemokines was strongly reduced in brain cultures treated with toll-like receptor 9 (TLR9) antagonist, revealing thus its importance in HHV-6A immunopathogenesis. Finally, in addition to the effect in murine cells, HHV-6A but not HHV-6B induced signaling via human TLR9 as well. Altogether, this study presents a first murine model for HHV-6A infection and suggests the role of TLR9 in the HHV-6A-induced production of proinflammatory chemokines in the brain and consecutive inflammatory response, thus opening novel perspectives for the study of virus-associated neuropathology.

## **Author's Summary**

Human herpesvirus 6 (HHV-6) is widely spread in the human population and has been associated with several neurological disorders, including multiple sclerosis. To develop a small animal model of HHV-6 infection, we analyzed the susceptibility of several lines of

transgenic mice, expressing human CD46, identified as a receptor for both HHV-6A and HHV-6B. We found that only HHV-6A infection results in the expression of viral transcripts in primary brain glial cultures from CD46-expressing mice. HHV-6A DNA persisted several months in the brain of CD46 transgenic mice, HHV-6-specific antibodies were detected in the serum and infiltration of lymphocytes was found in periventricular areas of the brain, although clinical signs of disease were not observed. Furthermore, HHV-6A stimulated the production of panel of pro-inflammatory chemokines in primary brain cultures and induced the expression of CCL5 in the brains of CD46-infected mice. HHV-6A-induced production of chemokines was dependent on the stimulation of toll-like receptor 9 (TLR9). Finally, HHV-6A induced signaling through human TLR9 as well, extending thus observations from the murine model to human infection. Altogether, these results describe the first murine model for HHV-6A infection and suggest that HHV-6A can initiate neuroinflammation via TLR9.

## Introduction

Human herpesvirus (HHV)-6A and -6B are two rather ubiquitous  $\beta$ -herpesviruses which share more than 90% of nucleotide sequence identity but differ in certain genetic features and clinical manifestations [1]. HHV-6B has long been identified as the etiological agent for *exanthem subitum*, a common infant febrile illness [2], while primary infection with HHV-6A has not yet been conclusively associated with any specific disease. Although the presence of DNA and RNA sequences from HHV-6A and HHV-6B has been described in the central nervous system (CNS) of healthy individuals [3–7], several studies have correlated HHV-6 infection to neuroinflammatory diseases. In immunosuppressed patients, HHV-6A and -6B could often reactivate and are able to provoke neurological complications such as severe encephalitis or meningitis [8]. In addition, both viruses have been proposed to play a role in the pathogenesis of the autoimmune neurological disease multiple sclerosis [9–12]. However, the mechanisms explaining how HHV-6 could be involved in such diseases remain to be elucidated.

The human transmembrane protein CD46 was identified as the receptor responsible for HHV-6 entry into host cells [13]. This complement regulatory protein is also the receptor for several other pathogens, such as measles virus and *Neisseria* [14–16]. Alternative splicing

mechanisms lead to the expression of different isoforms of the protein, which can be placed into two groups, according to their cytoplasmic tail, CD46-cyt1 (short) or CD46-cyt2 (long), exhibiting different immunoregulatory properties [17]. CD46 expression in humans is ubiquitous [18] and therefore provides a wide range of potentially susceptible cell types for HHV-6 infection. Although lymphocytes are known as the main target cells, several CNS cell types, including astrocytes and oligodendrocytes have been successfully infected by HHV-6A, and with lower efficiency by HHV-6B [19–26].

Like most herpesviruses, HHV-6 can establish long-term latency in their hosts using immunomodulatory mechanisms to evade the immune system. HHV-6 is indeed known to infect T cells very efficiently and to reduce their proliferation [27–29], and some viral proteins have been shown to inhibit signaling pathways involved in immune responses [30–32]. However, HHV-6 is also able to promote inflammation by inducing the development of a Th1 phenotype in T cells [33,34], enhancing the cytotoxicity of NK cells [35], and by increasing the production of proinflammatory cytokines and chemokines in different cell types [36,37]. In particular, HHV-6A was shown to induce the expression of CCL5 (RANTES) in human astrocytes, endothelial cells and tonsillar cells [38–40]. Interestingly, HHV-6 was found to establish latency in the host by integrating into human chromosomes and allowing the virus to be transmitted in the germ line in some individuals [41], which is so far unique among herpesviruses.

Animal models are of critical importance to better understand the pathogenesis of HHV-6 infections, nevertheless, only few are currently available. Shortly after HHV-6 discovery, Yalcin *et al.* described an asymptomatic infection of cynomolgus macaques and African green monkeys with an HHV-6B strain, associated with a rise in HHV-6-specific IgG levels [42]. HHV-6A infection was later performed in pig-tailed macaques and led to moderate symptoms, antibody response and plasma viremia [43]. Recently, a marmoset model was used to study HHV-6A and -6B infection and showed that HHV-6A, but not HHV-6B, is able to provoke neurological symptoms [44]. However, monkey experiments are often limited, as they imply severe ethical constraints and elevated costs. The development of a more suitable small animal model would therefore be of high interest for the study of HHV-6 pathogenesis and particularly of HHV-6-related neuroinflammation. Mice were initially described to be resistant to HHV-6 infection [45], possibly due to the testis-restricted

expression of the murine homologue of CD46 [46], and only humanized SCID mice, transplanted with human fetal liver and thymus, could efficiently replicate HHV-6 [47]. Although these mice allowed the analysis of some aspects of HHV-6 immunopathology, they could not be applied to study viral neuropathology. In this study, we characterized a new model for HHV-6 infection in mice expressing the human CD46 protein. Infection of CD46 transgenic mice with HHV-6A but not HHV-6B resulted in the persistence of viral DNA for up to 9 months in the brains of infected animals. HHV-6A infection was followed by lymphocyte infiltration and CCL5 upregulation, although clinical signs of disease were not observed. The secretion of a panel of chemokines was increased after infection in primary brain glial cultures generated from CD46 transgenic mice as well, and the HHV-6-induced chemokine expression was inhibited when TLR9 signaling was blocked. These results describe the first murine model for HHV-6A infection and support the hypothesis that HHV-6A can initiate the neuroinflammation via TLR9 pathway.

## **Materials and Methods**

### *Cell-lines and viruses*

Murine lymphoid B-cell M12 was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). M12 cells stably expressing CD46-cyt2 (M12-CD46) were described previously [16]. HSB2 and MOLT3 human T cell lines were cultured in complete RPMI medium supplemented with 10% FCS. Human embryonic kidney (HEK) cells stably expressing the human TLR9 (hTLR9) gene and the luciferase reporter gene were kindly provided by Kate Fitzgerald (UMASS, Worcester, USA) and cultured in complete DMEM medium supplemented with 10% FCS.

HHV-6A (GS strain) and HHV-6B (Z29 strain) were kindly provided by Dr L. Naesens (Belgium) and propagated respectively in the HSB2 and MOLT3 cells. For virus production, cells were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 0,005 for 1h30 at 37°C. At maximum cytopathic effects (CPE), cells were centrifuged, resuspended in ten-fold lower volume of fresh RPMI supplemented with 20% of FCS, aliquoted and stored at -80°C. For cell-free virus production, infected cell suspensions at maximum CPE were frozen at -80°C. After 3

thawing-freezing cycles, virus suspensions were then clarified by centrifugation (20 min, 4000 g, 4°C) and loaded on a 15% sucrose layer. Viruses were pelleted by ultracentrifugation (2h, 28500 rpm, SW32Ti rotor) and resuspended in cold FCS. Non-infected cell suspensions were processed in identical conditions and were used for mock infections. Experimental HHV-6 infection of nonadherent cells, M12 and M12-CD46, was performed in suspension for 1h30 at 37°C with a MOI 1. Cells were then pelleted and resuspended in fresh medium for further culture.

Virus titers were determined by immunofluorescence. HSB2 or MOLT3 cells were cultured in 96-well plates and infected in quadruplicate with serial dilutions of viral stock. After 5 days of culture, cells were harvested on 10-well slides, fixed in cold acetone, stained with mouse anti-p41 primary antibody (Santa Cruz Biotechnology) and Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse secondary antibody (Molecular Probes). Titers were calculated in tissue culture infective dose 50 per ml (TCID<sub>50</sub>/ml).

#### *Ethics Statement*

All animals were handled in strict accordance with good animal practice as defined by the French national charter on the ethics of animal experimentation. Animal work was approved by the Regional ethical committee (Comité Régional d’Ethique pour l’Experimentation Animal de la Région Rhone-Alpes, CREEA, protocol N° 0226) and by Regional Ethical Committee CECCAPP, protocol N° ENS\_2011\_043) and experiments were performed in the PBES (Plateau de Biologie Experimentale de la Souris), ENS-Lyon, in Lyon, France (French Animal regulation committee N°B 69 1230 303).

#### *Animals and infection protocols*

Transgenic mice expressing ubiquitously cyt1 (CD46-cyt1 mice) or cyt2 (CD46-cyt2 mice) isoforms of CD46, in C57BL/6J or Balb/c background [17], mice transgenic for the whole genomic sequence and promoter of CD46 (CD46ge mice) [48] and CD46-cyt2 mice crossed into the interferon (IFN) type 1 receptor knock out (IFNAR<sup>-/-</sup>) background [49] were bred and used in the animal facility PBES of ENS Lyon, France.

Four to seven week-old mice were anesthetized with a solution of ketamine (Pharma) and xylazine (Rompun) and then received an intracranial (i.c.) injection of 50 µl of HHV-6A or

-6B ( $10^5$  TCID<sub>50</sub> per mouse), or UV-inactivated virus (30 min at 254 nm) in the right hemisphere. Control mice were injected with mock solution (described above). An additional intraperitoneal (i.p.) injection of  $2 \cdot 10^6$  HHV-6A- or HHV-6B-infected HSB2 or MOLT3 cells, respectively, was performed one week after i.c. injection. Animals were sacrificed and brains, spleens and blood were collected at several time points after infection. Brains were immediately frozen at -80°C for further analysis. Splenocytes were isolated by mechanical disruption followed by red blood cell lysis before nucleic acid extraction. For the analysis of chemokine expression and histology, mice received only i.c. injection with purified virus, and were perfused with PBS before brain sampling.

#### *Primary brain glial cell cultures*

Brains were extracted from newborn CD46-transgenic or wild type mice (3-4 days-old, washed in DMEM medium and homogenized by passing through sterile syringe and needle (19-gauge) and cultured as described previously [68]. Briefly, 12-well plates were pre-coated overnight with poly-D-lysine (50 µg/ml, Sigma), and cells were cultured in 1ml of DMEM medium supplemented with 20% FCS for the first 48h. Further culture was performed using 10% FCS and medium was renewed three times per week. Cell cultures usually appeared confluent after 6-8 days and contained astrocytes (~90 %), oligodendrocytes and microglial cells. Cultures were infected for 2h at 37°C with  $5 \cdot 10^5$  TCID<sub>50</sub> per well of HHV-6A, HHV-6B, UV-irradiated virus or were mock-infected in a final volume of 0.5 ml, and fresh medium was then added. TLR9 blocking treatments were performed using ODN 2088 (Invivogen) at 10 µg/ml. At 1, 2 or 5 days post-infection, culture supernatants were collected and cells were washed twice with PBS before total RNA or genomic DNA extraction.

#### *Nucleic acids extraction and quantitative PCR*

Genomic DNA was extracted from both cells and brain tissue using Nucleospin tissue columns (Macherey-Nagel) and total RNA were extracted using the RNeasy kit (Qiagen) including DNase I treatment. RNA were additionally treated with Turbo DNase (Ambion) to exclude any contamination with genomic DNA. Retro-transcription was performed on 0.5 µg

of total RNA using the iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad). Products were diluted (1/10) and 5  $\mu$ L of dilution were used for DNA amplification.

Quantitative PCR reactions on genomic DNA were performed using 50 ng of DNA template, and the set of primers specific for the HHV-6 U41 gene (Oster et al.) (sense: GTCATAGACCGGAGCATCGT; anti-sense: TGAGGTGATGAGGGATAGGG, amplicon length = 196 bp). For normalization of murine and human samples, genomic DNA was run in parallel with murine  $\beta$ -actin primers (sense: GGTACTAACAATGGCTCGTGTGAC; anti-sense: TCAGGGCAGGTGAAACTGTATGG; amplicon length = 190 bp) or human  $\beta$ -globin primers (sense: CCCTTGACCCAGAGGTTCT; anti-sense: CGAGCACTTTCTTGCCATGA), respectively.

Quantitative PCR reactions on cDNA templates were performed with primers specific to the viral genes U79 (sense: AACGACGAAGACAAGCAACCG; anti-sense: TGTTATGCCATCCTCGTGACTTTG), U94 (sense: CGCCCCTGATTTCCGTTGTG; anti-sense: CCTGCAAAGTGGTACGCTCAAG) and U100 (sense: AACTGAGGAACTGATGGAAACC; anti-sense: GCTTACGATGGCAGGATCTATG). As transcripts of U79 (early transcript) and U100 (late transcript) genes are extensively spliced, primers were designed to span exon/exon junctions in order to discriminate between cDNA and potential genomic DNA contamination.

The expression of the genes coding for murine CCL2, CCL5 and CXCL10 were analyzed using following primers: CCL2 sense: ACCAGCACCAGCCAACTC; CCL2 anti-sense: CAGAAGCATGACAGGGACC; CCL5 sense: GCACCTGCCTCACCATATGG; CCL5 anti-sense: AGCACTTGCTGCTGGTGTAG, CXCL10 sense: GCAACTGCATCCATATCG, CXCL10 antisense: GACATCTCTGCTCATCATT. Glyceraldehyde 3'-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as housekeeping gene for viral mRNA quantification in both human and murine samples (murine GAPDH sense: GCATGGCCTTCCGTGTCC; murine GAPDH anti-sense: TGTCATCATACTTGGCAGGTTTCT; human GAPDH sense: CACCCACTCCTCCACCTTTGAC; human GAPDH anti-sense: GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG). The PCR efficiency of each set of primers was determined using the standard curves obtained by performing real-time PCR on ten-fold dilutions of PCR products. These dilutions of PCR products were then used as standard references and included in each PCR run, in order to standardize the PCR run with respect to template integrity, sample loading and inter-PCR variations.

All real-time PCR reactions were performed in duplicate using the Platinum Sybr Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen). Samples were run in ABI Prism 7000 SDS and results

were analyzed using ABI Prism 7000 SDS software. Levels of viral DNA were normalized to the number of cells in each sample by comparison to the  $\beta$ -actin gene, and expressed as U41 copies per copy of  $\beta$ -actin. Calculations were done using the  $2^{\Delta\Delta CT}$  model, according to the MIQE guideline [50,51] and the expression of all mRNA analyzed were normalized to GAPDH.

#### *Cytokine assay*

Supernatants from HHV-6A or mock-infected primary brain glial cell cultures from wild type or CD46-transgenic mice were collected 48h post-infection, and analyzed with Proteome Profiler antibody array for mouse cytokines (R&D systems), which can detect 40 different murine cytokines. Each supernatant was mixed and incubated with a cocktail of biotinylated detection antibodies and blotted onto a nitrocellulose membrane previously spotted in duplicate with capture antibodies, according to the manufacturer's instructions. Revelation was performed by chemiluminescence using HRP-coupled streptavidin. Data were analyzed using the software Quantity One and expressed as mean pixel density.

#### *Antibody detection*

96-well plates were coated overnight at 37°C with UV-irradiated purified HHV-6A virions diluted in carbonate/bicarbonate buffer (pH 9.6). Wells were washed and blocked for 1h at room temperature with PBS supplemented with 3% bovine serum albumin (PBS/BSA 3%). Ten-fold dilutions of serum were added to each well in duplicate and incubated for 2h at 37°C. HHV-6-specific antibodies were revealed using HRP-conjugated anti-murine IgG antibody (Promega). Standard curves, obtained by serial dilution of positive serum from mice immunized with HHV-6 antigens in complete Freund adjuvant, were run for each experiment. One arbitrary unit (AU) was attributed to the ten-fold dilution of the control serum. After washing, coloration was observed by adding 200  $\mu$ l/well of ortho-phenylenediamine solution (Sigma), after incubation for 30 min at 37°C. Absorbance was measured using the microplate reader VersaMax (Molecular Devices). Data were analyzed with Softmax Pro 5.3 software, using a standard curve and expressed as AU.

### *Immunofluorescence*

For immunofluorescence stainings, primary brain cells were seeded on coverslips previously coated with poly-D-lysine (Sigma). After infection, coverslips were washed with PBS, cells fixed in cold acetone for 10 min and rehydrated in PBS overnight. Aspecific binding sites were blocked with PBS/BSA 3% before incubation with mouse anti-p41 antibody (9A5D12, Santa Cruz), or rabbit anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) antibody diluted 1/500 (Dako) for 1h30 at 37°C. The specific labeling was revealed by using Alexa Fluor 555-coupled anti-rabbit, and Alexa Fluor 488-coupled anti-mouse (Molecular Probes) secondary antibodies for 45 min at 37°C. Cell nuclei were stained with DAPI.

For immunohistology, sections (7 µm) were cut from frozen murine brains, fixed in 90% cold acetone for 10 min and rehydrated in PBS for 10 min. Sections were then incubated for 30 min with Fc Receptor blocker agent (Innovex Biosciences). Aspecific binding sites were blocked with PBS/BSA 3% before incubation with rabbit polyclonal anti-CD3 antibody (Dako), rat monoclonal anti-CD19 antibody (Serotec), or rat F4/80-specific antibody for 1h30 at 37°C. The specific labeling was revealed by using Alexa Fluor 488-coupled anti-rabbit, and Alexa Fluor 546-coupled anti-rat (Molecular Probes) secondary antibodies for 45 min at 37°C. Cell nuclei were stained with DAPI. All slides were observed using Axiovert 200M microscope (Zeiss) and analyzed with the Axiovision software (Zeiss).

### *Luciferase assay*

Stably transfected HEK cells expressing hTLR9 and the luciferase reporter gene were seeded in 96-well plates at a density of  $4 \cdot 10^4$  cells per well and stimulated with cell-free ultra-centrifuged HHV-6A, HHV-6B or UV-inactivated virus at MOI 0.5, 1 and 2, in triplicate. Non-stimulated, mock-stimulated, CpG-stimulated controls were added and an additional control with TLR9 antagonist ODN 2088 (Invivogen) treatment was performed during HHV-6A stimulation. Cell lysates were assayed for luciferase activity using a luciferase report assay system (Promega). For each experiment, luminescence intensity values were compared to the non-stimulated controls.

### *Statistical analyses*

Data were analyzed for statistical significance using the Mann-Whitney non-parametric *U* test. Results were considered significant when the p-value was under 0.05. \*:  $p \leq 0.05$ ; \*\*:  $p \leq 0.01$ ; NS: non-significant.

## **Results**

### *Infection of CD46-transfected murine lymphocyte lines with HHV-6*

To analyze the infection of murine cells by HHV-6, we initially compared the permissiveness of the murine B-lymphoblastic cell line M12, stably expressing human CD46 (M12-CD46), with two human T-lymphoid cell lines HSB2 and MOLT3, both of which allow productive infection by HHV-6A and/or -6B. Cells were infected with either HHV-6A or HHV-6B at MOI 1 and the production of viral mRNA was followed by RT-qPCR during 3 days post infection (p.i.) (Figure 1). HHV-6A infection resulted in an increase in the mRNA expression of the early gene U79 24h after infection only in CD46-expressing murine lymphocytes, but not in parental M12 cells. The level of mRNA production 24h p.i. in M12-CD46 cells was close to the level observed in infected human HSB2 and MOLT3 lymphocytes and slowly decreased in the next 2 days p.i. (Figure 1A). Similarly to the expression of the U79 gene, we observed the transcription of immediate early gene U94 and late U100 gene as well (Figure S1). Levels of all three HHV-6 transcripts slowly decreased during 5 days of culture following cell division (data not shown). In the case of HHV-6B infection, viral RNA was found in M12-CD46 cells only 24h p.i. and was not detectable afterwards in murine cells (Figure 1B). In human lymphocyte lines HHV-6B U79 gene transcription highly increased only in the MOLT3 cell line, classically used for the production of this strain, while it decreased with time in the other human cell line HSB2. We then analyzed the production of HHV-6 DNA in infected cells. As shown in Figure 1C and D, although genomic DNA levels increased in both infected human cell lines, this was not observed with murine cells. To determine whether detected HHV-6A mRNA is produced in infected CD46-M12 cells or may present a carryover from the initial virus used for the infection, we pretreated cells with actinomycin D for 1h to block new RNA synthesis after infection and quantified 8h p.i. the early gene U79, which requires protein synthesis for expression [52]. As shown in figure 1E, this treatment completely

blocked the production of HHV-6A mRNA in both murine and human cells, while it decreased only moderately the level of abundantly expressed house-keeping gene GAPDH mRNA in these cells.

Altogether, these results suggest that HHV-6A could enter in CD46-expressing murine lymphocytes and start RNA transcription, although later stages of productive infection were not observed.

#### *Infection of murine primary brain glial cultures with HHV-6*

As HHV-6 is known to be neurotropic in humans, and to infect both human astrocytes and oligodendrocytes [21–24], we next analyzed the permissiveness of primary brain glial cultures obtained from either CD46 transgenic mice or littermate controls to HHV-6 infection (Figure 2). These cultures contain primary astrocytes and to a lesser extent oligodendrocytes and microglial cells (data not shown). While in CD46 transgenic cultures HHV-6A infection resulted in mRNA transcription of both early U79 gene (Figure 2A), immediate early U94 gene and late U100 gene (Figure S2A and B), HHV-6B infection did not give any important difference between basal level of mRNA expression observed with wild-type brain cultures and CD46-transgenic cultures (Figure 2B). Finally, neither HHV-6A nor B infection resulted with the increase of viral DNA levels in any of murine cultures analyzed (Figure 2 C and D) and CPE in terms of syncytia formation was not observed during 2 weeks p.i. in these experimental conditions. As IFN type 1 (IFN-I) is important for the control of viral infections in the early stages [49,53], we prepared primary brain cultures from either mice deficient for the expression of IFN-I receptor (IFNAR KO mice) or CD46-transgenic mice crossed into IFNAR KO background. Surprisingly, HHV-6A infection resulted in similar patterns of production of U79, U94 and U100 mRNA (Figure S2C-E) and the absence of formation of syncytia (not shown) in both IFN-I competent and deficient cultures, suggesting that limitations in the progression towards later stages of infection were independent of IFN type I signaling.

Several studies on human glial cells have suggested that cocultures with productively infected lymphocytes could increase the efficiency of the infection [21,26,38]. To analyze whether infection could also be increased in murine cells during a continuous contact with

cells producing infectious virus, primary brain cultures were overlaid with HHV-6A-infected HSB2 cells. Indeed, the formation of syncytia was observed after 2-3 days of coculture and increased with time in CD46 expressing but also in wild-type brain cultures (Figure 3A-D), suggesting that fusion of murine glial cells during coculture may occur in the absence of CD46. Syncytia-forming cells were positive for the astrocyte marker GFAP and HHV-6 early antigen p41 was detected in the nuclei (Figure 3E-I), as well as in other GFAP positive cells (not shown). These results suggested that astrocytes can be infected by HHV-6A and form syncytia when they are in contact with infected human lymphocytes, indicating thus that HHV-6A infection could progress in primary murine cells if adequate conditions are provided. The production of viral particles by murine cells could not be analyzed in this experimental set up, due to the presence of HSB2-derived virions in the culture.

#### *Infection of CD46 transgenic mice with HHV-6*

CD46 cytoplasmic tails, CD46-cyt1 (short) or CD46-cyt2 (long), were shown to exhibit opposite roles in the control of inflammatory response, cyt1 having anti-inflammatory activities and cyt2 rather proinflammatory effects [17]. Although most of the cells express both types of CD46 cytoplasmic tails, cyt2 is preferentially expressed in the human brain [54]. Transgenic mice expressing either one or the other CD46 isoform in the brain may therefore have differential susceptibility to the infection and to potential viral neuroinflammatory effects. We thus analyzed the susceptibility of several lines of CD46 transgenic mice, expressing different cytoplasmic domains of CD46 or being crossed into IFNAR KO background, to the infection with both HHV-6A and 6B (Figure 4, S3). In order to target both brain tissue and the periphery, mice were first inoculated i.c. with  $10^5$  TCID<sub>50</sub> of HHV-6A or HHV-6B and one week later received i.p. injection of either HHV-6A-infected HSB2 cells or HHV-6B-infected MOLT3 cells. Mice were followed during 8 weeks, however visible clinical signs potentially related to the infection were not observed. Brains and spleens were taken in different time periods and analyzed by qPCR for the presence of HHV-6 DNA and mRNA. Although virus-specific RNA was not detected in organs from infected mice, viral DNA was regularly found in brains of all HHV-6A-infected CD46 transgenic mice (Figure 4A). While HHV-6A DNA was detected in brain of nontransgenic mice only 1 week

p.i., in CD46 transgenic mice DNA level was significantly higher starting with 2 weeks p.i. and DNA persisted in the brain for up to 9 months after infection.

In agreement with the results obtained *in vitro*, HHV-6B infection did not result in significant augmentation of HHV-6 DNA in CD46 transgenic brains, compared to nontransgenic and was observed principally by 2 weeks after infection (Figure 4B). Interestingly, neither HHV-6A nor B infection resulted in important changes in DNA levels in the spleen of CD46 transgenic mice, where low levels were only occasionally detected in both transgenic and wild type mice (Figure S3). Furthermore, similarly to what was observed with primary brain cultures, the absence of a functional IFN type I system did not significantly change the pattern of HHV-6A infection in the brain, although HHV-6B infection persisted longer in IFNAR KO background, without any visible difference between CD46 transgenic and nontransgenic mice (Figure S4 A, B). As genetic background was found to play a role in the susceptibility of mice to herpesvirus infection [55], CD46 transgenic mice crossed into Balb/c background were analyzed as well. The HHV-6A infection resulted in increased DNA levels, comparable to what was observed in the brain the other CD46 lines, in C57BL/6 genetic background (Figure S4C), without any clinical sign of disease. Altogether, these results argue for the necessity of CD46 expression for persistence of HHV-6A DNA in the brain of infected mice, irrespectively of the expressed CD46 isoform and IFN type I signaling.

We then analyzed the production of HHV-6 specific antibodies in the serum of infected mice using a specific ELISA. Blood was taken at different time periods p.i. and antibody titers were followed up to 3 months after infection. As shown in figure 4C, virus-specific antibodies were regularly detected in all infected mice. The levels of HHV-6-specific IgG were generally higher in CD46 transgenic than in wild-type mice, with a peak of production observed at 8 weeks p.i. These results demonstrate the development of an HHV-6-specific humoral immune response in infected animals and prompted us to further analyze a potential involvement of the cellular component of the immune response and the presence of infiltrating lymphocytes in the brain of infected mice.

To study whether HHV-6A could induce any neuropathology, we then performed immunohistology analyses on brain sections. CD46 transgenic and wild type mice were

injected i.c. with  $10^5$  TCID<sub>50</sub> of purified HHV-6A. Three weeks after infection, mice were perfused and brains were analyzed for the presence of CD3<sup>+</sup> T lymphocytes, CD19<sup>+</sup> B lymphocytes and F4/80<sup>+</sup> macrophages (Figure 5). Both CD3<sup>+</sup> and CD19<sup>+</sup> infiltrates were regularly found in infected CD46 transgenic mice, but were absent or detected at a very low frequency in infected wild-type and non-infected mice. Finally, F4/80 staining was observed in both infected and non-infected brains, although F4/80<sup>+</sup> cells were more frequent in the brain of infected CD46 transgenic mice. These results suggested that HHV-6A infection results in lymphocyte infiltration in the brain and encouraged us to further investigate the mechanisms which may be involved in that recruitment.

#### *Modulation of chemokine secretion in murine primary brain glial cells*

As chemokines play a critical role in the recruitment of inflammatory cells, we next analyzed whether HHV-6A infection could modulate the production of different chemokines in primary murine brain glial cell cultures. Cells were infected with HHV-6A and analyzed initially for the production of two chemokines, CCL2 and CCL5, known for their chemoattractant properties on monocytes/macrophages and lymphocytes and their involvement in neuroinflammatory processes. HHV-6A infection of primary brain cultures resulted in an important increase of both CCL2 and CCL5 mRNA production at 24h p.i (Figure 6A). Interestingly, UV-irradiated virus increased the chemokine production as well, although to a lesser extent than infectious virus. In addition, HHV-6A did not require IFN type I signaling to induce CCL5 production as demonstrated in primary cultures derived for IFNAR KO mice (Figure S5). To obtain a more global view of chemokines affected by HHV-6A infection in brain cells, we performed an analysis of the production of 40 different cytokines, using proteome profiler array (Figure 6B). This approach allowed us to confirm the secretion of CCL2 and CCL5 in the supernatant of primary brain cultures 48h p.i. and, in addition, revealed the production of number of other chemokines, including CXCL10, CXCL1, TIMP1, M-CSF, CCL3, CCL4, and IL-1RA. Finally, we analyzed the production of CCL5 mRNA in HHV-6A infected murine brains (Figure 6C). Two weeks after infection, the level of CCL5 transcripts was significantly increased in the brains of CD46 transgenic mice, compared to noninfected controls. An increase of CCL5 was observed also in infected wild-type mice, although not

significantly different, compared to control mice. Altogether, these results suggest that HHV-6A infection induces the production of a panel of chemokines and that the mechanisms of this induction may involve both infectious and non-infectious components present in UV-inactivated HHV-6 particles.

#### *HHV-6A-induced chemokine production requires TLR9 signaling*

HHV-6-induced chemokine upregulation was not dependent on the CD46 isoform expressed, as no difference was observed in CCL5 or CCL2 synthesis in primary brain cultures from CD46-cyt1, CD46-cyt2 or CD46ge mice (data not shown). Moreover, engagement of CD46 using anti-CD46 antibody, did not modulate CCL-5 expression (Figure S6), indicating that HHV-6A-induced chemokine activation does not require signaling via CD46.

HHV-6B was previously shown to impair TLR signaling in human dendritic cells (DCs) [56] and to induce the production of IFN- $\lambda$ 1 through toll-like receptor 9 (TLR9) in plasmacytoid DCs (pDCs) [57] and HHV-6A could upregulate TLR9 expression in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes [58]. As murine astrocytes and microglia express TLR9 [59–61], we next analyzed whether HHV-6A-induced secretion of proinflammatory chemokines may require TLR9. Primary murine brain cultures were treated with the TLR9 antagonist ligand ODN 2088 and infected with HHV-6A or UV-inactivated HHV-6A (Figure 7A). Treatment with TLR9 antagonist significantly decreased HHV-6A-induced as well as CpG (natural TLR9 ligand)-induced production of CCL5 and CXCL10. A decrease in CCL2 production was also observed, although not as prominent as with the other two chemokines. Furthermore, the ODN 2088 pretreatment did not affect LPS-induced chemokine increase, which requires the engagement of TLR-4, demonstrating its specificity of action in this experimental system. Finally, to verify whether HHV-6A-induced stimulation of TLR9 is restricted to the murine system, or it may be extended to the human TLR9 as well, we analyzed whether HHV-6 could interact with human TLR9, using HEK cells stably expressing the human TLR9 and the luciferase reporter gene. While HHV-6A induced luciferase expression in a dose-dependent fashion, HHV-6B did not have any effect (Figure 7E). Both infectious and UV-treated HHV-6A were able to interact with TLR9, although the effect of HHV-6A UV was weaker, and ODN 2088 inhibited the stimulatory effect in both cases (Figure 7F). Altogether, these results

strongly suggest that HHV-6A but not HHV-6B could interact with TLR9 and induce consecutively proinflammatory chemokine responses.

## Discussion

A growing number of studies have linked HHV-6 infection to different neurological diseases such as multiple sclerosis, chronic fatigue syndrome and epilepsy [62]. However, host factors that contribute to protective and pathologic immune responses to HHV-6 remain undefined. The development of small animal models is thus of high interest for the study of HHV-6 immunopathogenesis and the analysis of its involvement in neuropathology. Here, we present the first murine model for HHV-6A infection and highlight significant differences between HHV-6A and HHV-6B infection. Our *in vitro* results with both murine lymphoid cell line and primary brain cell cultures suggest that CD46 expression on murine cells can mediate HHV-6A entry in these cells, in agreement with previous studies [13,63]. Although we did not observe cytopathic viral effect nor production of viral particles, *de novo* synthesis of several viral transcripts was detected, including the U79 gene which is considered to be involved in viral DNA replication [52]. This finding thus suggests the start of a replication cycle in murine cells after HHV-6A exposure. The expression of the U94 gene, described as a latency-associated gene [64,65] was observed concomitantly with other early and late genes, which is reminiscent of productive viral infection. However, the absence of consecutive DNA replication in the analyzed cell types suggests rather unproductive infection, possibly due to either the presence of mouse-specific restriction factors or the absence of some human intracellular factors needed for a productive infection. Nevertheless, HHV-6 infection in human cells is not always productive and absence of cytopathic was reported when primary human astrocytes were infected with cell-free virus [38]. Therefore, the non-productive infection observed in these studies may be related to intrinsic characteristics of the infected cell type or potential necessity for prior virus adaptation to murine cells. Finally, when primary murine brain cultures were overlaid with HHV-6A-infected human lymphocytes continuously releasing high quantities of virus, formation of syncytia and production of viral proteins was observed in the murine astrocytes, similarly to what has been observed with human astrocytes in analogous infection

environment [38], suggesting thus permissiveness of murine neural cells to HHV-6A infection when adequate conditions are provided.

*In vivo*, we observed a long-term persistence of HHV-6A DNA in CD46 transgenic mice in contrast to wild type mice. This strongly suggests that HHV-6A is able to infect murine CNS in CD46-dependent manner and to establish a persistent infection without being cleared by the immune system. Absence of detection of viral RNA or protein expression does not contradict it, as the infection in the murine brain may be restricted to some areas or cell types, thus low levels of RNA could be below the level of detection in whole brain extracts, analyzed in our study. Moreover, only three genes were analyzed among the numerous HHV-6 genes which could be expressed. Therefore, we cannot exclude that some other non-tested RNA transcripts, potentially different from those known to be associated to latency in human cells, may be expressed during HHV-6A infection in the brain and could participate in the persistence of HHV-6A. Viral RNA and proteins are very rarely detected in the brain of healthy people harboring HHV-6A DNA without HHV-6-related pathology [6,7,11,66]. Likewise, asymptomatic HHV-6 infection in our model goes along with the absence of virally encoded transcripts and viral antigens. Other models for HHV-6A infection developed in monkeys exhibited very few clinical signs [43]. The recent study by Leibovitch *et al.* described neurological signs including motor weakness and sensory deficits [44]. Although we did not observe any clear limb weakness in mice, some mild neurological symptoms might have been easily missed in murine model.

IFN signaling was shown to be important in numerous neurotropic viral infections, including measles [67], vesicular stomatitis virus [49] or henipavirus [68], and HHV-6A was shown to be sensitive to IFN-I, contrary to HHV-6B, as it is unable to block IFN-I signaling in infected cells [69]. Surprisingly, the susceptibility to HHV-6 infection was not increased in CD46 transgenic mice deficient in IFN-I receptor, suggesting that IFN-I signaling does not seem to play any critical role in the control of HHV-6A infection in mice. It may be possible that adaptive immune system could efficiently control HHV-6 infection, along with the regular production of HHV-6-specific antibodies we have observed in mice. As the absence of virus-specific humoral response seemed to be related to increased viral spreading in the marmoset model [44] and HHV-6 reactivation is most often observed in immunosuppressed

people [8], we could postulate that mice deficient in components of the adaptive immune system could be more susceptible to HHV-6A infection.

The expression of proinflammatory chemokines is critical in the generation of neuroinflammation, as they are key elements for leukocytes recruitment and their passage through the blood-brain barrier. CCL5 (RANTES) was shown to be induced by HHV-6A in human astrocytes, endothelial cells and tonsillar cells [38–40]. Our results in the mouse model are consistent with these data, as HHV-6A also strongly upregulated CCL5 in primary brain cultures, as well as other proinflammatory chemokines, including CCL2, CXCL10 and CXCL1. This suggests that the presence of HHV-6A in the CNS, even in the absence of a productive infection, may trigger the recruitment of several types of immune cells expressing these receptors, such as neutrophils, monocytes/macrophages or lymphocytes. Indeed, we observed the presence of infiltrating T and B-lymphocytes in several CD46 transgenic mice, which further confirms the ability of HHV-6A to induce leucocyte trafficking to the brain. Recently, Hashimoto's thyroiditis has been shown to be associated to HHV-6A infection [70] and it is possible that abundant lymphocyte infiltrates, seen in this disease, may be induced by HHV-6A-stimulated chemokine production, leading to further triggering of the autoimmune response.

Chemokine upregulation, shown in this study, could be achieved with both infectious and inactivated HHV-6A and our results revealed a critical role for TLR9 in the induction of chemokines. Murine as well as human TLR9 was indeed shown to be expressed in microglial cells and astrocytes [59–61,71,72]. Both of these cell types may be responsible for the increase in chemokine secretion in mixed glial cultures. In the murine system, chemokine activation requires both CD46 expression on the surface and signaling through TLR9, which suggest that CD46 probably mediates the capture and internalization of HHV-6A viral particles, thus allowing access of viral DNA to the endosomal compartment containing TLR9. Indeed, CD46 was shown to efficiently internalize opsonized bacteria [73] and to transport measles virus into endosome/lysosome compartment for the efficient major histocompatibility complex class II-restricted presentation in both human [74] and murine cells [75]. Furthermore, our results demonstrate that in addition to the murine TLR9, HHV-6A could stimulate also human TLR9, underlying thus the significance of murine model to study this aspect of HHV-6A pathogenesis. These results may have an important clinical

importance as TLR9 inhibitors could be used to decrease the production of proinflammatory chemokines and thus restrain the neuro-inflammation.

Although CD46 cytoplasmic tails, cyt1 and cyt2 have significant signaling functions [76–78] and were shown to exhibit opposite role in the control inflammatory response [17], we did not find any difference in the susceptibility of CD46 cyt1 and cyt2 transgenic mice to HHV-6 infection, nor in chemokine production from these transgenic lines. These results confirm a predominant role for the CD46 ectodomain in the infection and is in agreement with the available data [63,79], thus excluding the importance of the differential CD46 signaling in HHV-6A persistence in the brain. However, in contrast with HHV-6A infection, CD46 expression did not seem to play any role in the infection by HHV-6B, neither *in vitro* nor *in vivo*, suggesting that CD46 alone could not allow HHV-6B infection in murine cells. Furthermore, HHV-6B did not trigger TLR9 signaling in this system, whereas it was shown to induce IFN $\lambda$ 1 via binding to TLR9 in human pDCs [57]. We could postulate that, like in the murine cells, HHV-6B is not able to enter human HEK cells despite CD46 expression, and could not reach the intracellular compartment where TLR9 is expressed. This would therefore suggest the presence of another receptor for HHV-6B on human pDCs, not expressed on HEK cells. Together with the results obtained with the murine cells, these data cast some serious doubts on the role of CD46 in HHV-6B infection and support previous studies suggesting differential roles for CD46 in HHV-6A and HHV-6B entry [63,80]

Altogether, our results suggest that HHV-6A infection in CD46 transgenic mice can mimic some aspects of human HHV-6 brain infection and help in better understanding of virus-induced neuropathogenesis. Our data support the existence of a relation between HHV-6A residence in the brain and neuroinflammatory processes and are in agreement with recent results obtained with the marmoset model, showing a link between HHV-6A infection and neuropathology [44]. Furthermore, this study provides evidence for a long-term persistence of HHV-6A DNA in the brain of infected mice. As HHV-6A was showed to reside in the human brain as well [3–6], the CD46-transgenic murine model could also provide a useful tool to study the mechanisms involved in HHV-6A persistence in the CNS. The availability of a mouse model is of high interest in the field, as it offers a number of genetic tools for the analysis of the role of different host components in HHV-6 infection, and may

thus open new perspectives in the study of anti-viral immune responses in the brain and of the host factors potentially involved in virus-induced neuroinflammation.

### **Acknowledgments**

The work was supported by grants from INSERM and ARSEP. JR was supported by a doctoral fellowship from the French Ministry of Research. JFJ was a recipient of a fellowship from ARSEP and Finovi. Authors thank Dr. T. Seya for CD46ge transgenic mice, Drs L. Naesens, H. Agut, P. Giraudon, A. Epstein and D. Gerlier for their helpful suggestions or insights and/or providing the reagents for this study, C. Genain for stimulating discussions during the initial stages of the project, N. Goutagny and K. Fitzgerald for HEK-TLR9 cells, I. Grosjean from CelluloNet facility, SFR Biosciences Gerland-Lyon Sud (UMS344/US8), A. Ruiz, M. Chalons and members of the CIRI group “Immunobiology of viral infections” for their help in the achievement of this study.

### **References**

1. Braun DK, Dominguez G, Pellett PE (1997) Human herpesvirus 6. *Clin Microbiol Rev* 10: 521–567.
2. Yamanishi K, Okuno T, Shiraki K, Takahashi M, Kondo T, et al. (1988) Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet* 1: 1065–1067.
3. Luppi M, Barozzi P, Maiorana A, Marasca R, Torelli G (1994) Human herpesvirus 6 infection in normal human brain tissue. *J Infect Dis* 169: 943–944.
4. Chan PK, Ng HK, Hui M, Ip M, Cheung JL, et al. (1999) Presence of human herpesviruses 6, 7, and 8 DNA sequences in normal brain tissue. *J Med Virol* 59: 491–495.
5. Chan PK, Ng HK, Hui M, Cheng AF (2001) Prevalence and distribution of human herpesvirus 6 variants A and B in adult human brain. *J Med Virol* 64: 42–46.
6. Cuomo L, Trivedi P, Cardillo MR, Gagliardi FM, Vecchione A, et al. (2001) Human herpesvirus 6 infection in neoplastic and normal brain tissue. *J Med Virol* 63: 45–51.
7. Opsahl ML, Kennedy PGE (2005) Early and late HHV-6 gene transcripts in multiple sclerosis lesions and normal appearing white matter. *Brain* 128: 516–527.

8. Zerr DM (2006) Human herpesvirus 6 and central nervous system disease in hematopoietic cell transplantation. *J Clin Virol* 37 Suppl 1: S52–56.
9. Soldan SS, Berti R, Salem N, Secchiero P, Flamand L, et al. (1997) Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nat Med* 3: 1394–1397.
10. Chapenko S, Millers A, Nora Z, Logina I, Kukaine R, et al. (2003) Correlation between HHV-6 reactivation and multiple sclerosis disease activity. *J Med Virol* 69: 111–117.
11. Challoner PB, Smith KT, Parker JD, MacLeod DL, Coulter SN, et al. (1995) Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7440–7444.
12. Goodman AD, Mock DJ, Powers JM, Baker JV, Blumberg BM (2003) Human herpesvirus 6 genome and antigen in acute multiple sclerosis lesions. *J Infect Dis* 187: 1365–1376.
13. Santoro F, Kennedy PE, Locatelli G, Malnati MS, Berger EA, et al. (1999) CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell* 99: 817–827.
14. Källström H, Liszewski MK, Atkinson JP, Jonsson AB (1997) Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol* 25: 639–647.
15. Dörig RE, Marcil A, Chopra A, Richardson CD (1993) The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* 75: 295–305.
16. Naniche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F, Wild TF, Rossi B, et al. (1993) Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol* 67: 6025–6032.
17. Marie JC, Astier AL, Rivallier P, Rabourdin-Combe C, Wild TF, et al. (2002) Linking innate and acquired immunity: divergent role of CD46 cytoplasmic domains in T cell induced inflammation. *Nat Immunol* 3: 659–666.
18. Johnstone RW, Loveland BE (1993) Identification and quantification of complement regulator CD46 on normal human tissues. *Immunology* 79: 341–347.
19. Gardell JL, Dazin P, Islar J, Menge T, Genain CP, et al. (2006) Apoptotic effects of Human Herpesvirus-6A on glia and neurons as potential triggers for central nervous system autoimmunity. *J Clin Virol* 37 Suppl 1: S11–16.
20. Ahlqvist J, Fotheringham J, Akhyani N, Yao K, Fogdell-Hahn A, et al. (2005) Differential tropism of human herpesvirus 6 (HHV-6) variants and induction of latency by HHV-6A in oligodendrocytes. *J Neurovirol* 11: 384–394.

21. Albright AV, Lavi E, Black JB, Goldberg S, O'Connor MJ, et al. (1998) The effect of human herpesvirus-6 (HHV-6) on cultured human neural cells: oligodendrocytes and microglia. *J Neurovirol* 4: 486–494.
22. Dietrich J, Blumberg BM, Roshal M, Baker JV, Hurley SD, et al. (2004) Infection with an endemic human herpesvirus disrupts critical glial precursor cell properties. *J Neurosci* 24: 4875–4883.
23. Donati D, Martinelli E, Cassiani-Ingoni R, Ahlqvist J, Hou J, et al. (2005) Variant-specific tropism of human herpesvirus 6 in human astrocytes. *J Virol* 79: 9439–9448.
24. De Filippis L, Foglieni C, Silva S, Vescovi AL, Lusso P, et al. (2006) Differentiated human neural stem cells: a new ex vivo model to study HHV-6 infection of the central nervous system. *J Clin Virol* 37 Suppl 1: S27–32.
25. Gu B, Zhang G-F, Li L-Y, Zhou F, Feng D-J, et al. (2011) Human herpesvirus 6A induces apoptosis of primary human fetal astrocytes via both caspase-dependent and -independent pathways. *Virol J* 8: 530.
26. He J, McCarthy M, Zhou Y, Chandran B, Wood C (1996) Infection of primary human fetal astrocytes by human herpesvirus 6. *J Virol* 70: 1296–1300.
27. Flamand L, Gosselin J, Stefanescu I, Ablashi D, Menezes J (1995) Immunosuppressive effect of human herpesvirus 6 on T-cell functions: suppression of interleukin-2 synthesis and cell proliferation. *Blood* 85: 1263–1271.
28. Li L, Gu B, Zhou F, Chi J, Wang F, et al. (2011) Human herpesvirus 6 suppresses T cell proliferation through induction of cell cycle arrest in infected cells in the G2/M phase. *J Virol* 85: 6774–6783.
29. Øster B, Bundgaard B, Höllsberg P (2005) Human herpesvirus 6B induces cell cycle arrest concomitant with p53 phosphorylation and accumulation in T cells. *J Virol* 79: 1961–1965.
30. Jaworska J, Gravel A, Fink K, Grandvaux N, Flamand L (2007) Inhibition of transcription of the beta interferon gene by the human herpesvirus 6 immediate-early 1 protein. *J Virol* 81: 5737–5748.
31. Kofod-Olsen E, Ross-Hansen K, Schleimann MH, Jensen DK, Møller JML, et al. (2012) U20 is responsible for human herpesvirus 6B inhibition of tumor necrosis factor receptor-dependent signaling and apoptosis. *J Virol* 86: 11483–11492.
32. Milne RS, Mattick C, Nicholson L, Devaraj P, Alcami A, et al. (2000) RANTES binding and down-regulation by a novel human herpesvirus-6 beta chemokine receptor. *J Immunol* 164: 2396–2404.
33. Mayne M, Cheadle C, Soldan SS, Cermelli C, Yamano Y, et al. (2001) Gene expression profile of herpesvirus-infected T cells obtained using immunomicroarrays: induction of proinflammatory mechanisms. *J Virol* 75: 11641–11650.

34. Kikuta H, Nakane A, Lu H, Taguchi Y, Minagawa T, et al. (1990) Interferon induction by human herpesvirus 6 in human mononuclear cells. *J Infect Dis* 162: 35–38.
35. Flamand L, Stefanescu I, Menezes J (1996) Human herpesvirus-6 enhances natural killer cell cytotoxicity via IL-15. *J Clin Invest* 97: 1373–1381.
36. Arena A, Liberto MC, Capozza AB, Focà A (1997) Productive HHV-6 infection in differentiated U937 cells: role of TNF alpha in regulation of HHV-6. *New Microbiol* 20: 13–20.
37. Inagi R, Guntapong R, Nakao M, Ishino Y, Kawanishi K, et al. (1996) Human herpesvirus 6 induces IL-8 gene expression in human hepatoma cell line, Hep G2. *J Med Virol* 49: 34–40.
38. Meeuwsen S, Persoon-Deen C, Bsibsi M, Bajramovic JJ, Ravid R, et al. (2005) Modulation of the cytokine network in human adult astrocytes by human herpesvirus-6A. *J Neuroimmunol* 164: 37–47.
39. Caruso A, Rotola A, Comar M, Favilli F, Galvan M, et al. (2002) HHV-6 infects human aortic and heart microvascular endothelial cells, increasing their ability to secrete proinflammatory chemokines. *J Med Virol* 67: 528–533.
40. Grivel J-C, Santoro F, Chen S, Fagá G, Malnati MS, et al. (2003) Pathogenic effects of human herpesvirus 6 in human lymphoid tissue ex vivo. *J Virol* 77: 8280–8289.
41. Arbuckle JH, Medveczky PG (2011) The molecular biology of human herpesvirus-6 latency and telomere integration. *Microbes Infect* 13: 731–741.
42. Yalcin S, Mukai T, Kondo K, Ami Y, Okawa T, et al. (1992) Experimental infection of cynomolgus and African green monkeys with human herpesvirus 6. *J Gen Virol* 73 ( Pt 7): 1673–1677.
43. Lusso P, Crowley RW, Malnati MS, Di Serio C, Ponzoni M, et al. (2007) Human herpesvirus 6A accelerates AIDS progression in macaques. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 5067–5072.
44. Leibovitch E, Wohler JE, Cummings Macri SM, Motanic K, Harberts E, et al. (2013) Novel marmoset (*Callithrix jacchus*) model of human Herpesvirus 6A and 6B infections: immunologic, virologic and radiologic characterization. *PLoS Pathog* 9: e1003138.
45. Lusso P (1996) Human herpesvirus 6 (HHV-6). *Antiviral Res* 31: 1–21.
46. Tsujimura A, Shida K, Kitamura M, Nomura M, Takeda J, et al. (1998) Molecular cloning of a murine homologue of membrane cofactor protein (CD46): preferential expression in testicular germ cells. *Biochem J* 330 ( Pt 1): 163–168.
47. Gobbi A, Stoddart CA, Malnati MS, Locatelli G, Santoro F, et al. (1999) Human herpesvirus 6 (HHV-6) causes severe thymocyte depletion in SCID-hu Thy/Liv mice. *J Exp Med* 189: 1953–1960.

48. Shingai M, Inoue N, Okuno T, Okabe M, Akazawa T, et al. (2005) Wild-type measles virus infection in human CD46/CD150-transgenic mice: CD11c-positive dendritic cells establish systemic viral infection. *J Immunol* 175: 3252–3261.
49. Müller U, Steinhoff U, Reis LF, Hemmi S, Pavlovic J, et al. (1994) Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264: 1918–1921.
50. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45.
51. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, et al. (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55: 611–622.
52. Taniguchi T, Shimamoto T, Isegawa Y, Kondo K, Yamanishi K (2000) Structure of transcripts and proteins encoded by U79-80 of human herpesvirus 6 and its subcellular localization in infected cells. *Virology* 271: 307–320.
53. Katze MG, He Y, Gale M Jr (2002) Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol* 2: 675–687.
54. Johnstone RW, Russell SM, Loveland BE, McKenzie IF (1993) Polymorphic expression of CD46 protein isoforms due to tissue-specific RNA splicing. *Mol Immunol* 30: 1231–1241.
55. Lopez C (1975) Genetics of natural resistance to herpesvirus infections in mice. *Nature* 258: 152–153.
56. Murakami Y, Tanimoto K, Fujiwara H, An J, Suemori K, et al. (2010) Human herpesvirus 6 infection impairs Toll-like receptor signaling. *Virology* 422: 92–98.
57. Nordström I, Eriksson K (2012) HHV-6B Induces IFN-Lambda1 Responses in Cord Plasmacytoid Dendritic Cells through TLR9. *PLoS ONE* 7: e38683.
58. Chi J, Wang F, Li L, Feng D, Qin J, et al. (2012) The role of MAPK in CD4(+) T cells toll-like receptor 9-mediated signaling following HHV-6 infection. *Virology* 422: 92–98.
59. Bowman CC, Rasley A, Tranguch SL, Marriott I (2003) Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. *Glia* 43: 281–291.
60. McKimmie CS, Fazakerley JK (2005) In response to pathogens, glial cells dynamically and differentially regulate Toll-like receptor gene expression. *J Neuroimmunol* 169: 116–125.
61. El-Hage N, Podhaizer EM, Sturgill J, Hauser KF (2011) Toll-like receptor expression and activation in astroglia: differential regulation by HIV-1 Tat, gp120, and morphine. *Immunol Invest* 40: 498–522.
62. Yao K, Crawford JR, Komaroff AL, Ablashi DV, Jacobson S (2010) Review part 2: Human herpesvirus-6 in central nervous system diseases. *J Med Virol* 82: 1669–1678.

63. Mori Y, Seya T, Huang HL, Akkapaiboon P, Dhepakson P, et al. (2002) Human herpesvirus 6 variant A but not variant B induces fusion from without in a variety of human cells through a human herpesvirus 6 entry receptor, CD46. *J Virol* 76: 6750–6761.
64. Rotola A, Ravaioli T, Gonelli A, Dewhurst S, Cassai E, et al. (1998) U94 of human herpesvirus 6 is expressed in latently infected peripheral blood mononuclear cells and blocks viral gene expression in transformed lymphocytes in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13911–13916.
65. Caselli E, Bracci A, Galvan M, Boni M, Rotola A, et al. (2006) Human herpesvirus 6 (HHV-6) U94/REP protein inhibits betaherpesvirus replication. *Virology* 346: 402–414.
66. Chi J, Gu B, Zhang C, Peng G, Zhou F, et al. (2012) Human herpesvirus 6 latent infection in patients with glioma. *J Infect Dis* 206: 1394–1398.
67. Mrkic B, Pavlovic J, Rüllicke T, Volpe P, Buchholz CJ, et al. (1998) Measles virus spread and pathogenesis in genetically modified mice. *J Virol* 72: 7420–7427.
68. Dhondt KP, Mathieu C, Chalons M, Reynaud JM, Vallve A, et al. (2013) Type I interferon signaling protects mice from lethal henipavirus infection. *J Infect Dis* 207: 142–151.
69. Jaworska J, Gravel A, Flamand L (2010) Divergent susceptibilities of human herpesvirus 6 variants to type I interferons. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 8369–8374.
70. Caselli E, Zatelli MC, Rizzo R, Benedetti S, Martorelli D, et al. (2012) Virologic and immunologic evidence supporting an association between HHV-6 and Hashimoto's thyroiditis. *PLoS Pathog* 8: e1002951.
71. Jack CS, Arbour N, Manusow J, Montgrain V, Blain M, et al. (2005) TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *J Immunol* 175: 4320–4330.
72. Carpentier PA, Begolka WS, Olson JK, Elhofy A, Karpus WJ, et al. (2005) Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli. *Glia* 49: 360–374.
73. Li K, Feito MJ, Sacks SH, Sheerin NS (2006) CD46 (membrane cofactor protein) acts as a human epithelial cell receptor for internalization of opsonized uropathogenic *Escherichia coli*. *J Immunol* 177: 2543–2551.
74. Gerlier D, Trescol-Biémont MC, Varior-Krishnan G, Naniche D, Fugier-Vivier I, et al. (1994) Efficient MHC class II-restricted presentation of measles virus to T cells relies on its targeting to its cellular receptor human CD46 and involves an endosomal pathway. *Cell Biol Int* 18: 315–320.
75. Rivaller P, Trescol-Biémont MC, Gimenez C, Rabourdin-Combe C, Horvat B (1998) Enhanced MHC class II-restricted presentation of measles virus (MV) hemagglutinin in transgenic mice expressing human MV receptor CD46. *Eur J Immunol* 28: 1301–1314.

76. Wang G, Liszewski MK, Chan AC, Atkinson JP (2000) Membrane cofactor protein (MCP; CD46): isoform-specific tyrosine phosphorylation. *J Immunol* 164: 1839–1846.
77. Zaffran Y, Destaing O, Roux A, Ory S, Nheu T, et al. (2001) CD46/CD3 costimulation induces morphological changes of human T cells and activation of Vav, Rac, and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase. *J Immunol* 167: 6780–6785.
78. Ludford-Menting MJ, Thomas SJ, Crimeen B, Harris LJ, Loveland BE, et al. (2002) A functional interaction between CD46 and DLG4: a role for DLG4 in epithelial polarization. *J Biol Chem* 277: 4477–4484.
79. Greenstone HL, Santoro F, Lusso P, Berger EA (2002) Human Herpesvirus 6 and Measles Virus Employ Distinct CD46 Domains for Receptor Function. *J Biol Chem* 277: 39112–39118.
80. Mori Y, Akkapaiboon P, Yonemoto S, Koike M, Takemoto M, et al. (2004) Discovery of a second form of tripartite complex containing gH-gL of human herpesvirus 6 and observations on CD46. *J Virol* 78: 4609–4616.

## Figure Legends

**Figure 1. HHV-6 infection of murine and human lymphoid cell lines.** Murine lymphoid M12 cells, stably expressing the human protein CD46 (M12-CD46), parental M12 cell line and human T cell lines HSB2 and MOLT3 were infected with HHV-6A (A, C) or HHV-6B (B, D) at MOI 1. (A, B) mRNA levels of the viral gene U79 were determined using RT-qPCR and expressed relative to murine GAPDH (M12 and M12-CD46) or to human GAPDH (HSB2 and MOLT3). (C, D) Genomic DNA levels of the viral gene U41 were determined using qPCR and means and standard deviations of two independent experiments are presented. (E) Before infection with HHV-6A, M12, M12-CD46 and HSB2 cells were treated with actinomycin D (actD) at 5 µg/ml for 1h, or left non-treated (NT). Total RNA was taken at 8h post-infection and U79 mRNA levels were quantified by RT-qPCR. Results are presented as number of copies per µg of total RNA and are representative of two independent experiments. Dotted lines represent the limit of detection of the qPCR system.

**Figure 2. HHV-6 infection of murine primary glial brain cultures.** Primary glial brain cultures were generated from wild type mice (grey bars) or from CD46-transgenic mice (black bars),

and infected with HHV-6A (A, C) or HHV-6B (B, D) at an approximate MOI of 0,5. (A, B) mRNA levels of the viral gene U79 were determined at 1, 2 and 5 days p.i. using RT-qPCR. Means and standard errors of five (A) or two (B) independent experiments are plotted. Dotted lines represent the limit of detection of the quantitative PCR system. (C, D) Genomic DNA levels of the viral gene U41 in HHV-6-infected cultures were determined by qPCR. Means and standard errors of three independent experiments are presented.

**Figure 3. Infection of primary murine glial brain cultures overlaid with HHV-6A-infected HSB2 lymphocytes.** Primary murine brain glial cells obtained from wild type (A, C) or CD46-transgenic (B, D) mice were cocultured with HHV-6A-infected (C, D) or non-infected (A, B) HSB2 cells. Cocultures were followed for 2 weeks and the formation of syncytia (arrows) was observed in glial cells from both wild type and CD46 transgenic mice. Images of cells after 12 days of coculture are presented. (E-I) Primary murine glial cells cultured on coverslips were stained by immunofluorescence after coculture with HHV-6A-infected HSB2 cells. Medium and non-adherent HSB2 cells were removed before staining. Murine glial cells were fixed in cold acetone and stained for the astrocytic marker GFAP (red) and the viral early antigen p41 (green). Cell nuclei were stained with DAPI (blue).

**Figure 4. *In vivo* infection with HHV-6A or HHV-6B in different CD46-transgenic mouse lines.** CD46-cyt1, CD46-cyt2, CD46ge mice or wild type littermates received i.c. injection of HHV-6A (A, C) or HHV-6B (B), followed 1 week later by i.p. injection of HHV-6A-infected HSB2 cells or HHV-6B-infected MOLT3 cells, respectively. (A, B) Brains were taken at different time points after i.p. injection. Levels of genomic viral DNA were determined by qPCR with primers specific for the viral gene U41. Each group contained 4 to 9 mice (ND: not done). Dotted lines represent the limit of detection of the quantitative PCR method. Increase in viral loads in comparison to wild type control mice were analyzed using the Mann-Whitney statistical test (\*:  $p \leq 0,05$  ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ). (C) Serum from CD46 transgenic and wild type mice, inoculated with HHV-6A or mock solution, was collected before and after virus administration every two weeks for twelve weeks. HHV-6-specific IgG were detected by ELISA and expressed in arbitrary units (AU). Means and standard errors are plotted.

**Figure 5. Lymphocyte infiltration in the brain of HHV-6A-infected mice.** CD46ge mice and wild type mice received an i.c. injection of HHV-6A in the right brain hemisphere. Three weeks after infection, mice were perfused with PBS and brains were taken and frozen. 7  $\mu$ m-thick sections from the left brain hemisphere were fixed with cold acetone and analyzed by immunofluorescence using the following sets of antibodies. (A) Rabbit anti-CD3 and AlexaFluor488-coupled secondary antibody (green); (B) Rat anti-CD19 and AlexaFluor546-coupled secondary antibody (red). (C) Rat anti-F4/80 and AlexaFluor546-coupled secondary antibody (red). Cell nuclei were stained with DAPI (blue). Sections were observed at x100 magnification. Infiltrates are presented in inserts at higher magnification (x400). Images of the left lateral ventricle (v) area are presented and are representative from 4-5 animals analyzed in each group.

**Figure 6. HHV-6A increases chemokine production in primary brain glial cells from CD46-transgenic mice.** (A, B, C) Primary cultures of wild type or CD46-transgenic mice were either mock-infected, HHV-6A-infected, or inoculated with UV-irradiated HHV-6A. At 24 and 48 hours post-infection, total RNA was analyzed for the expression of CCL5 and CCL2 by RT-qPCR (A). CCL5 and CCL2 mRNA levels were normalized using GAPDH, and ratios relative to mRNA levels of mock-infected controls at 24h post-infection are presented as means and standard errors of 5 independent experiments. (B) Culture supernatants from one representative experiment were collected at 48h post-infection and the secretion of 40 cytokines was analyzed in duplicate using the proteome profiler antibody array. Mean pixel densities and standard deviations of duplicates for those cytokines where differences were observed are presented. (C) Wild type and CD46-expressing mice were injected i.c. with HHV-6A or mock-injected. Two weeks post-infection, CCL5 mRNA expression in the brain was analyzed and presented as means and standard errors.

**Figure 7. Role of TLR9 signaling in the induction of chemokine secretion by HHV-6A.** (A, B, C) Primary cultures of CD46-transgenic mice were inoculated with either UV-inactivated or infectious HHV-6A, or mock-infected. Control stimulations with LPS and CpG were performed

in parallel. During stimulation, cells were treated with the TLR9 antagonist ligand ODN 2088 (black bars) or non-treated (grey bars). CCL5 (A), CXCL10 (B) and CCL2 (C) mRNA expression were analyzed 24h after stimulation. Means and SD of 2 to 4 independent experiments are presented. (E) HEK cells stably expressing human TLR9 and the luciferase reporter construct were stimulated with UV-inactivated or infectious HHV-6A and HHV-6B or MOI 0.5, 1 or 2, in triplicate. Non-stimulated (DMEM), mock-stimulated and CpG-stimulated controls were analyzed in parallel. Means and SEM of three independent experiments are presented. (F) hTLR9-HEK reporter cells were treated with TLR9 antagonist ODN 2088 or non-treated and stimulated with HHV-6A. Luminescence values were expressed relative to the non-stimulated DMEM control. Means and SD of triplicate values from one representative of three independent experiments are plotted.

### Supplementary figures

**Figure S1. HHV-6 Infection of murine and human lymphoid cell lines: analysis of U94 and U100 genes.** Murine lymphoid M12 cells stably expressing the human protein CD46 (M12-CD46), parental M12 cell line and human T cell lines HSB2 and MOLT3 were infected with HHV-6A (A, C) or HHV-6B (B, D) at MOI 1. (A, B) Total RNA was taken at 24, 48 and 72 hours p.i. and mRNA levels of the HHV-6 immediate early gene U94 (A, B) and late gene U100 (C, D) were quantified by RT-qPCR. Dotted lines represent the limit of detection of the qPCR system. Means and standard deviations of two independent experiments are plotted.

**Figure S2. HHV-6 infection of murine primary glial brain cultures.** Primary glial brain cultures were generated from wild type C57BL/6 (A, B, grey bars), CD46-transgenic (A, B, black bars), IFNAR KO (C, D, E, grey bars), or CD46-transgenic IFNAR KO mice (C, D, E, black bars), and infected with HHV-6A. mRNA levels of the viral genes U94 (A, C), U100 (B, D) and U79 (E) were determined at 1, 2 and 5 days p.i. using quantitative PCR and expressed relative to murine GAPDH. Means and standard errors of five (A, B) or two (C, D, E) independent experiments are plotted. \*:  $p \leq 0,05$  ; \*\*:  $p \leq 0,01$ . Dotted lines represent the limit of detection of the qPCR system.

**Figure S3. Viral DNA levels in splenocytes from CD46 transgenic mice after HHV-6A or HHV-6B infection** CD46-cyt1, CD46-cyt2, CD46ge mice or wild type littermates received i.c. injection of HHV-6A (A) or HHV-6B (B), followed 1 week later by i.p. injection of HHV-6A-infected HSB2 cells or HHV-6B-infected MOLT3 cells, respectively. Spleens were taken at different time points p.i. and levels of genomic DNA of the viral gene U41 in splenocytes were determined by qPCR. Each group contained 4 to 9 mice (ND: not done).

**Figure S4. Quantification of the viral DNA in the brain of CD46 transgenic mice in either IFNAR<sup>-/-</sup> or Balb/c background after HHV-6A or HHV-6B infection.** (A, B) CD46-cyt2 transgenic IFNAR KO mice or IFNAR KO littermates were inoculated with either HHV-6A (A) or HHV-6B (B) i.c., followed 1 week later by i.p. injection of HHV-6A-infected HSB2 cells or HHV-6B-infected MOLT3 cells, respectively. Brains were taken at different time points p.i., and the levels of viral DNA were quantified by qPCR. Each group contained 2 to 5 mice. (C) CD46-cyt1 Balb/c mice or non-transgenic littermates were infected with HHV-6A using an identical protocol. Brains were taken two weeks after i.p. injection and the levels of viral DNA were quantified. Limit of detection of the qPCR method is represented by the dashed line.

**Figure S5. HHV-6A enhances chemokine expression in primary brain glial cells from CD46-transgenic IFNAR KO mice.** Primary cultures of IFNAR KO or CD46-transgenic IFNAR KO mice were either mock-infected or HHV-6A-infected. At 24h post-infection, total RNA was analyzed for the expression of CCL5 by RT-qPCR. CCL5 mRNA levels were normalized using GAPDH, and ratios relative to mRNA levels of mock-infected controls are plotted. Means and standard deviations of 2 independent experiments are presented.

**Figure S6. Stimulation with anti-CD46 antibody in primary brain glial cells does not induce CCL5 secretion.** Primary cultures of CD46-transgenic or wild type (WT) mice were inoculated

with HHV-6A, UV-inactivated HHV-6A or mock solution, or stimulated with soluble anti-CD46 antibody (clone Tra-2) at a concentration of 50 µg/ml. At 24h later total RNA was isolated and the expression of CCL5 was quantified by RT-qPCR. CCL5 mRNA levels were normalized using GAPDH, and ratios relative to mRNA levels of mock-infected controls are plotted.

Figures

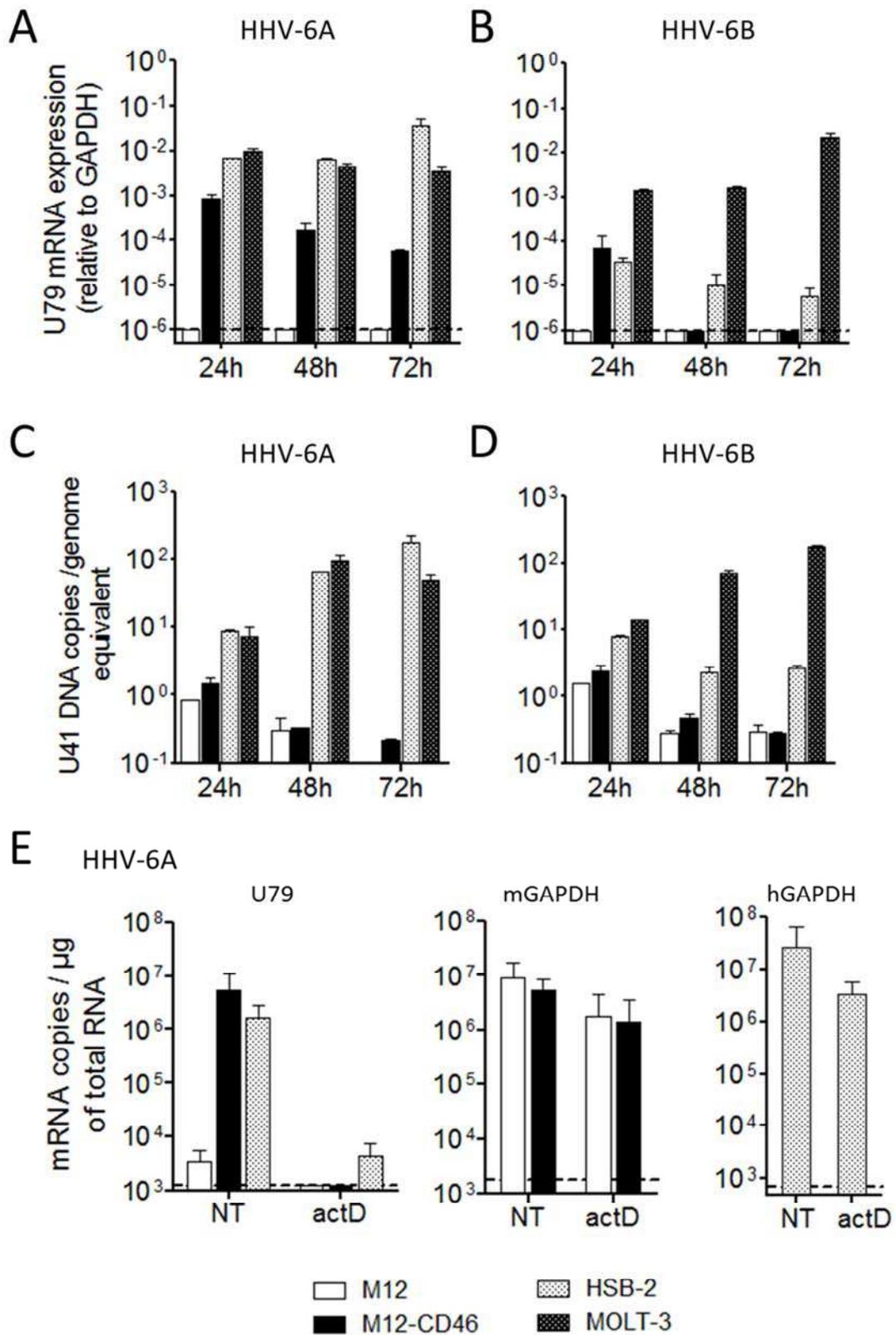


Figure 1

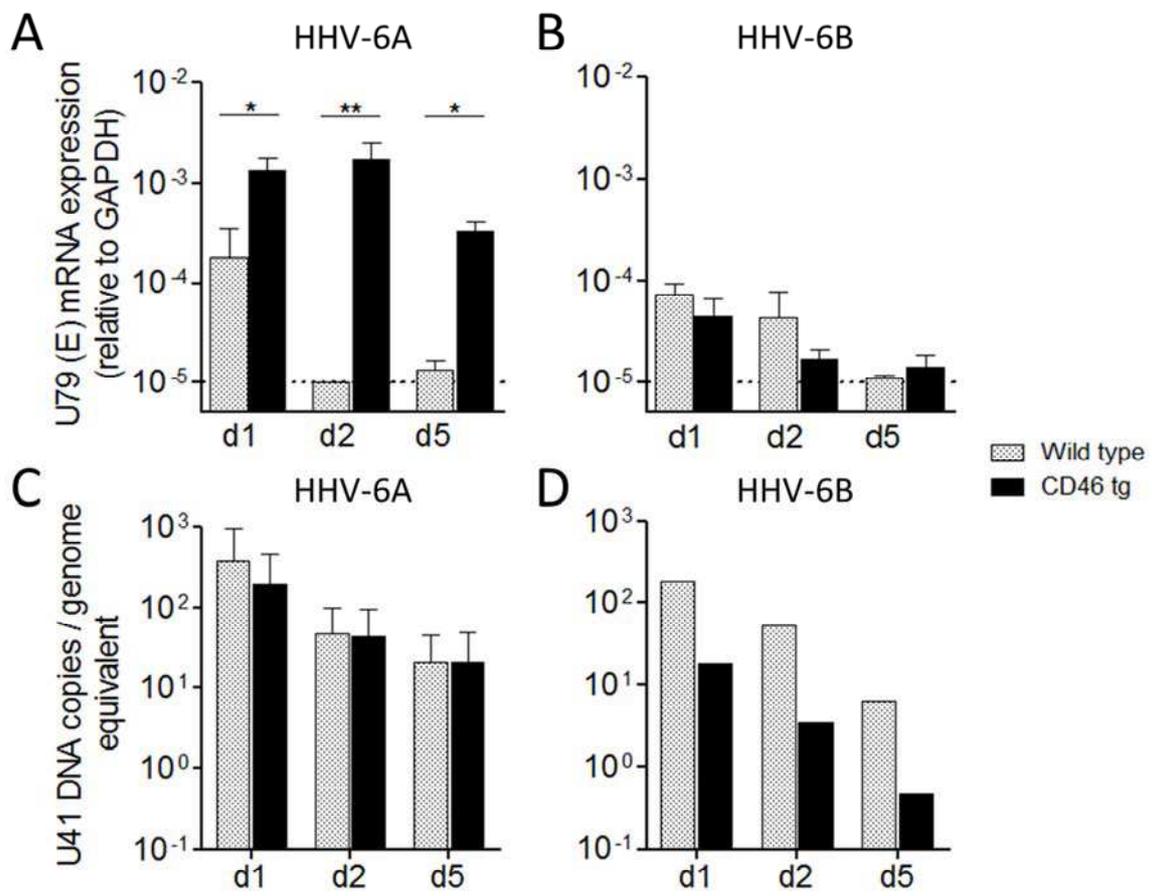


Figure 2

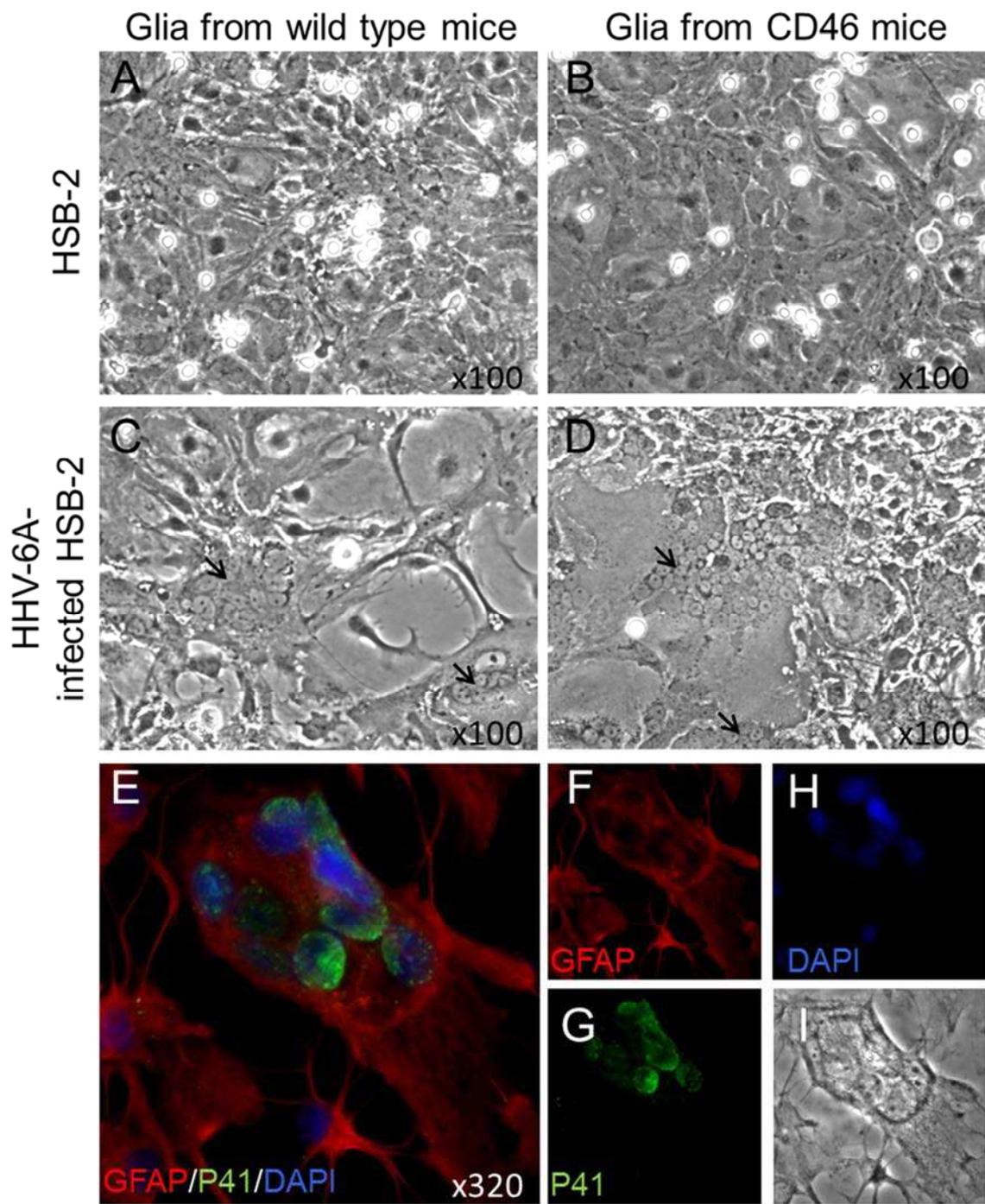


Figure 3

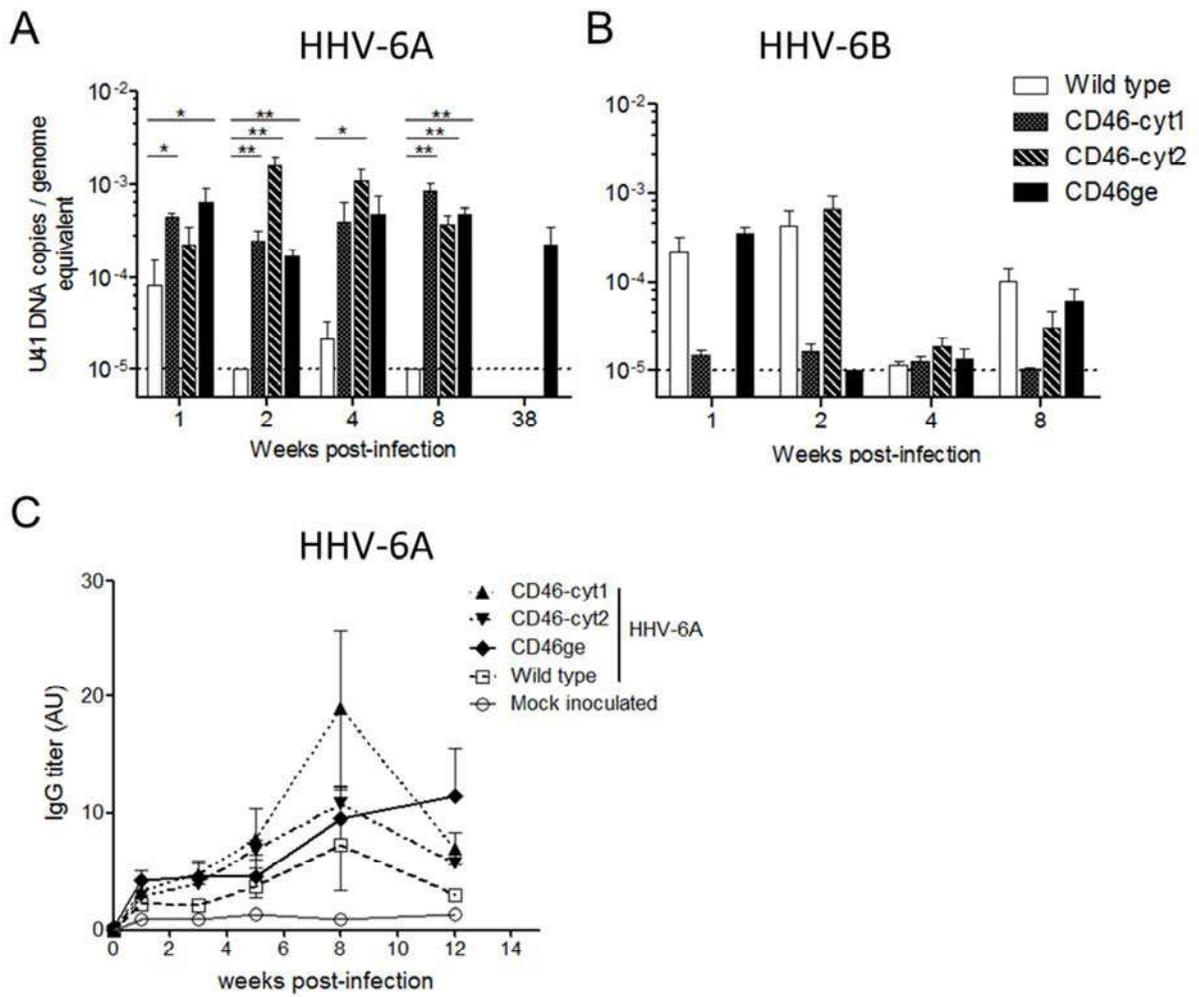
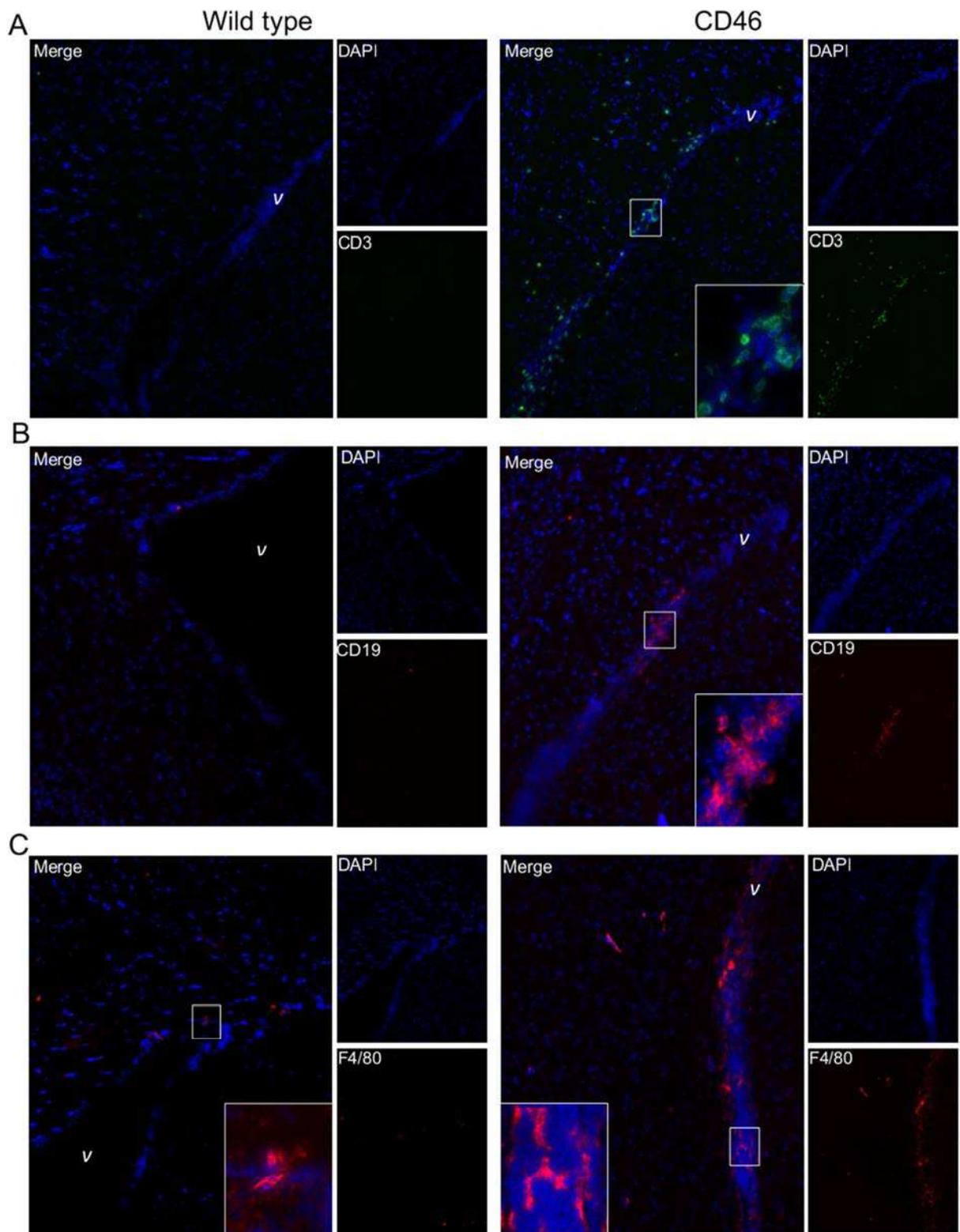


Figure 4



**Figure 5**

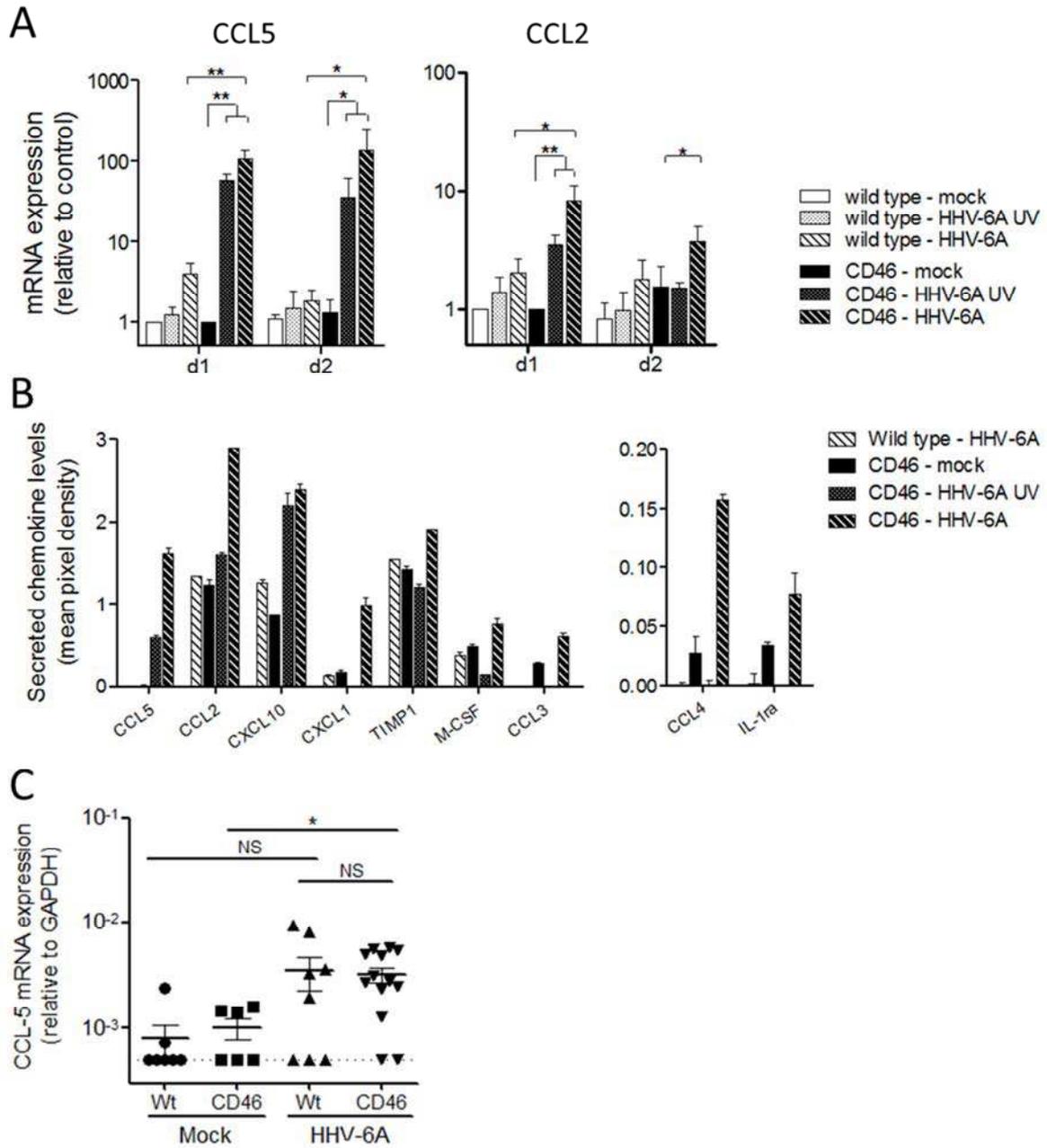


Figure 6

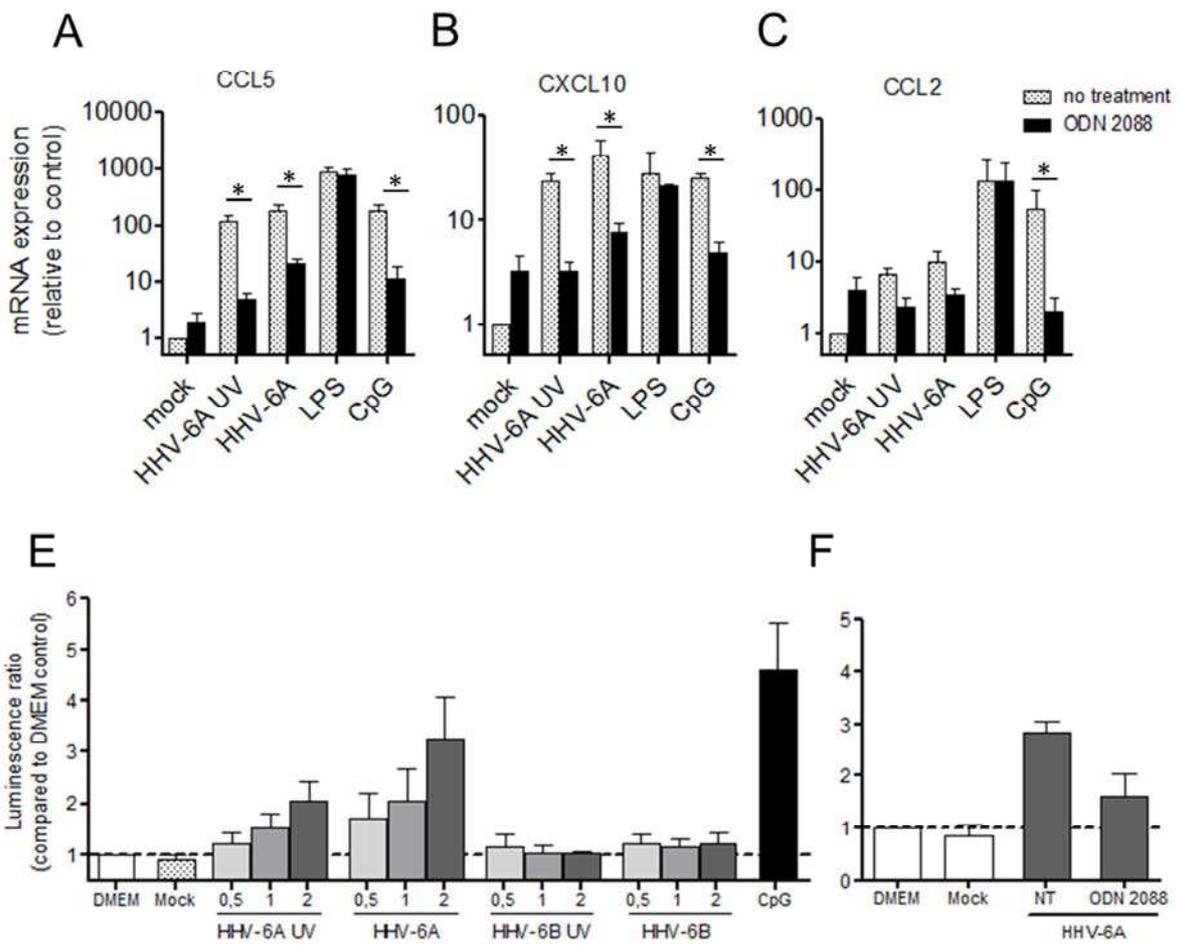


Figure 7

Supplementary figures

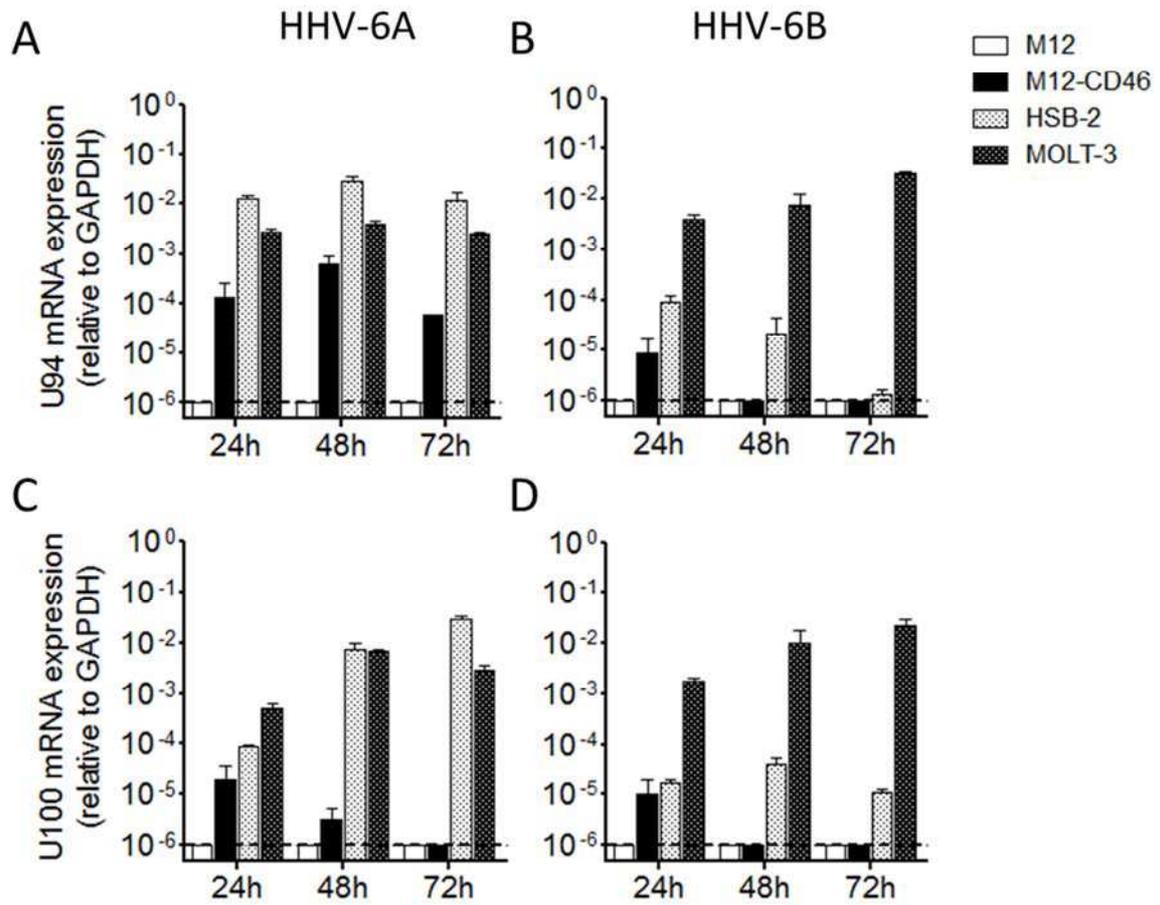
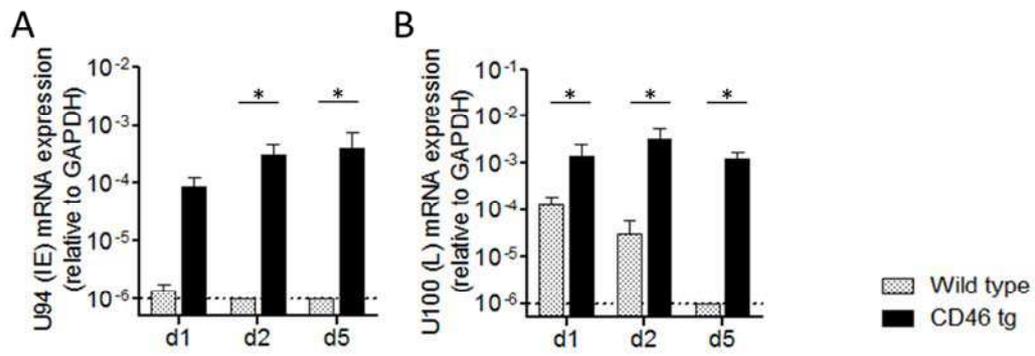


Figure S1

C57BL/6 mice



IFNAR KO mice

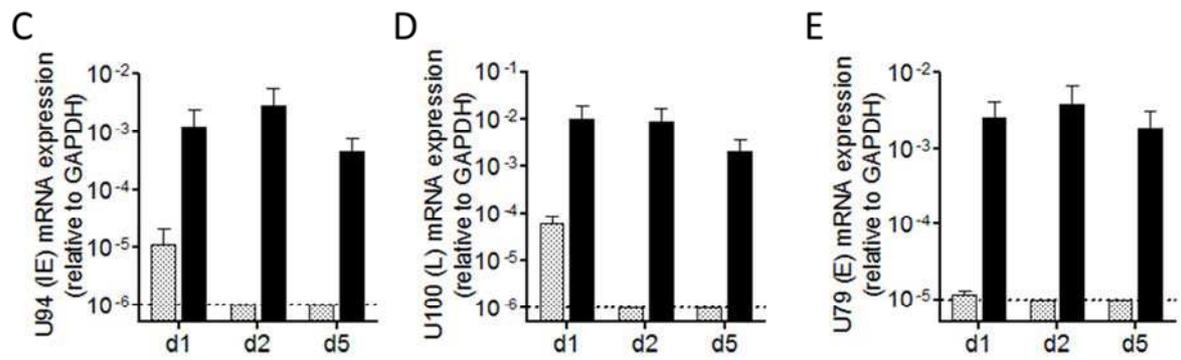


Figure S2

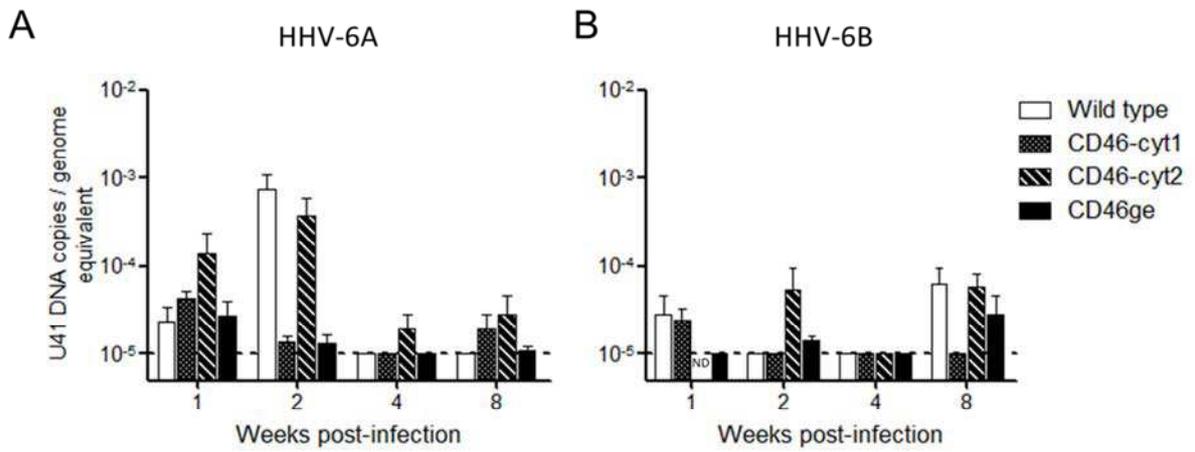


Figure S3

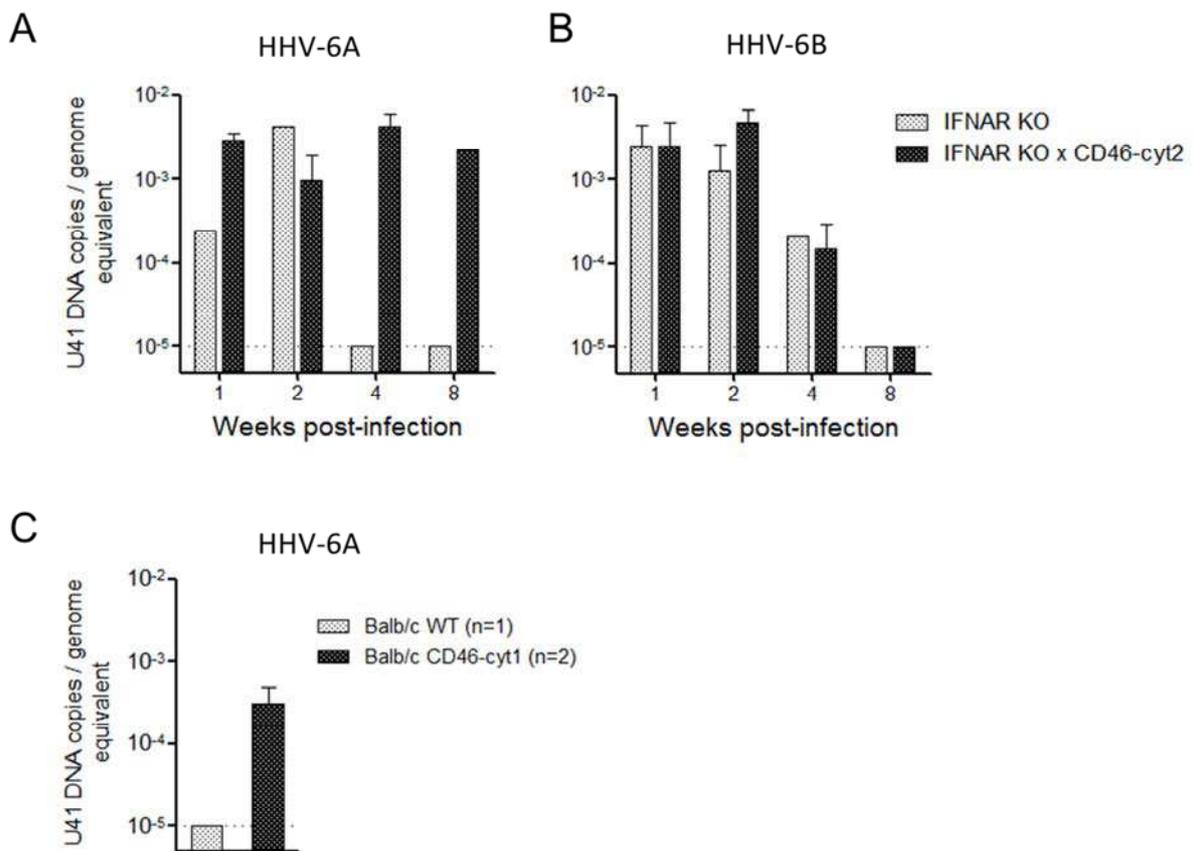


Figure S4

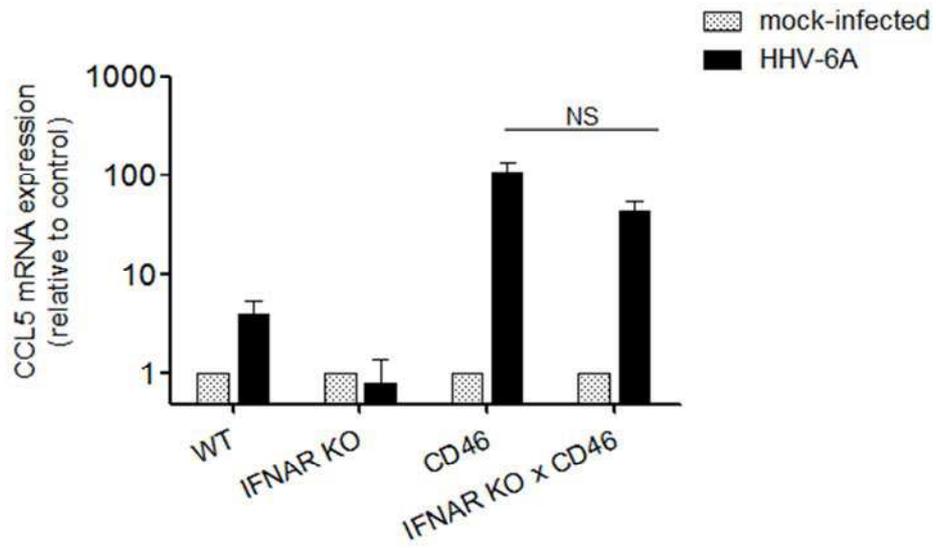


Figure S5

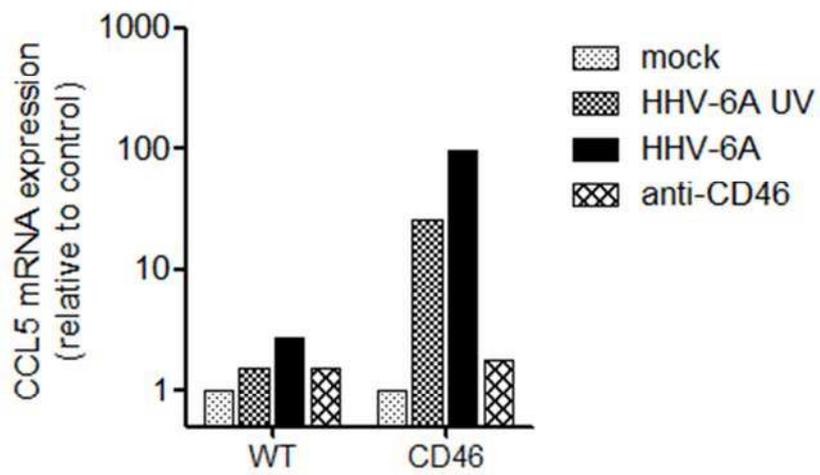
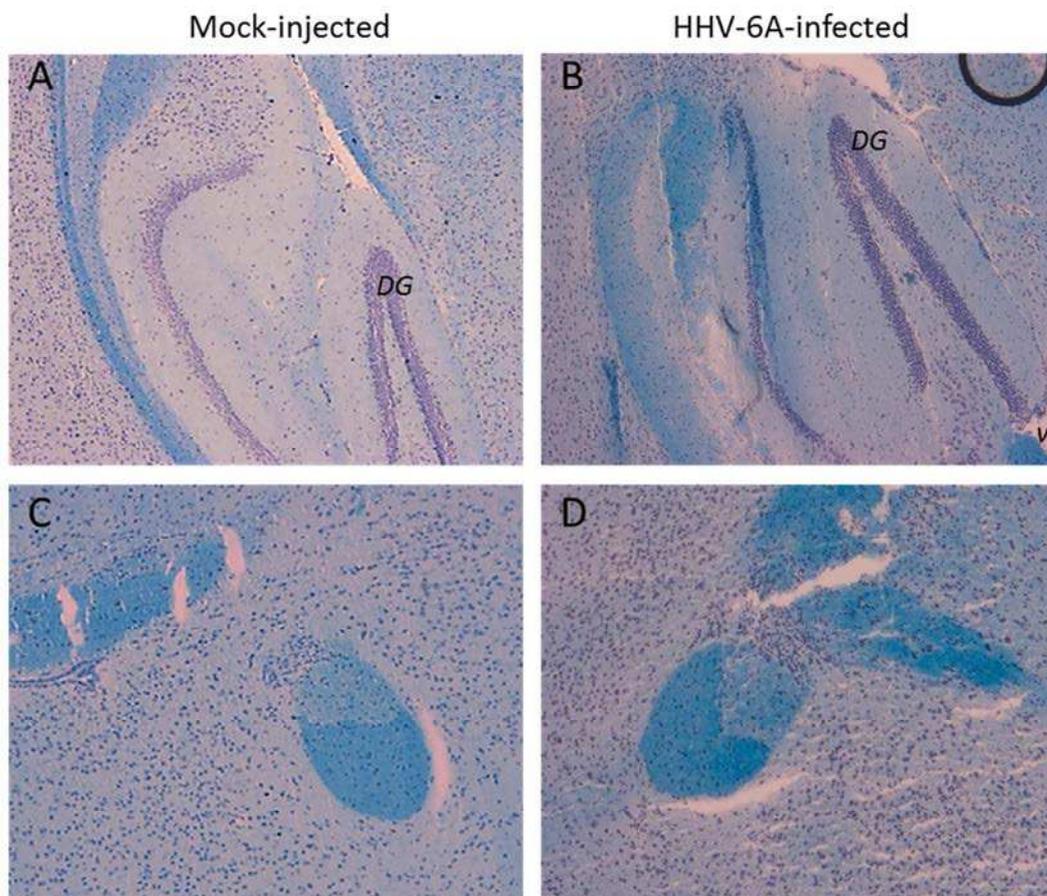


Figure S6

## Résultats supplémentaires

### 1. L'infiltration leucocytaire induite par HHV-6A dans le SNC n'est pas associée à une démyélinisation

Les résultats présentés dans l'article 1 décrivent un modèle d'infection par HHV-6 chez la souris. Ils indiquent que le virus HHV-6A, et pas HHV-6B, peut persister dans le cerveau des souris CD46 transgéniques et induire une infiltration lymphocytaire, sans pour autant causer de signe clinique de maladie neurologique. Nous avons malgré cela cherché à déterminer si l'infiltration leucocytaire observée pouvait causer des dommages dans le cerveau des souris. Pour cela, nous avons réalisé des colorations histologiques luxol fast blue. Cette coloration permet de marquer les gaines de myéline en bleu, et donc de détecter d'éventuelles zones démyélinisées. Nous avons ainsi comparé des coupes histologiques de cerveau de souris ayant reçu une injection contrôle, et de souris infectées par HHV-6A (figure 14). Malgré la présence de cellules CD3<sup>+</sup> et CD19<sup>+</sup> détectées en immunofluorescence (cf article 1), très peu de différences ont été décelées en luxol fast blue entre les cerveaux contrôles et les cerveaux infectés, ce qui suggère que la présence de cellules infiltrantes dans le cerveau des souris infectées par HHV-6A n'est pas suffisante pour induire une démyélinisation.



**Figure 14. Coloration luxol fast blue de coupes de cerveau de souris infectée ou par HHV-6A.** Les coupes de cerveaux prélevés 3 semaines après l’injection sur des souris sauvages ayant reçu une injection témoin (A, C), ou de souris CD46 transgénique ayant reçu une injection i.c. de virus HHV-6A (B, D), ont été fixées en acétone pendant 10 min. Elles ont ensuite été colorées avec une solution de luxol fast blue pendant 2h à 60°C, puis lavées en éthanol à 95% et en eau, et différenciées en carbonate de lithium jusqu’à la distinction des substances blanches et grises. La différenciation a ensuite été terminée en éthanol 70%. Les coupes ont été lavées à l’eau et contre-colorées en hématoxyline (marquage des noyaux cellulaires). Elles ont ensuite été déshydratées en bains successifs d’éthanol et de xylène, et montées en milieu de montage DPX (Fluka), puis observées avec un microscope Axioscope équipé du logiciel Axiovision (Zeiss). Les zones myélinisées apparaissent en bleu, les noyaux cellulaires en violet. (A, B) x100 DG, gyrus denté ; v, ventricule. (C,D) x400. Aucune différence n’est observée au niveau du marquage de la myéline entre les cerveaux contrôles et infectés par HHV-6A.

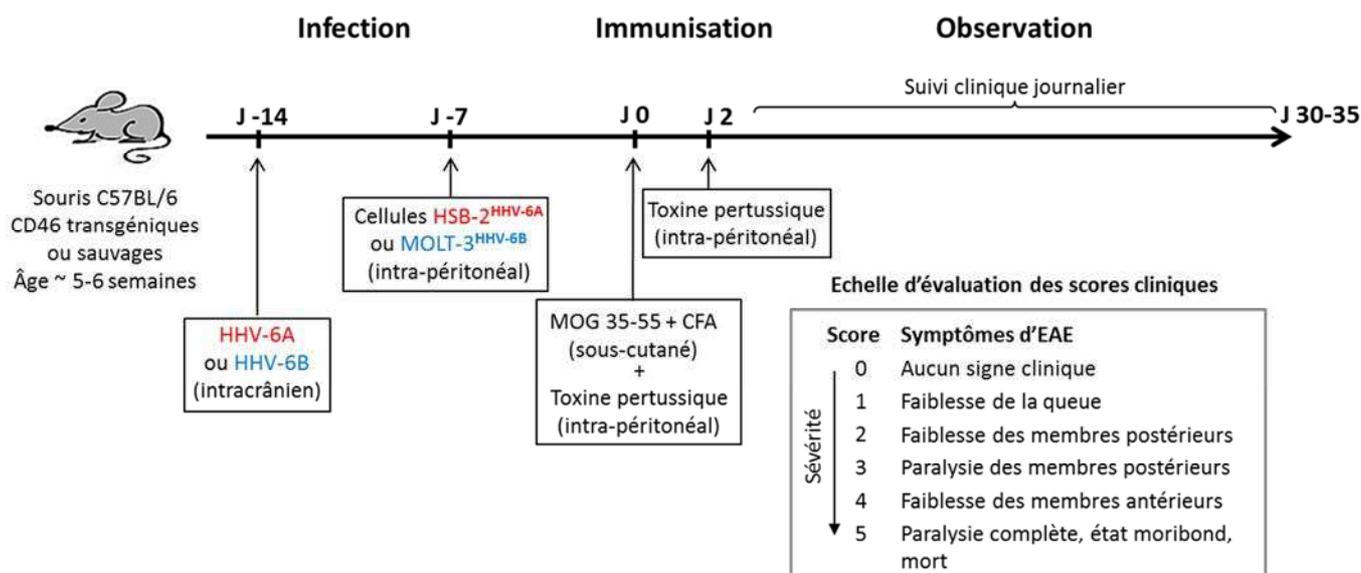
## 2. L'infection par HHV-6A ou HHV-6B induit une aggravation des signes cliniques d'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE)

Afin d'évaluer la capacité d'HHV-6 à induire ou aggraver des symptômes neurologiques visibles, nous avons ensuite analysé l'effet de l'infection dans un modèle animal de maladie neuroinflammatoire, appelé encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE) et couramment utilisé comme modèle de SEP. L'EAE est induite par immunisation des souris avec le peptide MOG 35-55, dérivé de la protéine de myéline MOG (pour myelin oligodendrocyte glycoprotein). L'injection de ce peptide en présence d'adjuvant complet de Freud (CFA), induit une forte réponse autoimmune dirigée contre la myéline. Deux injections de toxine pertussique sont associées à l'immunisation et permettent de faciliter l'infiltration des cellules immunitaires dans le SNC en augmentant la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique. Ainsi, l'immunisation avec le peptide MOG induit une forte inflammation dans le SNC, et provoque une démyélinisation qui perturbe la transmission des signaux nerveux. Les souris développent alors des signes cliniques neurologiques tels que des tremblements et des faiblesses motrices. Une échelle de scores cliniques allant de 0 (aucun signe) à 5 (paralysie complète) est utilisée afin de déterminer la gravité des symptômes et l'évolution de la maladie au cours du temps chez chaque animal (figure 15). Classiquement, l'induction de l'EAE avec le peptide MOG 35-55 génère l'apparition de signes neurologiques, suivie d'une phase de rémission.

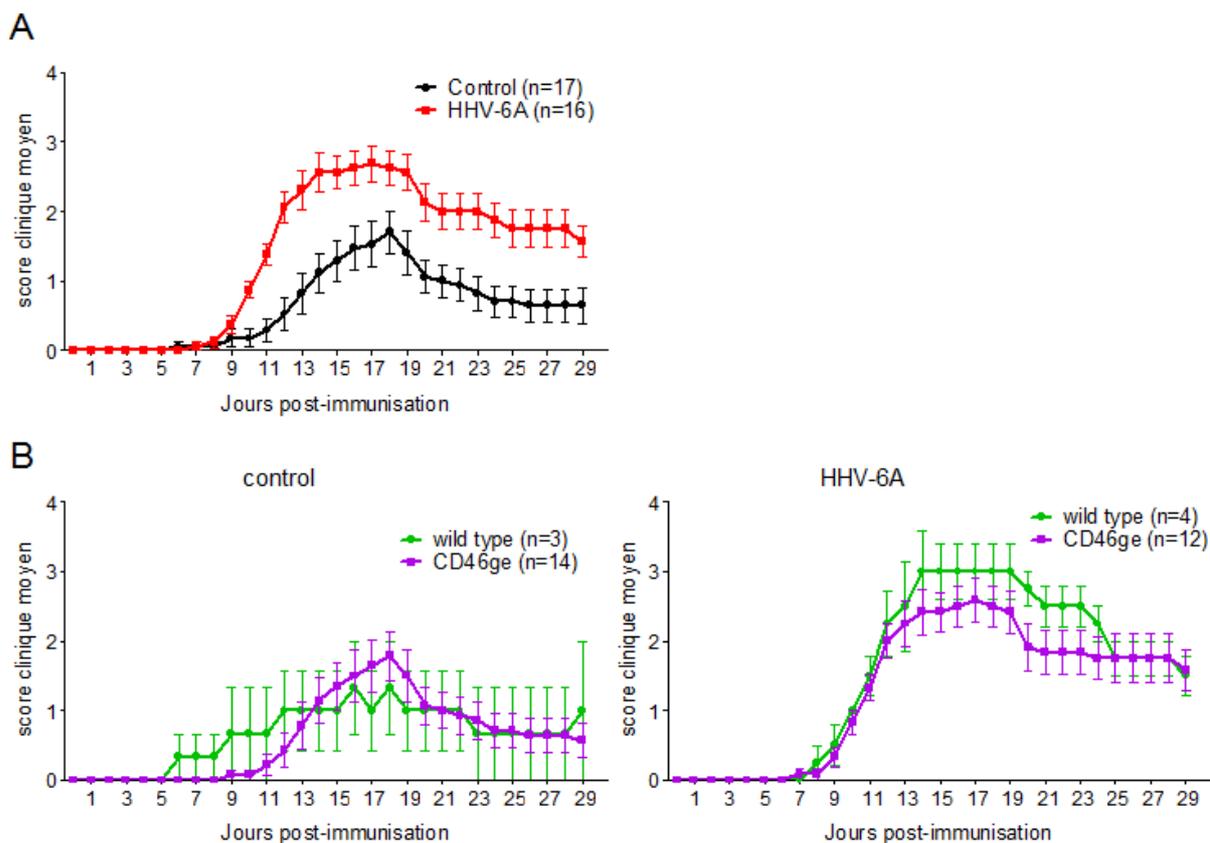
Dans le contexte de l'étude des effets neurologiques de l'infection par HHV-6, nous avons établi un protocole qui consiste tout d'abord à infecter des souris CD46ge ou sauvages avec HHV-6, puis à induire l'EAE, afin de comparer la sévérité de la maladie entre les souris infectées et les souris non infectées (figure 15). De façon intéressante, les souris préalablement infectées avec HHV-6A développent des scores cliniques significativement plus élevés que les souris contrôles (figure 16.A, 18.A, tableau 3). Ceci suggère donc que la présence d'HHV-6A dans le cerveau et/ou la réponse immunitaire induite suite à l'infection peuvent participer à l'aggravation de symptômes cliniques neurologiques initiés par d'autres moyens. Cependant, aucune différence n'est observée entre les scores cliniques des souris CD46ge et ceux des souris sauvages, ce qui indique que l'augmentation de la sévérité de l'EAE est indépendante de l'expression de CD46 (figure 16.B). Or, d'après les résultats présentés dans l'article 1, HHV-6A persiste et induit une infiltration lymphocytaire, mais seulement dans le cerveau des souris CD46 transgéniques. Ceci suggère donc que l'effet de l'infection par HHV-6A n'est pas lié aux propriétés décrites précédemment. La même expérience d'EAE a été réalisée avec le virus HHV-6B, qui, contrairement à HHV-6A n'infecte pas le cerveau des souris, même en présence de CD46 (figure 17, 18.B, 19, tableau 3).

Comme avec HHV-6A, les souris préalablement infectées avec HHV-6B présentent des scores cliniques augmentés par rapport aux contrôles, indépendamment de l'expression de CD46. Il est donc probable que les deux virus induisent une augmentation de la sévérité de l'EAE par des mécanismes indépendants de l'infection du SNC. En accord avec cette hypothèse, l'injection de virus inactivés par irradiation aux UV induit la même augmentation des scores cliniques que l'injection des virus infectieux (figure 18, 19, tableau 3), ce qui confirme que l'augmentation de la sévérité de l'EAE est indépendante de l'infection du système nerveux central et de la réplication virale. Ces résultats montrent donc une capacité d'HHV-6A et HHV-6B à induire une aggravation des symptômes d'EAE chez la souris, probablement en lien avec une augmentation de la neuroinflammation et de la démyélinisation.

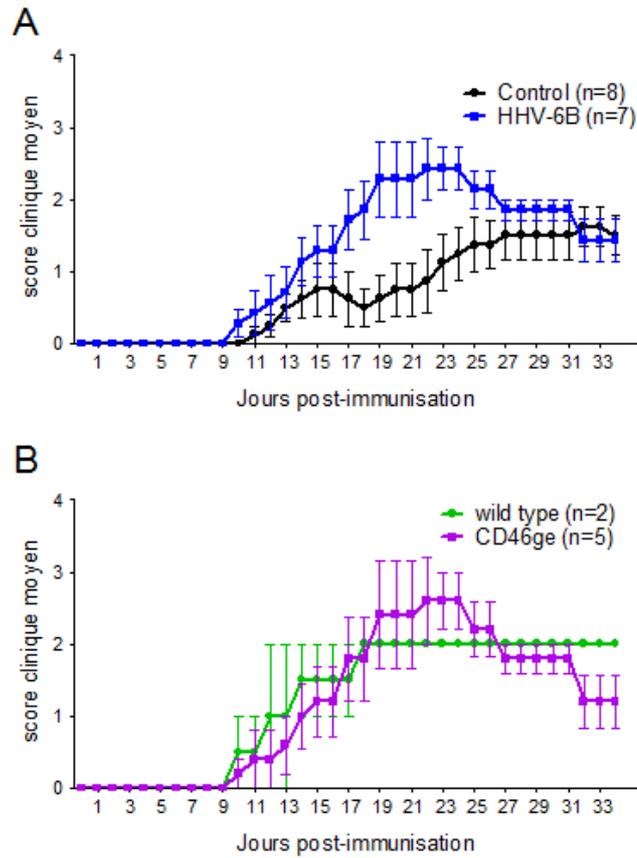
Nous avons enfin réalisé une expérience d'EAE incluant un groupe de souris ayant préalablement reçu une injection i.c. de virus de la stomatite vésiculaire (VSV) traité aux UV, puis une injection i.p. de cellules HSB-2 infectées par VSV et irradiées aux rayons gamma, afin de conserver la même méthode d'infection que celle utilisée pour HHV-6 (figure 19). Nous avons alors constaté une augmentation similaire à celle obtenue avec HHV-6A (figure 19, tableau 3), ce qui suggère que la capacité à aggraver la sévérité de l'EAE n'est pas spécifique d'HHV-6, mais relève plus probablement de propriétés pro-inflammatoires partagées par différents virus ou pathogènes. Cependant, les mécanismes potentiels permettant d'expliquer l'aggravation observée n'ont pas été analysés.



**Figure 15. Protocole d'induction de l'EAE après infection par HHV-6A ou HHV-6B.** Des souris sauvages ou CD46 transgéniques croisées sur un fond génétique C57BL/6, âgées de 5 à 6 semaines, reçoivent tout d'abord une injection intra-crânienne de stock viral HHV-6A ou HHV-6B, puis, une semaine plus tard, une injection intra-péritonéale de cellules HSB-2 infectées par HHV-6A ou MOLT-3 infectées par HHV-6B, respectivement. Les souris contrôles reçoivent une injection intracrânienne de solution témoin (lysate cellulaire), suivie d'une injection de cellules HSB-2 ou MOLT-3 non infectées, respectivement. Une semaine après l'injection intra-péritonéale, les souris sont immunisées par injection sous-cutanée de 100 µg de peptide MOG 35-55 en émulsion avec de l'adjuvant complet de Freud (CFA), supplémenté avec 5 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis*. Le même jour, les souris reçoivent une injection intra-péritonéale de 200 ng de toxine pertussique. Une seconde injection identique de toxine pertussique est réalisée deux jours plus tard. Les souris sont ensuite observées et pesées quotidiennement afin de détecter l'apparition de signes cliniques d'EAE et un score est attribué chaque jour aux animaux selon une échelle de sévérité.



**Figure 16. L'infection par HHV-6A augmente la sévérité de l'EAE (expérience n°1).** Des souris C57BL/6 sauvages ou CD46 transgéniques (CD46ge) ont été infectées par HHV-6A ou injectées avec une solution témoin (control), puis immunisées avec le peptide MOG 35-55 en CFA. Elles ont ensuite été observées pendant 30 jours afin de détecter l'apparition de signes cliniques évalués selon une échelle de scores allant de 0 à 5 (cf. protocole). A : Scores cliniques moyens des souris infectées par HHV-6A (rouge) et non infectées (noir). B : Scores cliniques moyens des souris sauvages (vert) ou CD46ge (violet) ayant été infectées par HHV-6A (graphique de droite) ou ayant reçu une injection contrôle (graphique de gauche).

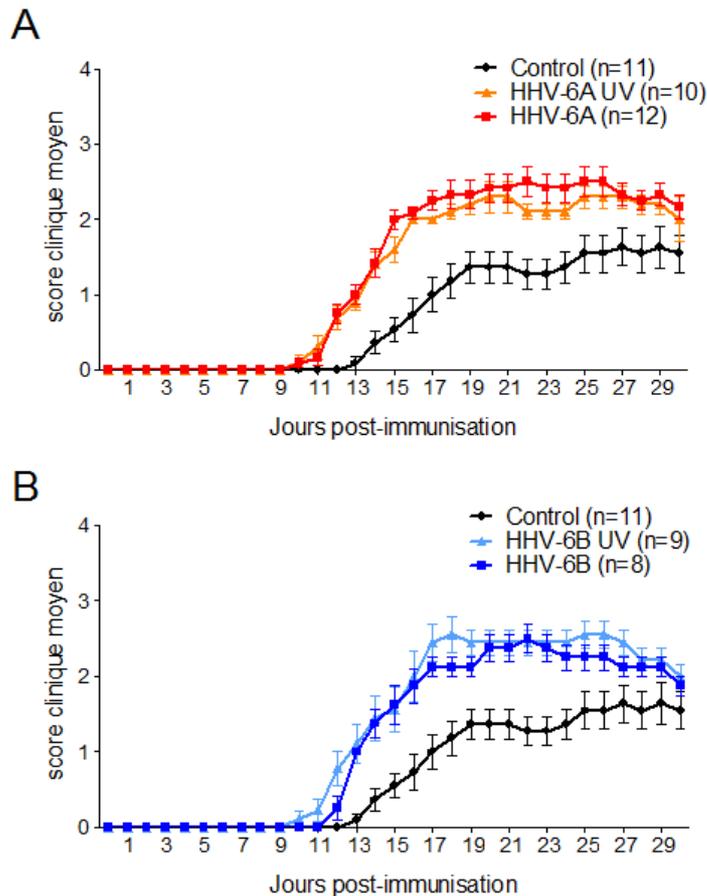


**Figure 17. L'infection par HHV-6B augmente la sévérité de l'EAE (expérience n°2).** Des souris C57BL/6 sauvages ou CD46 transgéniques (CD46ge) ont été infectées par HHV-6B ou injectées avec une solution témoin (control), puis immunisées avec le peptide MOG 35-55 en CFA. Elles ont ensuite été observées pendant 30 jours afin de détecter l'apparition de signes cliniques évalués selon une échelle de scores allant de 0 à 5 (cf. protocole). A : Scores cliniques moyens des souris infectées par HHV-6B (bleu) et non infectées (noir). B : Scores cliniques moyens des souris sauvages (vert) ou CD46ge (violet) ayant été infectées par HHV-6B.

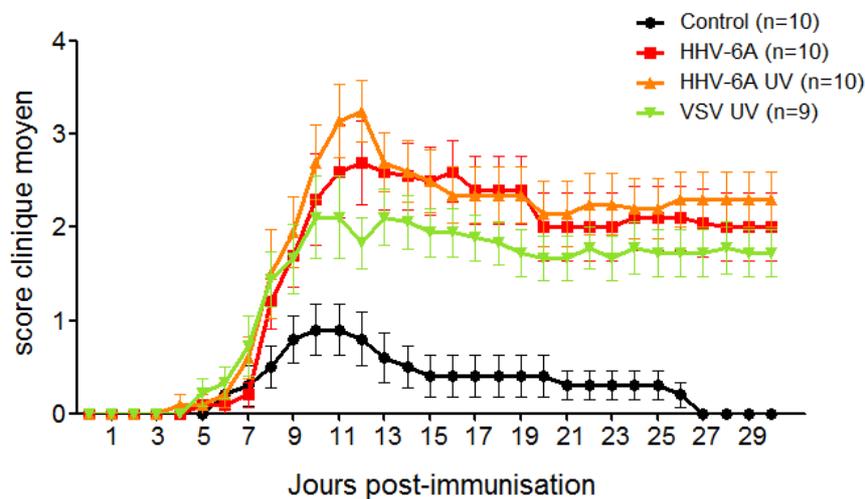
**Tableau 3. Paramètres cliniques des expériences d'EAE réalisées et analyses statistiques**

Experiment number	Infection	Incidence	Mean Day of Onset ( $\pm$ SEM)	Mean Max. Score ( $\pm$ SEM)	Day 30 DI ( $\pm$ SEM)
1	Control	16/17	14,0 ( $\pm$ 0,7)	1,8 ( $\pm$ 0,3)	61,7 ( $\pm$ 15,52)
	HHV-6A	16/16	10,8 ( $\pm$ 0,4)**	2,9 ( $\pm$ 0,2)**	137,9 ( $\pm$ 13,5)***
2	Control	7/8	18,4 ( $\pm$ 2,1)	2,0 ( $\pm$ 0,3)	81,7 ( $\pm$ 20,8)
	HHV-6B	7/7	15,3 ( $\pm$ 1,7)	2,6 ( $\pm$ 0,4)	118,0 ( $\pm$ 18,7)
3	Control	10/11	15,6 ( $\pm$ 0,6)	1,8 ( $\pm$ 0,2)	71,2 ( $\pm$ 10,5)
	HHV-6A UV	10/10	12,0 ( $\pm$ 0,4)***	2,7 ( $\pm$ 0,3)	125,0 ( $\pm$ 5,4)***
	HHV-6A	12/12	12,0 ( $\pm$ 0,3)***	2,8 ( $\pm$ 0,2)*	136,4 ( $\pm$ 8,1)***
	HHV-6B UV	9/9	12,5 ( $\pm$ 0,7)**	2,5 ( $\pm$ 0,3)	136,3 ( $\pm$ 12,3)**
	HHV-6B	8/8	12,7 ( $\pm$ 0,2) ***	2,5 ( $\pm$ 0,2)	123,7 ( $\pm$ 7,6)***
4	Control	6/10	8,8 ( $\pm$ 0,7)	1,5 ( $\pm$ 0,2)	57,1 ( $\pm$ 19,2)
	HHV-6A	10/10	9,5 ( $\pm$ 0,8)	3,25 ( $\pm$ 0,4)**	159,6 ( $\pm$ 23,9)**
	HHV-6A UV	10/10	8,4 ( $\pm$ 0,6)	3,3 ( $\pm$ 0,4)**	173,4 ( $\pm$ 10,3)***
	VSV UV	8/9	8,1 ( $\pm$ 0,6)	3,0 ( $\pm$ 0,3)**	151,3 ( $\pm$ 9,1)***

Tableau présentant pour chaque groupe l'incidence de l'EAE (« nombre de souris ayant développé des signes cliniques »/ « nombre de souris total »), le jour moyen d'apparition des premiers signes cliniques, le score maximal moyen, et l'index de la maladie au 30<sup>ème</sup> jour ([« somme des scores cliniques sur 30 jours » /30] x 100). L'analyse statistique des différences entre les groupes infectés et les groupes contrôles de chaque expérience a été réalisée à l'aide du test de Student. \*,  $p \leq 0,05$  ; \*\*,  $p \leq 0,01$ , \*\*\*,  $p \leq 0,001$ .



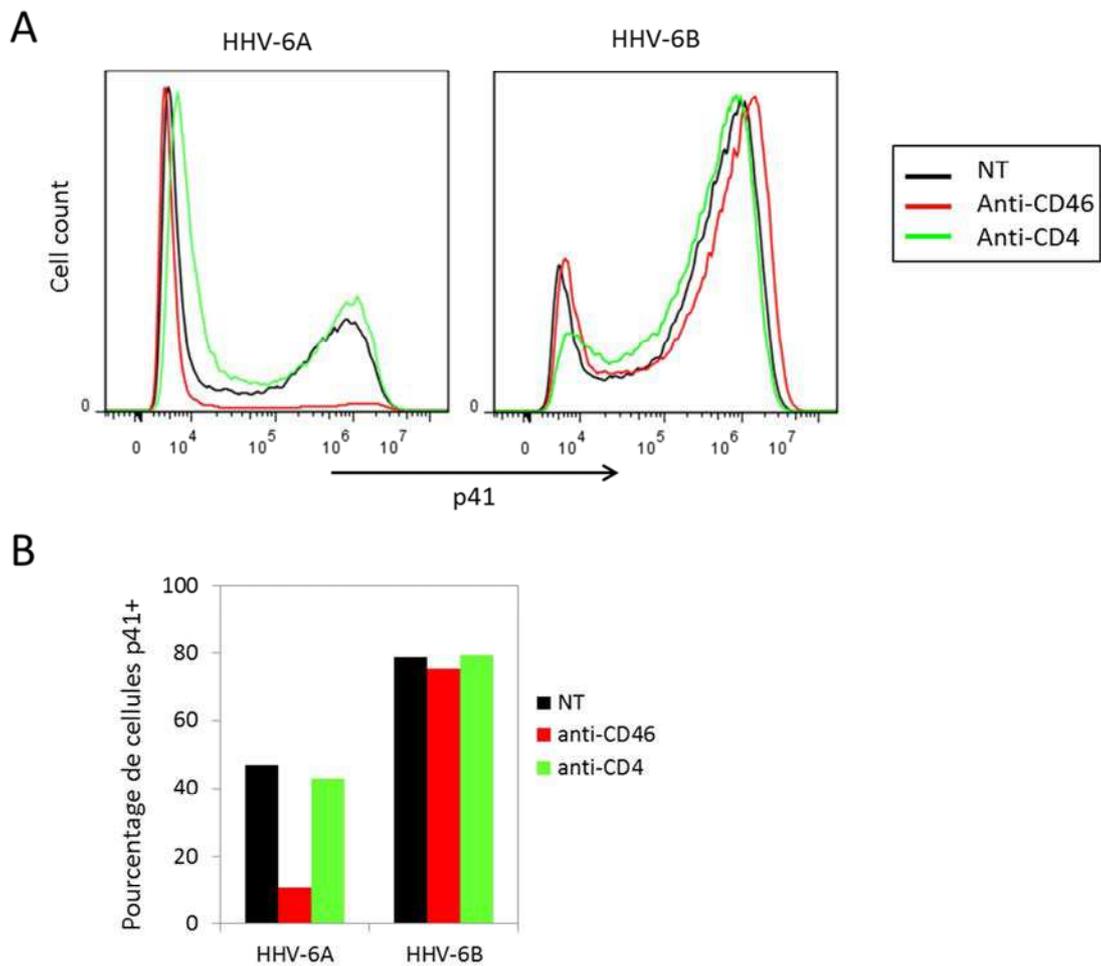
**Figure 18. L'augmentation de la sévérité de l'EAE par HHV-6A et HHV-6B est indépendante de la réplication virale (expérience n°3).** Deux groupes de souris C57BL/6 sauvages ont été infectés avec HHV-6A (A) ou HHV-6B (B) par une injection intracrânienne de virus HHV-6 infectieux, puis une injection intra-péritonéale de cellules HSB2 ou MOLT3 infectées par HHV-6A ou HHV-6B, respectivement. Deux groupes de souris ont de plus été injectées avec les virus A ou B inactivés aux UV, puis avec des cellules infectées irradiées aux rayons gamma (1900 rad). Un groupe de souris contrôle a été injecté avec une solution témoin, puis avec des cellules non infectées. Toutes les souris ont ensuite été immunisées avec le peptide MOG 35-55 en CFA, et observées pendant 30 jours afin de détecter l'apparition de signes cliniques évalués selon une échelle de scores allant de 0 à 5 (cf. protocole). A : Scores cliniques moyens des souris injectées avec HHV-6A (rouge), HHV-6A UV (orange) et contrôle (noir). B : Scores cliniques moyens des souris injectées avec HHV-6B (bleu foncé), HHV-6B UV (bleu clair) et non infectées (noir).



**Figure 19. L'augmentation de la sévérité de l'EAE n'est pas spécifique à HHV-6 (expérience n°4).** Un groupe de souris C57BL/6 sauvages ont été infectés avec HHV-6A par une injection intracrânienne (i.c.) de virus infectieux, puis une injection intra-péritonéale de cellules HSB2 infectées (rouge). Deux groupes de souris ont de plus été injectées en i.c. par HHV-6A (orange) ou VSV (vesicular stomatitis virus, vert) inactivés aux UV, puis en i.p. avec des cellules infectées par HHV-6A ou VSV, respectivement, irradiées aux rayons gamma (1900 rad). Un groupe de souris contrôle (noir) a été injecté en i.c. avec une solution témoin, puis avec des cellules non infectées. Toutes les souris ont ensuite été immunisées avec le peptide MOG 35-55 en CFA, et observées pendant 30 jours afin de détecter l'apparition de signes cliniques évalués selon une échelle de scores allant de 0 à 5 (cf. protocole).

### **3. Absence de rôle pour CD46 dans l'infection de cellules MOLT3 par HHV-6B**

L'ensemble des résultats présentés dans l'article 1, ainsi que certaines données de la littérature (Mori et al., 2002, 2004) incitent à se questionner sur le rôle de la protéine CD46 dans l'entrée du virus HHV-6B. En effet, HHV-6B ne semble pas capable d'infecter les cellules murines, même lorsqu'elles expriment CD46. Dans ce contexte, nous avons souhaité analyser l'importance de CD46 dans l'infection par HHV-6B de cellules permissives à une infection productive. La lignée de lymphocytes T humains MOLT3 est habituellement utilisée pour la propagation de la souche Z29 d'HHV-6B. De plus, les résultats présentés dans la figure 1 de l'article 1 indiquent que ces cellules peuvent également être infectées par HHV-6A. Nous avons donc utilisé ces cellules pour comparer l'effet d'un traitement à l'aide d'un anticorps dirigé contre CD46 sur l'infection par HHV-6A et HHV-6B (figure 20). Les résultats de cette expérience préliminaire suggèrent que le blocage préalable de CD46 sur les cellules MOLT3 provoque une forte inhibition de l'infection par HHV-6A, alors qu'il ne semble avoir aucun effet sur l'infection par HHV-6B. Afin de confirmer la spécificité du traitement anti-CD46, nous avons également réalisé un traitement avec un anticorps anti-CD4, qui n'a eu d'effet ni sur l'infection par HHV-6A, ni sur l'infection par HHV-6B. Ainsi, cette expérience semble suggérer que la liaison à CD46 n'est pas nécessaire à l'infection par la souche Z29 d'HHV-6B utilisée dans notre étude. Toutefois, bien que la même MOI aie été utilisée pour l'infection par chacun des virus, le pourcentage de cellules non traitées infectées par HHV-6A est nettement inférieur au pourcentage de celles infectées par HHV-6B, ce qui a pu avoir un impact sur l'effet du blocage. Pour être complètement convaincante, cette expérience devrait donc être répétée dans des conditions permettant d'obtenir le même niveau d'infection avec les deux virus.



**Figure 20. Le blocage de CD46 par un anticorps spécifique inhibe l'infection de cellules MOLT3 par HHV-6A, mais pas par HHV-6B.** (A) Les cellules MOLT3 ont été incubées pendant 1h avec un anticorps anti-CD46 polyclonal de lapin (R1839-C) dilué à 1/100 (rouge), ou un mélange d'anticorps monoclonaux anti-CD4 (clone EDU-2 et clone MEM-115, Immunotools) à 25 µg/ml chacun (vert), ou non traitées (NT, noir). Les cellules ont ensuite été infectées en suspension avec HHV-6A ou HHV-6B pendant 2h à 37°C à MOI 0,05, puis centrifugées et lavées en PBS trois fois. A 48h post-infection, les cellules ont été lavées en PBS, perméabilisées à l'aide du kit cytofix/cytoperm (BD), puis marquées avec l'anticorps anti-p41 (9A5D12) et un anticorps secondaire anti-souris couplé à l'AlexaFluor 488 (Molecular Probes), puis analysées en cytométrie en flux sur un cytomètre Accuri C6. Les données ont été traitées avec les logiciels CFlow Plus et Flowjo. (B) Les pourcentages de cellules p41<sup>+</sup> dans les différents échantillons sont représentés.

## 2<sup>ème</sup> Partie : Analyse de l'expression de gènes d'enveloppe de rétrovirus endogènes dans différents types de cellules humaines

Les résultats présentés dans la première partie de cette étude décrivent des propriétés neuroinflammatoires d'HHV-6A dans un modèle murin. Une deuxième partie de cette thèse a été consacrée à l'analyse des effets inflammatoires d'HHV-6A et HHV-6B dans un modèle cellulaire humain. Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr P. Marche (INSERM U823, Grenoble), nous nous sommes en particulier intéressés à l'effet de l'infection par HHV-6 sur l'expression de gènes codant pour des protéines d'enveloppe (*env*) de rétrovirus endogènes humains (appelés HERV). Plusieurs de ces protéines sont connues pour avoir d'importantes propriétés pro-inflammatoires. L'activation de l'expression de ces gènes *env* par HHV-6 pourrait ainsi constituer un mécanisme d'induction de l'inflammation supplémentaire.

Dans le génome humain, plusieurs séquences complètes de gènes *env* ont été décrites. Nous avons décidé ici d'analyser par PCR quantitative (qPCR) l'expression de trois gènes *env* suite à l'infection par HHV6A et HHV6B: le gène codant l'enveloppe de HERV-K18 (HERV-K18 *env*), le gène codant la syncytine (*syncytine-1*) et le gène codant l'enveloppe de MSR/V (MSRV *env*). Ces deux derniers gènes appartiennent à la famille HERV-W, et leurs séquences sont donc très similaires. Afin de les discriminer, nous avons utilisé un système d'amorces et de sondes de qPCR développé par Mameli et al. (Mameli et al., 2009), qui permet d'amplifier spécifiquement l'un ou l'autre de ces gènes.

A l'aide de cette méthode, nous avons tout d'abord analysé l'effet de l'infection par HHV-6A et HHV-6B sur l'expression de ces gènes *env* dans une lignée de lymphocytes T et dans des cellules primaires sanguines mononuclées, qui peuvent être infectées de façon productive, et représentent les cibles préférentielles d'HHV-6. Dans un second temps, nous avons utilisé des lignées de cellules neurales afin d'étudier la capacité du virus à induire l'expression des gènes *env* dans le SNC, qui pourrait avoir des conséquences neuroinflammatoires. L'ensemble des résultats obtenus dans cette deuxième partie sont présentés dans l'article 2.



## ARTICLE 2

# **Human herpesvirus 6-induced transactivation of human endogenous retrovirus-W envelope genes**

Josephine M. Reynaud<sup>1</sup>, Gilda Raguenez<sup>2</sup>, Olivier Blond<sup>2</sup>, Hei-Lanne Reynaud-Dougier<sup>2</sup>,  
Patrice N. Marche<sup>2\*</sup> and Branka Horvat<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> International Center for Infectiology Research, INSERM U1111, CNRS UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, University of Lyon 1, 69365 Lyon, France

<sup>2</sup> INSERM U823, Université J Fourier, IAPC, 38041 Grenoble, France

Manuscrit en préparation



## **ABSTRACT**

The expression of human endogenous retrovirus (HERV) elements of the HERV-W family has been associated with different diseases, including multiple sclerosis (MS). In particular, the envelope protein (ENV) from the multiple sclerosis-associated retrovirus (MSRV) exhibits strong pro-inflammatory effect via TLR-4 signaling and another HERV-W env gene, syncytin-1, was shown to have neuroinflammatory and neurodegenerative properties. Furthermore, human herpesvirus 6 (HHV-6) infection has long been suspected to play a role in the pathogenesis of MS. We thus analyzed whether HHV-6 could induce the expression of HERV in human cells. Here, we demonstrate that both HHV-6A (GS strain) and HHV-6B (Z29 strain) could induce the expression of env genes from different HERV, including MSRV env, syncytin-1 and HERV-K18. HHV-6A transactivated these genes in the T cell line HSB2 and in cord blood mononuclear cells (CBMC), while the effect of HHV-6B was observed in peripheral blood lymphocytes, monocytes and CBMC. However, this effect was independent from viral replication and was observed with UV-inactivated viruses as well as with several other ligands of the HHV-6 entry receptor CD46, including UV-inactivated measles virus (vaccine strain), the complement system component C3b and CD46-specific monoclonal antibody. Finally, the engagement of CD46, which is ubiquitously expressed in humans, induced a strong expression of HERV env in neural cells, suggesting a possibility to transactivate HERV env in the central nervous system. These data expand the specter of HHV-6 effects in the modulation of the immune response and support the hypothesis that cross-talks between HHV-6 and HERV may contribute to inflammatory diseases and participate to MS etiology. Furthermore, they reveal a new function of CD46, known as an inhibitor of complement activation and receptor for several pathogens, in transactivation of HERV env genes, which may play an important role in the pathogenesis of inflammatory diseases.

## **INTRODUCTION**

Human endogenous retroviruses (HERV) are sequences in the human genome thought to be derived from retroviral infections of our ancestors' germ-line cells. HERV sequences constitute approximately 3–8% of the human genome and can be classified into at least 31 families [1]. Although these viral sequences were generally silenced through diverse evolutionary mechanisms, some HERV genes have been shown to be expressed. Their transcriptional activity was recently shown to be tissue-specific and variable among the different HERV families, indicating a discrete and diversified regulation [2]. Interestingly,

some HERV were suggested to be involved in pathology of some autoimmune diseases, including multiple sclerosis (MS) as well as neuropathological syndroms like schizophrenia and bipolar disorder [3–5].

Two members of the HERV-W family, a multicopy endogenous family of HERVs that comprise about 1% of the human genome, have been studied with respect to MS: MSR/V (MS-associated retrovirus), and ERVWE1; both are known to possess complete env ORF (MSRV env and syncytin-1 (*syn-1*), respectively), sharing 93% of sequence identity. Free MSR/V virus-like particles were repeatedly isolated from leptomeningeal cells, lymphocytes and monocytes from MS patients [6–8]. Moreover, MSR/V was associated to MS by several clinical studies [9–11], and therefore proposed as a candidate etiological agent for this disease. The expression of HERV-W env is increased in MS patients, and has been correlated to poor prognosis [12]. In addition, HERV-W envelope proteins (ENV) were shown to have strong inflammatory properties. MSR/V ENV exhibits superantigen activities [13] and can activate TLR4 signaling in monocytes and dendritic cells, inducing pro-inflammatory responses [14]. The glycoprotein encoded by *syn-1* is known to play a crucial role in placenta formation during the embryonic development, and was also shown to be associated to MS, as its expression is increased in the brain of MS patients [15].

The mechanisms responsible for the activation of HERV gene expression are still not fully understood. However, some exogenous infection by herpesviruses, including herpes simplex virus (HSV)-1, Epstein-Barr virus (EBV), human herpes virus (HHV) 6, were shown to have transactivating effects on HERV genes. Indeed, (HSV)-1 infection was shown to activate the transcription of HERV gag, env, and LTR sequences in vitro [16–18]. EBV infection also induces the expression of env genes from different HERV, including HERV-W [19,20].

Interestingly, both human herpesvirus (HHV)-6A and HHV-6B, which belong to the Betaherpesvirinae subfamily, were also associated to MS pathogenesis. HHV-6A and HHV-6B viral DNA loads are increased in the CSF and the serum of MS patients [21–24], and viral transcripts, as well as viral antigens, were detected in the brain of MS patients, but not in control brains [25–27]. Moreover, HHV-6 reactivation was correlated with MS exacerbation and relapses [28–30]. However, a link is still missing to demonstrate the involvement of both HHV-6A and HHV-6B in MS pathogenesis. Several studies have indicated that HHV-6A and HHV-6B could induce the expression of HERV. HHV-6A was shown to activate the retrotranscriptase activity of HERV in lymphocytes from MS patients [31], and HHV-6A antigens can induce proliferative responses in synergy with HERV antigens in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from MS patients [32]. In addition, both HHV-6A and HHV-6B were shown to activate the transcription of the ENV protein of HERV-K18 [33,34], which,

like MSRV-ENV, is known to have strong pro-inflammatory properties [19]. Thus, the capacity of HHV-6A and HHV-6B to activate the expression of HERV genes could represent an important mechanism of MS induction, in which both endogenous and exogenous factors are integrated.

In this study, we aim to determine whether HHV-6A and HHV-6B infection can induce the expression of HERV-W. Using a specific quantitative PCR approach developed by Mameli et al. [35], we analyzed the RNA expression of HERV-W env genes, including syn-1 and MSRV env, in the human cells. We show an increase in all env genes tested, independently on virus replication. Different ligands of the receptor for HHV-6, the human membrane protein CD46, produced similar effects, suggesting a potential role for CD46 in the transactivation of HERV env genes in both primary human lymphocytes and monocytes, as well as in neural cells.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Ethics statement**

Umbilical cord blood was obtained from healthy full-term newborns with written parental informed consent according to the guidelines of the medical and ethical committees of Hospices Civils de Lyon and of Agence de Biomédecine, Paris, France. Experiments using cord blood were approved by both committees and were performed in full compliance with French law.

### **Cells**

HSB2 and MOLT3 human T cell lines were cultured in complete RPMI medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). Human glioblastoma-astrocytoma U-87 MG and neuroblastoma SH-SY5Y cells were cultured in Dubelco's Modified Eagles Medium (DMEM), with 10% FCS. Cord blood mononuclear cells (CBMC) were kindly provided by Dr M. Ducdodon after density gradient centrifugation of human cord blood and CD34<sup>+</sup> cells depletion using immunomagnetic beads (CD34<sup>+</sup> MicroBead Kit, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany), as described by Villaudy et al. [36]. Human peripheral blood was obtained from healthy donors from the Blood Transfusion Centre (Lyon, France). PBMC were isolated by density Ficoll/Hypaque gradient centrifugation, then 25-30.10<sup>6</sup> cells/mL were layered onto 6 mL of a 50 % Percoll gradient (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) and centrifuged for 20 min at 400 g. PBLs were recovered from the high density fraction and monocytes from the light density fraction at the interface. Cells were then rested for 24 h in RPMI medium, supplemented with 10% FCS, before infection/stimulation.

## Viruses

HHV-6A (GS strain) and HHV-6B (Z29 strain) (kindly provided by Dr L. Naesens) were propagated respectively in the HSB2 and MOLT3 cell lines. For virus production, cells were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 0,005 for 1-2 hours at 37°C. At maximum CPE, cells were centrifuged, resuspended in ten-fold lower volume of RPMI supplemented with 20% of FCS, aliquoted and frozen at -80°C. Non-infected cells were processed in identical conditions and were used for control experiments. Virus titers were determined by immunofluorescence. HSB2 or MOLT3 cells were cultured in 96-well plates and infected in quadruplicate with serial dilutions of viral stock ( $10^{-1}$  to  $10^{-8}$ ). After 5 days of culture, cells were harvested on 10-well slides, fixed in cold acetone, stained with mouse anti-p41 primary antibody (Santa Cruz Biotechnology) and AlexaFluor488-conjugated goat anti-mouse secondary antibody (Molecular Probes). Titers were calculated in tissue culture infective dose 50 per ml (TCID<sub>50</sub>/ml). Non-infected cell suspensions were processed in identical conditions and were used for mock-infections. Measles virus (MV) Edmonston strain was propagated on Vero fibroblasts and harvested from infected cells when a strong cytopathic effect developed. Viruses were inactivated by 30 min exposure at 4°C to 254 nm UV irradiation and inactivation was confirmed by plaque assay. All virus stocks were free of mycoplasma.

## Infections and stimulations

Infection of HSB2 cells, CBMC, PBMC, PBL and monocytes with HHV-6A, HHV-6B, or MV was performed in suspension for 1h30 at 37°C with a multiplicity of infection (MOI) of 3 TCID<sub>50</sub>/cell. Cells were then pelleted and resuspended in fresh medium for further culture. U87 and SH-SY5Y cells were seeded in 6-well plates, and infected with HHV-6A, or HHV-6B with an MOI of 0,2 TCID<sub>50</sub>/cell. Inactivated viruses were UV-irradiated at 254 nm for 30'. For HSB2 cells and PBMC, antibody stimulation was performed by pre-coating wells overnight with anti-CD46 antibody (Tra-2) or the isotype control (MOPC) overnight at 75 µg/ml in PBS at 37°C. Stimulation with soluble anti-CD3 (Okt3) and human recombinant IL-2 (AbCys) were performed at 10 µg/ml and 100 u/ml, respectively. U-87 MG and SH-SY5Y cells were stimulated with anti-CD46 in solution at a concentration of 20 µg/ml. C3b was obtained as described previously [37] and used at 30 µg/ml. Samples were collected at several time points for RNA extraction.

## Quantitative PCR

The cells were harvested and total RNA was isolated using the RNeasy mini kit (Qiagen). Experiments were performed in order to validate the interpretation of quantitative real-time PCR (RT-qPCR) data following the MIQE guidelines [38]. Total RNA quantification and integrity was assessed using Experion RNA StdSens analysis kit (Bio-Rad, CA). Next, cDNA was generated from 1µg of total RNA using iScript reverse transcriptase (Bio-Rad). TaqMan probes and primers for human HERV-K18 *env*, HERV-W *env*, MSRV *env*, *syn-1*, GAPDH and *tbp* genes were purchased from Eurogentec (Table 1). HERV-W *env* primers were designed to amplify both MSRV *env* and syncytin-1 gene. Quantification of transcripts was performed with the CFX96 Real-time PCR detection system (Bio-Rad) and all reactions done in 10µl mixtures using iQ SYBR Green Supermix or TaqMan iQ Supermix according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad). Data were analyzed with the Bio-Rad CFX Manager Software. The reactions were optimized to reach an efficiency of 2 so that a relative  $\Delta\Delta C_t$  quantification approach could be used [39]. Each sample was normalized to the endogenous control gene (GAPDH or *tbp*) and all data are presented as the fold change relative to the control. RT-qPCR analysis of HHV-6 expression (U79, U94 and U100 genes) was performed as previously described (Reynaud, in preparation).

**Table 1.** List of primers and probes used in the study

Genes		Primer and probe Sequences	Reference
HERV-K18 <i>env</i>	F	CCG CCT TTT GAG CAG AAG TAT AAG A	<i>Hsiao et al., 2006</i>
	R	CAG TAA TGG CAA TGC TGG CTA TG	
	probe	6-FAM-5'-TAA GTC CTA CAG ACA AAC TT-3' MGB	
HERV-W <i>env</i>	F	TAA TAC CAC CCT CAC TGG GC	This paper
	R	ATA GAT TCT GAA GAG CCA TT	
MSRV <i>env</i>	F	CTT CCA GAA TTG AAG CTG TAA AGC	<i>Mameli et al., 2009</i>
	R	GGG TTG TGC AGT TGA GAT TTC C	
	probe	FAM-5'-TTC TTC AAA TGG AGC CCC AGA TGC AG-3'TAMRA	
HERV-W7q <i>env</i> ( <i>syn-1</i> )	F	ACT TTG TCT CTT CCA GAA TCG	<i>Mameli et al., 2009</i>
	R	GCG GTA GAT CTT AGT CTT GG	
	probe	FAM-5'-TGCaTcTgGcCtCCAT-3'-BHQ1 (LNA probe)	
GAPDH	F	AGC AAT GCC TCC TGC ACC ACC AAC	
	R	CCG GAG GGG CCA TCC ACA GTC T	
<i>tbp</i>	F	GCG GTT TGC TGC GGT AAT CAT	<i>Turcanova et al., 2009</i>
	R	GAC TGT TCT TCA CTC TTG GCT CCT GT	

F, forward primer; R, reverse primer

## RESULTS

### HHV-6 infection induces the expression of HERV *env* genes

To analyze the capacity of HHV-6A infection to transactivate HERV-W *env* gene, we examined the level of mRNA expression of *env* genes endowed with proinflammatory properties, MSRV *env* and *syn-1* (Figure 1). Previous work showed that the expression of HERV-K18 *env*, which belongs to another HERV family, is induced by HHV-6A infection [34]. In order to establish appropriate experimental conditions, we initially analyzed the expression kinetics of this gene in HSB2 cells after HHV-6A infection, and used it as a positive control in further experiments. In agreement with previous reports, HHV-6A induced an important increase in HERV-K18 *env* expression with a peak at 48h after infection (Figure 1A). We then analyzed the expression of the HERV-W *env* genes in HSB2 cells at that time point (Figure 1B). Similarly, an increase in HERV-W *env* expression after HHV-6A infection was observed with the three sets of primers, HERV-W *env*, MSRV *env* and *syn-1*, although at lower levels. Finally, we analyzed whether HHV-6A infection could modulate the expression of HERV *env* in primary human cells. We first used CBMC as they are generally free of potential previous HHV-6 infection and particularly susceptible to HHV-6 infection. We observed an induction of MSRV *env* and *syn-1* in these cells, both at 24h and 48h after infection (Figure 1C). Surprisingly, no increase was detected with HERV-W *env* primers, potentially due to differences in primer efficiencies.

We next analyzed the effect of HHV-6B infection on the expression of HERV *env* (Figure 2). We observed HHV-6B-mediated induction of MSRV *env* and *syn-1* in CBMC (Figure 2A). Furthermore, HHV-6B infection induced the expression of both HERV-K18 and HERV-W *env* in adult peripheral blood lymphocytes (PBL) and monocytes 24h after infection (Figure 2B).

### HHV-6-mediated induction of HERV *env* does not require virus replication but could be mediated by the engagement of the viral receptor

We then analyzed whether HHV-6 replication is necessary for the induction of HERV *env* (Figure 3). We inactivated both HHV-6A and HHV-6B by UV-irradiation and analyzed their effects on the induction of HERV-K18 and HERV-W *env* in different cell types. Interestingly, both infectious and UV-inactivated HHV-6 induced HERV *env* in similar levels in either HSB2 cells (Figure 3A) or PBL and monocytes (Figure 3B), suggesting that full virus replication cycle is not required for the induction of HERV *env*.

As both HHV-6A and B were shown to use the cell surface protein CD46 as a cellular receptor, we then analyzed whether the direct stimulation of this protein may result in the same effect as HHV-6 infection. We used several CD46 ligands, including UV-inactivated measles virus, (MV, Edmonston strain), C3b component of the complement system and anti-CD46 monoclonal antibody (mAb) (Figure 4). Interestingly, both MV-UV and anti-CD46 mAb had an effect similar to that of HHV-6A-UV in HSB2 cells (Figure 4A). On the contrary, the stimulation with reagents known to activate T cells, including anti-CD3 mAb or recombinant human IL-2 did not have any effect in these cells (data not shown). Moreover, all tested CD46 ligands, HHV-6A-UV, HHV-6B-UV, MV-UV, anti-CD46 and C3b induced HERV *env* expression in PBMCs, suggesting that the engagement of CD46 is sufficient to induce the HERV *env* transactivation, in both human lymphoid cell line and primary cells.

### **CD46 engagement transactivates HERV *env* in human neural cells**

As the role of HERV *env* seems to be particularly important in the context of neurological diseases, we next analyzed whether stimulation of CD46 may induce the HERV *env* expression in neural cell types. We thus analyzed HERV *env* expression in the neural cell lines U-87 MG (glioblastoma-astrocytoma) and SH-SY5Y (neuroblastoma), which are both permissive to the infection by HHV-6A and B. Indeed, viral inoculation in these cells led to the production of viral RNA and to the formation of syncytia (Figure 1S). Interestingly, a high increase in HERV-W *env* expression was observed after HHV-6A infection in U-87 MG cells (Figure 5). In contrast to lymphocytes and monocytes, HHV-6A and B infection had low effect on the expression of HERV-K18 *env* in these cells. However, engagement of CD46 with mAb strongly transactivated both HERV-K18 and HERV-W *env*. In the neuroblastoma cell line SH-SY5Y, both HHV-6 and anti-CD46 had an effect on HERV-K18 *env*, although much lower than in other cell types. Stimulation of other neural cell lines, including SH-SHEP, U343 and A172, did not give reproducible results (data not shown).

## **DISCUSSION**

The interplay between a host and its pathogens forges an arms race that has been precariously kept at equilibrium by the force of evolution. Work in the past decades unraveled the complex molecular mechanisms of such reciprocity with many emerging paradigms, however the regulation of the expression and function of human endogenous retroviral genes and their potential link to different diseases remains rather puzzling. This

study supports the association between HHV-6 infection and HERV gene expression. First, our results confirm the increase in HERV-K18 *env* expression after HHV-6A and HHV-6B observed in previous studies respectively in HSB2 cells and PBMC [33,34]. Moreover we present here a first analysis of HERV-W *env* modulation following HHV-6 infection in several human cell types.

Although a high variability in expression was observed among different experiments, potentially linked with variability in the donors of primary cells and the different efficiencies of the qPCR techniques for the analyzed genes, our results indicate a clear tendency towards an up-regulation of HERV-W *env* expression. After HHV-6A infection, both MSR *env* and *syn-1* expression were found to be increased in HSB2 cells, as well as in primary cells. HERV-W *env* genes were also upregulated by HHV-6B infection in both CBMC and PBMC. The specific analysis of lymphocytes and monocytes revealed a low increase in HERV-W *env* in both cell types. In contrast with previous reports [33], K18 *env* was found to be preferentially increased in PBL, and not in monocytes, highlighting the complexity of the regulation of HERV expression.

Both HERV-W and HERV-K18 *env* augmentations were shown to be independent from HHV-6A or HHV-6B replication, and the stimulation with other CD46 ligands, including inactivated measles virus and anti-CD46 antibody, up-regulated their expression as well. This strongly suggests that HERV-K18 and HERV-W *env* up-regulation could be triggered through a direct interaction between CD46 and HHV-6 or other ligands. Indeed, CD46 is known to induce different intra-cellular signals which can lead to diverse changes in cellular activities [40–42]. The induction of HERV-W *env* expression in neural cells was shown to require the NF- $\kappa$ B pathway [20]. However, CD46 engagement may not result in the activation of this pathway in neuronal cells [43], suggesting the other signaling pathway, leading to the HERV induction, which remains to be determined. As other herpesviruses which do not bind CD46, were also shown to activate HERV-W *env* expression [16,20], other membrane receptors and signaling cascades may be involved. The up-regulation of HERV-W *env* by both HHV-6 and EBV was shown to be independent from viral replication, thus it is possible that recognition of these viruses by innate immune receptors could either directly activate HERV-W gene transcription, or induce pro-inflammatory cellular responses, which are thought to possibly induce HERV-W *env* transcription.

The data obtained in this study are particularly interesting in the context of MS. Indeed, many clinical studies have shown that HHV-6 DNA presence is detected more frequently in the blood of MS patients than in healthy donors [22,24,28], which suggests an association between HHV-6 infection and MS pathogenesis. MSR transcripts and antigens

have also been detected more frequently and in higher levels in the blood of MS patients [9–11,44]. Our results then support the hypothesis that HHV-6 infection in peripheral blood of MS patients could induce the transcription of MSR/V genes, which may in turn participate in the establishment of this inflammatory disease. Indeed, although we do not show here a production of HERV-W ENV protein in this study, an overexpression of MSR/V *env* gene in T cells may lead to the production of MSR/V ENV protein, which could potentially participate in the activation of immune responses in T cells. MSR/V ENV was shown to possess superantigen activity, which can induce polyclonal T cell activation [13]. The extracellular part of MSR/V-ENV is also able to trigger TLR4 signaling in primary human monocytes and DC, which can then promote the generation of pro-inflammatory phenotypes in T cells [14].

Interestingly, the results obtained in human neural cell lines show a remarkably high increase in HERV-W *env* expression after HHV-6A infection in U-87 MG glioblastoma cells. The infection of other neural cell lines did not result in comparable augmentations. In addition, Mameli et al. have also reported an upregulation of MSR/V *env* and *syn-1* in U87-MG cells after EBV infection [20], thus indicating that HERV-W *env* expression may be particularly sensitive to viral infections in specific types of glial cells. The high increase in HERV-W *env* in neural cell line suggests that HHV-6A could have a greater impact on brain glial cells than on lymphoid cells. This result is of high interest in the field of MS, as HHV-6 infection in the CNS has been associated to MS by numerous studies. HHV-6 DNA levels are indeed increased in the CSF of MS patients [21,45]. Moreover, HHV-6 DNA, transcripts and antigens are found more frequently in the brain of MS patients, and are associated to affected areas of the especially in the areas of active lesion [25–27]. HERV-W *env*, especially syncytin-1, was shown to be expressed in the brain of MS patients as well, and more particularly in activated glial cells [15,46,47]. Some studies have demonstrated that Syncytin has strong neuroinflammatory and neurodegenerative properties when expressed in astrocytes, notably through the induction of redox reactants release, which can cause death oligodendrocytes [46,48]. HHV-6 infection in the brain has been related to MS pathology, but is also known to cause other neuroinflammatory disorders, including encephalitis, and meningitis [49–51]. The induction of HERV-W *env* by HHV-6 in brain cells observed in this study therefore provides a potential mechanism explaining the association between HHV-6 infection and neuroinflammatory diseases.

CD46 is expressed ubiquitously and functions as a co-factor in the factor I-mediated proteolytic cleavage of C3b and C4b. Its vital role in preventing complement deposition on host tissue is underpinned by the fact that deficiency of CD46 is a predisposing factor for numerous disease conditions arising from complement-mediated 'self-attack' [52].

Furthermore, the Notch family member Jagged 1 was described recently to be another physiological ligand of CD46 [53]. Finally, in addition to HHV-6 several other human pathogens use CD46 as a receptor, including adenovirus, measles virus, Streptococci and Neisseria [54]. Our results suggest that engagement of CD46 with different ligands, including viruses as well as its natural ligand C3b and mAb could transactivate of HERV genes in both human lymphocytes and neural cells. CD46-induced *env* production may be involved in the inflammatory process and play the role in the pathogenesis of viral and bacterial infections, both those that use CD46 as a receptor, and the others where production of C3b component of the complement is induced. Furthermore, measles virus vaccine strain-induced production of proinflammatory *env* may contribute to the induction of the efficient anti-viral responses, following anti-measles vaccination. Our data thus reveal new outcome of CD46 stimulation, which could play an important role in inflammatory processes. As pro-inflammatory responses to CD46 engagement are increased in patients with MS [55], understanding the role of CD46 in the induction of HERV-encoded proinflammatory proteins may give some new insights in the field.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The work was supported by INSERM and Cluster de Recherche « Infectiologie » and JR was supported by a doctoral fellowship from the French ministry of research. Authors thank, I. Grosjean from CelluloNet facility, SFR Biosciences Gerland-Lyon Sud (UMS344/US8), M.B. Villiers for the production of C3B, D. Gerlier and members of the CIRI INSERM-U1111 group “Immunobiology of viral infections” for their help in the achievement of this study.

## REFERENCES

1. Bannert N, Kurth R (2004) Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 Suppl 2: 14572–14579. doi:10.1073/pnas.0404838101.
2. Seifarth W, Frank O, Zeifelder U, Spiess B, Greenwood AD, et al. (2005) Comprehensive analysis of human endogenous retrovirus transcriptional activity in human tissues with a retrovirus-specific microarray. *J Virol* 79: 341–352. doi:10.1128/JVI.79.1.341-352.2005.
3. Frank O, Giehl M, Zheng C, Heilmann R, Leib-Mösch C, et al. (2005) Human endogenous retrovirus expression profiles in samples from brains of patients with schizophrenia and bipolar disorders. *J Virol* 79: 10890–10901. doi:10.1128/JVI.79.17.10890-10901.2005.

4. Perron H, Mekaoui L, Bernard C, Veas F, Stefas I, et al. (2008) Endogenous retrovirus type W GAG and envelope protein antigenemia in serum of schizophrenic patients. *Biol Psychiatry* 64: 1019–1023. doi:10.1016/j.biopsych.2008.06.028.
5. Balada E, Vilardell-Tarrés M, Ordi-Ros J (2010) Implication of human endogenous retroviruses in the development of autoimmune diseases. *Int Rev Immunol* 29: 351–370. doi:10.3109/08830185.2010.485333.
6. Perron H, Geny C, Laurent A, Mouriquand C, Pellat J, et al. (1989) Leptomeningeal cell line from multiple sclerosis with reverse transcriptase activity and viral particles. *Res Virol* 140: 551–561.
7. Perron H, Lalande B, Gratacap B, Laurent A, Genoulaz O, et al. (1991) Isolation of retrovirus from patients with multiple sclerosis. *Lancet* 337: 862–863.
8. Perron H, Garson JA, Bedin F, Beseme F, Paranhos-Baccala G, et al. (1997) Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 7583–7588.
9. Garson JA, Tuke PW, Giraud P, Paranhos-Baccala G, Perron H (1998) Detection of virion-associated MSR-V-RNA in serum of patients with multiple sclerosis. *Lancet* 351: 33.
10. Serra C, Sotgiu S, Mameli G, Pugliatti M, Rosati G, et al. (2001) Multiple sclerosis and multiple sclerosis-associated retrovirus in Sardinia. *Neurol Sci* 22: 171–173.
11. Dolei A, Serra C, Mameli G, Pugliatti M, Sechi G, et al. (2002) Multiple sclerosis-associated retrovirus (MSRV) in Sardinian MS patients. *Neurology* 58: 471–473.
12. Sotgiu S, Arru G, Mameli G, Serra C, Pugliatti M, et al. (2006) Multiple sclerosis-associated retrovirus in early multiple sclerosis: a six-year follow-up of a Sardinian cohort. *Mult Scler* 12: 698–703.
13. Perron H, Jouvin-Marche E, Michel M, Ounanian-Paraz A, Camelo S, et al. (2001) Multiple sclerosis retrovirus particles and recombinant envelope trigger an abnormal immune response in vitro, by inducing polyclonal Vbeta16 T-lymphocyte activation. *Virology* 287: 321–332. doi:10.1006/viro.2001.1045.
14. Rolland A, Jouvin-Marche E, Viret C, Faure M, Perron H, et al. (2006) The envelope protein of a human endogenous retrovirus-W family activates innate immunity through CD14/TLR4 and promotes Th1-like responses. *J Immunol* 176: 7636–7644.
15. Mameli G, Astone V, Arru G, Marconi S, Lovato L, et al. (2007) Brains and peripheral blood mononuclear cells of multiple sclerosis (MS) patients hyperexpress MS-associated retrovirus/HERV-W endogenous retrovirus, but not Human herpesvirus 6. *J Gen Virol* 88: 264–274. doi:10.1099/vir.0.81890-0.

16. Ruprecht K, Obojes K, Wengel V, Gronen F, Kim KS, et al. (2006) Regulation of human endogenous retrovirus W protein expression by herpes simplex virus type 1: implications for multiple sclerosis. *J Neurovirol* 12: 65–71. doi:10.1080/13550280600614973.
17. Nellåker C, Yao Y, Jones-Brando L, Mallet F, Yolken RH, et al. (2006) Transactivation of elements in the human endogenous retrovirus W family by viral infection. *Retrovirology* 3: 44. doi:10.1186/1742-4690-3-44.
18. Lee WJ, Kwun HJ, Kim HS, Jang KL (2003) Activation of the human endogenous retrovirus W long terminal repeat by herpes simplex virus type 1 immediate early protein 1. *Mol Cells* 15: 75–80.
19. Sutkowski N, Conrad B, Thorley-Lawson DA, Huber BT (2001) Epstein-Barr virus transactivates the human endogenous retrovirus HERV-K18 that encodes a superantigen. *Immunity* 15: 579–589.
20. Mamei G, Poddighe L, Mei A, Uleri E, Sotgiu S, et al. (2012) Expression and activation by Epstein Barr virus of human endogenous retroviruses-W in blood cells and astrocytes: inference for multiple sclerosis. *PLoS ONE* 7: e44991. doi:10.1371/journal.pone.0044991.
21. Wilborn F, Schmidt CA, Brinkmann V, Jendroska K, Oettle H, et al. (1994) A potential role for human herpesvirus type 6 in nervous system disease. *J Neuroimmunol* 49: 213–214.
22. Soldan SS, Berti R, Salem N, Secchiero P, Flamand L, et al. (1997) Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nat Med* 3: 1394–1397.
23. Ablashi DV, Lusso P, Hung CL, Salahuddin SZ, Josephs SF, et al. (1988) Utilization of human hematopoietic cell lines for the propagation and characterization of HBLV (human herpesvirus 6). *Int J Cancer* 42: 787–791.
24. Garcia-Montojo M, Martinez A, De Las Heras V, Dominguez-Mozo MI, Cenit M del C, et al. (2011) Herpesvirus active replication in multiple sclerosis: a genetic control? *J Neurol Sci* 311: 98–102. doi:10.1016/j.jns.2011.09.001.
25. Challoner PB, Smith KT, Parker JD, MacLeod DL, Coulter SN, et al. (1995) Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7440–7444.
26. Opsahl ML, Kennedy PGE (2005) Early and late HHV-6 gene transcripts in multiple sclerosis lesions and normal appearing white matter. *Brain* 128: 516–527. doi:10.1093/brain/awh390.
27. Goodman AD, Mock DJ, Powers JM, Baker JV, Blumberg BM (2003) Human herpesvirus 6 genome and antigen in acute multiple sclerosis lesions. *J Infect Dis* 187: 1365–1376. doi:10.1086/368172.
28. Chapenko S, Millers A, Nora Z, Logina I, Kukaine R, et al. (2003) Correlation between HHV-6 reactivation and multiple sclerosis disease activity. *J Med Virol* 69: 111–117. doi:10.1002/jmv.10258.

29. Alvarez-Lafuente R, De las Heras V, Bartolomé M, Picazo JJ, Arroyo R (2004) Relapsing-remitting multiple sclerosis and human herpesvirus 6 active infection. *Arch Neurol* 61: 1523–1527. doi:10.1001/archneur.61.10.1523.
30. Berti R, Brennan MB, Soldan SS, Ohayon JM, Casareto L, et al. (2002) Increased detection of serum HHV-6 DNA sequences during multiple sclerosis (MS) exacerbations and correlation with parameters of MS disease progression. *J Neurovirol* 8: 250–256. doi:10.1080/13550280290049615-1.
31. Brudek T, Lühdorf P, Christensen T, Hansen HJ, Møller-Larsen A (2007) Activation of endogenous retrovirus reverse transcriptase in multiple sclerosis patient lymphocytes by inactivated HSV-1, HHV-6 and VZV. *J Neuroimmunol* 187: 147–155. doi:10.1016/j.jneuroim.2007.04.003.
32. Brudek T, Christensen T, Hansen HJ, Bobecka J, Møller-Larsen A (2004) Simultaneous presence of endogenous retrovirus and herpes virus antigens has profound effect on cell-mediated immune responses: implications for multiple sclerosis. *AIDS Res Hum Retroviruses* 20: 415–423. doi:10.1089/088922204323048168.
33. Turcanova VL, Bundgaard B, Höllsberg P (2009) Human herpesvirus-6B induces expression of the human endogenous retrovirus K18-encoded superantigen. *J Clin Virol* 46: 15–19. doi:10.1016/j.jcv.2009.05.015.
34. Tai AK, Luka J, Ablashi D, Huber BT (2009) HHV-6A infection induces expression of HERV-K18-encoded superantigen. *J Clin Virol* 46: 47–48. doi:10.1016/j.jcv.2009.05.019.
35. Marni G, Poddighe L, Astone V, Delogu G, Arru G, et al. (2009) Novel reliable real-time PCR for differential detection of MSR<sub>V</sub>env and syncytin-1 in RNA and DNA from patients with multiple sclerosis. *J Virol Methods* 161: 98–106. doi:10.1016/j.jviromet.2009.05.024.
36. Villaudy J, Wencker M, Gadot N, Gillet NA, Scoazec J-Y, et al. (2011) HTLV-1 propels thymic human T cell development in “human immune system” Rag2<sup>-/-</sup> gamma c<sup>-/-</sup> mice. *PLoS Pathog* 7: e1002231. doi:10.1371/journal.ppat.1002231.
37. Villiers MB, Villiers CL, Wright JF, Maison CM, Colomb MG (1991) Formation of covalent C3b-tetanus toxin complexes: a tool for the in vitro study of antigen presentation. *Scand J Immunol* 34: 585–595.
38. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, et al. (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55: 611–622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797.
39. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* 25: 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262.

40. Zaffran Y, Destaing O, Roux A, Ory S, Nheu T, et al. (2001) CD46/CD3 costimulation induces morphological changes of human T cells and activation of Vav, Rac, and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase. *J Immunol* 167: 6780–6785.
41. Sánchez A, Feito MJ, Rojo JM (2004) CD46-mediated costimulation induces a Th1-biased response and enhances early TCR/CD3 signaling in human CD4+ T lymphocytes. *Eur J Immunol* 34: 2439–2448. doi:10.1002/eji.200324259.
42. Oliaro J, Pasam A, Waterhouse NJ, Browne KA, Ludford-Menting MJ, et al. (2006) Ligation of the cell surface receptor, CD46, alters T cell polarity and response to antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 18685–18690. doi:10.1073/pnas.0602458103.
43. Fang YY, Song ZM, Dhib-Jalbut S (2001) Mechanism of measles virus failure to activate NF-kappaB in neuronal cells. *J Neurovirol* 7: 25–34.
44. Perron H, Germe R, Bernard C, Garcia-Montojo M, Deluen C, et al. (2012) Human endogenous retrovirus type W envelope expression in blood and brain cells provides new insights into multiple sclerosis disease. *Mult Scler* 18: 1721–1736. doi:10.1177/1352458512441381.
45. Ablashi DV, Lapps W, Kaplan M, Whitman JE, Richert JR, et al. (1998) Human Herpesvirus-6 (HHV-6) infection in multiple sclerosis: a preliminary report. *Mult Scler* 4: 490–496.
46. Antony JM, Van Marle G, Opii W, Butterfield DA, Mallet F, et al. (2004) Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination. *Nat Neurosci* 7: 1088–1095. doi:10.1038/nn1319.
47. Antony JM, Izad M, Bar-Or A, Warren KG, Vodjgani M, et al. (2006) Quantitative analysis of human endogenous retrovirus-W env in neuroinflammatory diseases. *AIDS Res Hum Retroviruses* 22: 1253–1259. doi:10.1089/aid.2006.22.1253.
48. Antony JM, Ellestad KK, Hammond R, Imaizumi K, Mallet F, et al. (2007) The human endogenous retrovirus envelope glycoprotein, syncytin-1, regulates neuroinflammation and its receptor expression in multiple sclerosis: a role for endoplasmic reticulum chaperones in astrocytes. *J Immunol* 179: 1210–1224.
49. Zerr DM (2006) Human herpesvirus 6 and central nervous system disease in hematopoietic cell transplantation. *J Clin Virol* 37 Suppl 1: S52–56. doi:10.1016/S1386-6532(06)70012-9.
50. Zerr DM, Gooley TA, Yeung L, Huang ML, Carpenter P, et al. (2001) Human herpesvirus 6 reactivation and encephalitis in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Clin Infect Dis* 33: 763–771. doi:10.1086/322642.
51. Matsumoto H, Hatanaka D, Ogura Y, Chida A, Nakamura Y, et al. (2011) Severe human herpesvirus 6-associated encephalopathy in three children: analysis of cytokine profiles and the

carnitine palmitoyltransferase 2 gene. *Pediatr Infect Dis J* 30: 999–1001. doi:10.1097/INF.0b013e3182242065.

52. Atkinson JP (1989) Complement deficiency: predisposing factor to autoimmune syndromes. *Clin Exp Rheumatol* 7 Suppl 3: S95–101.

53. Le Friec G, Sheppard D, Whiteman P, Karsten CM, Shamoun SA-T, et al. (2012) The CD46-Jagged1 interaction is critical for human TH1 immunity. *Nat Immunol* 13: 1213–1221. doi:10.1038/ni.2454.

54. Cattaneo R (2004) Four viruses, two bacteria, and one receptor: membrane cofactor protein (CD46) as pathogens' magnet. *J Virol* 78: 4385–4388.

55. The Dynamic Processing of CD46 Intracellular Domai... [PLoS One. 2011] - PubMed result (n.d.). Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21283821>. Accessed 7 February 2011.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. HHV-6A infection induces HERV-W *env* and HERV-K18 *env* HSB2 cell line and in CBMC.** (A) HSB2 cells were infected with HHV-6A at MOI 3 and analyzed 24, 48 or 72 h post infection (p.i.) by RT-qPCR for the expression of HERV-K18 *env*. The values are expressed relative to those in mock-infected HSB2 cells (control). Error bars represent SD of duplicate wells. (B) HSB2 cells were infected with HHV-6A at MOI 3 for 48h and HERV-K18 *env*, HERV-W *env*, MSR *env* and Syncytin-1 expression were analyzed by RT-qPCR. (C) Cord blood mononuclear cells were with HHV-6A at MOI 3 and analyzed 24 and 48h p.i. by RT-qPCR for the expression of HERV-K18 *env*, HERV-W *env*, MSR *env* and Syncytin-1. The values are expressed relative to those in mock-infected CBMC cells (control). Error bars represent SD of duplicate wells. Data are representative of three independent experiments.

**Figure 2. HHV-6B infection induces expression of HERV-K18 *env* and HERV-W *env* in human CBMC, PBL and monocytes.** (A) CBMCs (cord blood mononuclear cells) were infected by HHV-6B for 24 or 48h and levels of HERV-K18 *env*, HERV-W *env*, MSR *env* and Syncytin-1 were analyzed by RT-qPCR and expressed relative to those in mock-infected cells (control). The data are representative of three independent experiments. Error bars represent SD of duplicate wells. (B) Human PBL and monocytes were infected by HHV-6B for 24 or 48h. Levels of HERV-K18 *env* or HERV-W *env* mRNA were analyzed by RT-qPCR and expressed relative to those in mock-infected cells (control). The data are representative of three independent experiments. Error bars represent SD of duplicate wells.

**Figure 3. HHV-6 induction of HERV expression is independent of a viral replication.** (A) Expressions of HERV-K18 *env* and HERV-W *env* are increased in HSB2 cells after both HHV-6A infection and stimulation with UV-inactivated HHV-6A for 48h. (B) Expression of HERV-K18 *env* and HERV-W *env* in PBL or monocytes is increased both after infection by HHV-6B or stimulation with UV-inactivated HHV-6B for 24h. RT-qPCR data are expressed relative to mock-infected cells (control) and error bars represent SD of duplicate wells. The data are representative of three independent experiments.

**Figure 4. HERV-W *env* or HERV-K18 *env* expression is induced following engagement of CD46 with different ligands.** HSB2 cells (A) or PBMC (B) were stimulated by UV-inactivated HHV-6A, HHV-6B (for PBMC), Measles Virus (MV-UV) or with anti-CD46 mAb (pre-coated at 75 µg/mL) or the isotype control MOPC, or with soluble C3b complement factor at (30 µg/ml) for 48h. Levels of HERV-K18 *env* or HERV-W *env* were analyzed by RT-qPCR. Error bars represent SD of duplicate wells. The data are representative of three independent experiments.

**Figure 5. Transactivation of HERV-K18 and HERV-W *env* in neural cells.** U-87 (A) and SH-SY5Y (B) cells were infected with HHV-6A or HHV-6B at MOI 0.2, or stimulated with UV-inactivated HHV-6A or soluble anti-CD46 mAb (20 µg/ml). Levels of HERV-K18 *env* and HERV-W *env* mRNA was analyzed 48h later.

## SUPPLEMENTARY FIGURES

**Figure S1. Infection of U87 and SH-SY5Y cells by HHV-6A or HHV-6B.** U-87 MG glioblastoma cells, and SH-SY5Y neuroblastoma cells were infected with HHV-6A or HHV-6B at MOI 0,2. (A) HHV-6A induces syncytia formation in both U87 and SH-SY5Y cells. (B) At 24, 48 and 72 hours post-infection, mRNA expression of the viral genes U79, U94 and U100 were analyzed by qPCR and normalized to GAPDH. Means of duplicate wells are plotted.

## FIGURES

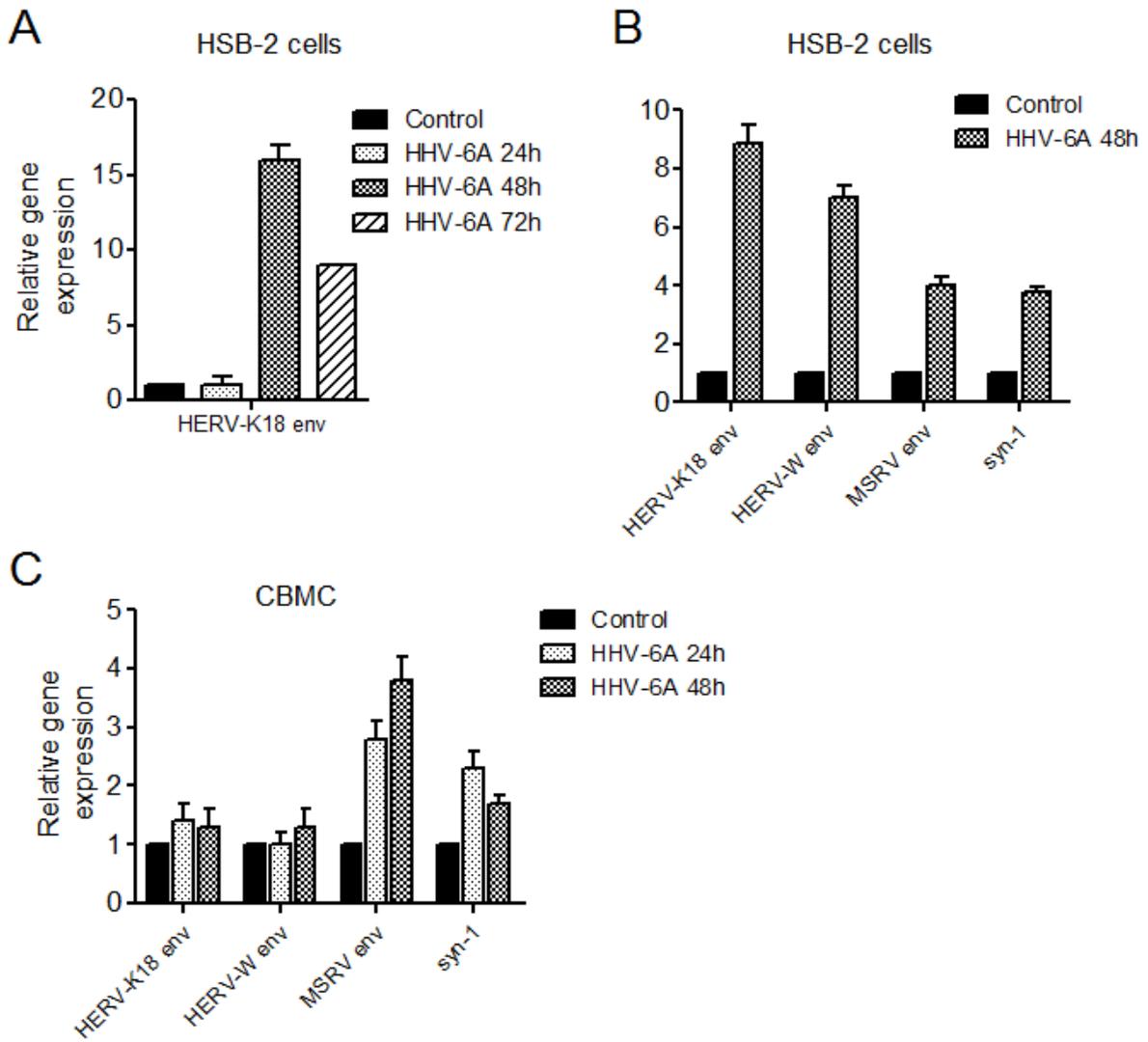
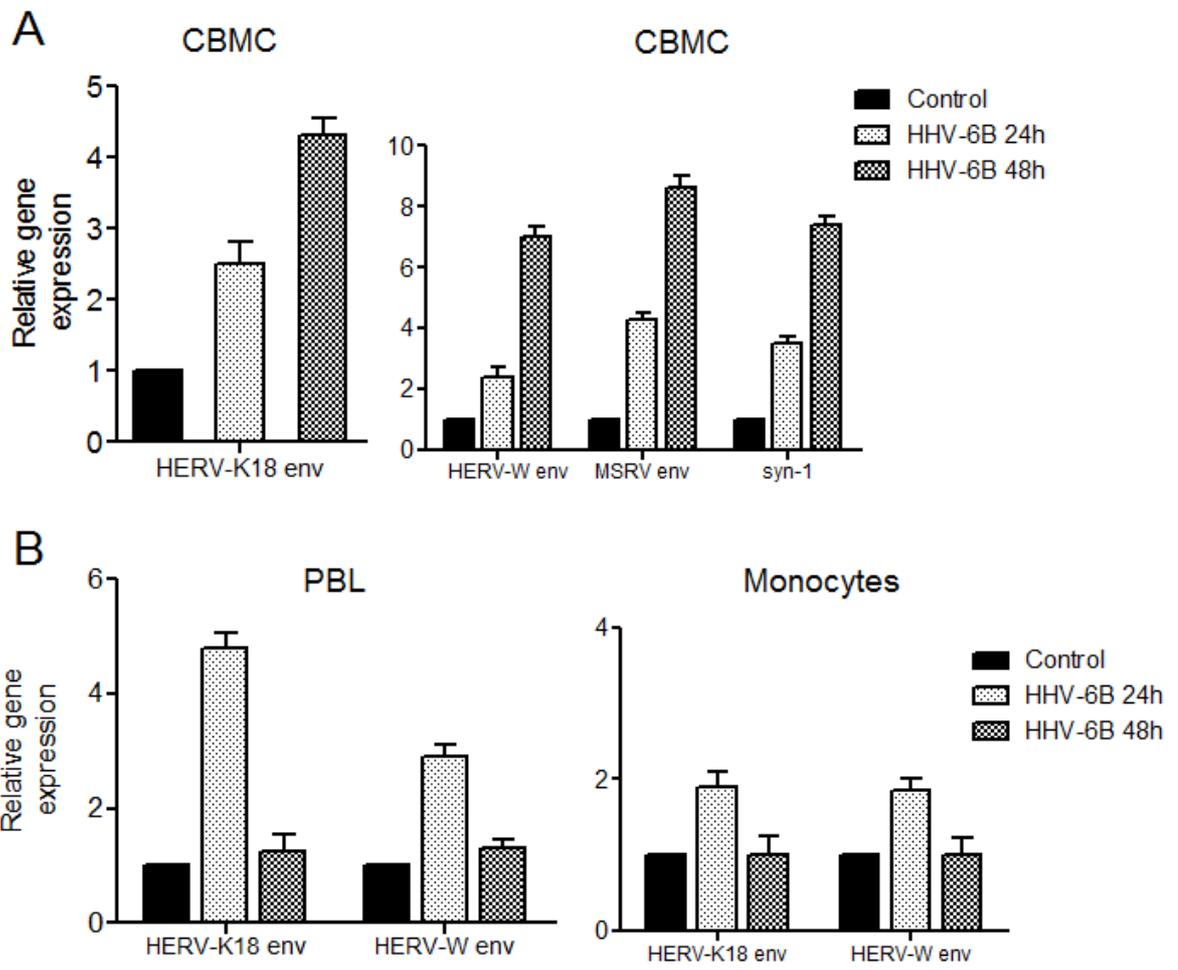
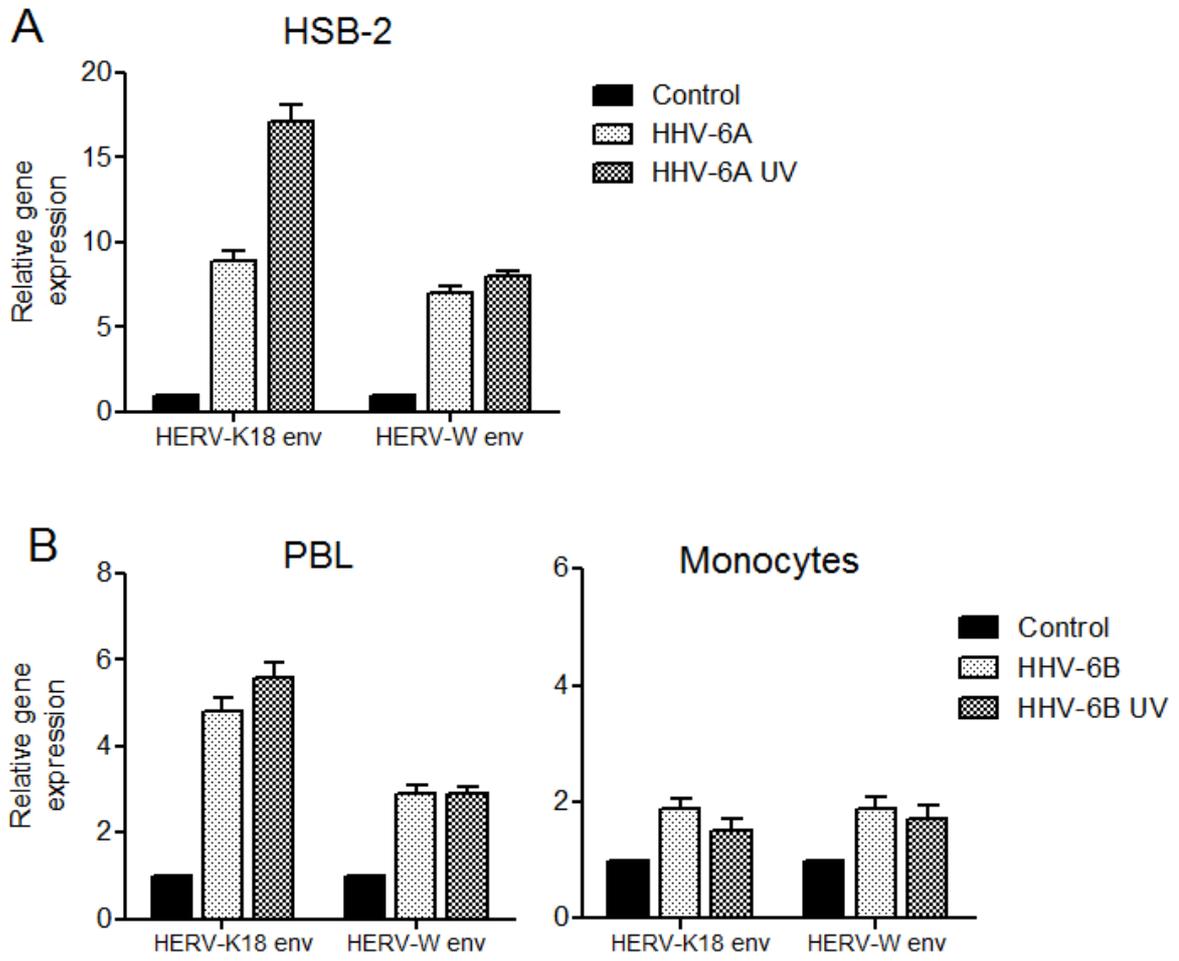


Figure 1



**Figure 2**



**Figure 3**

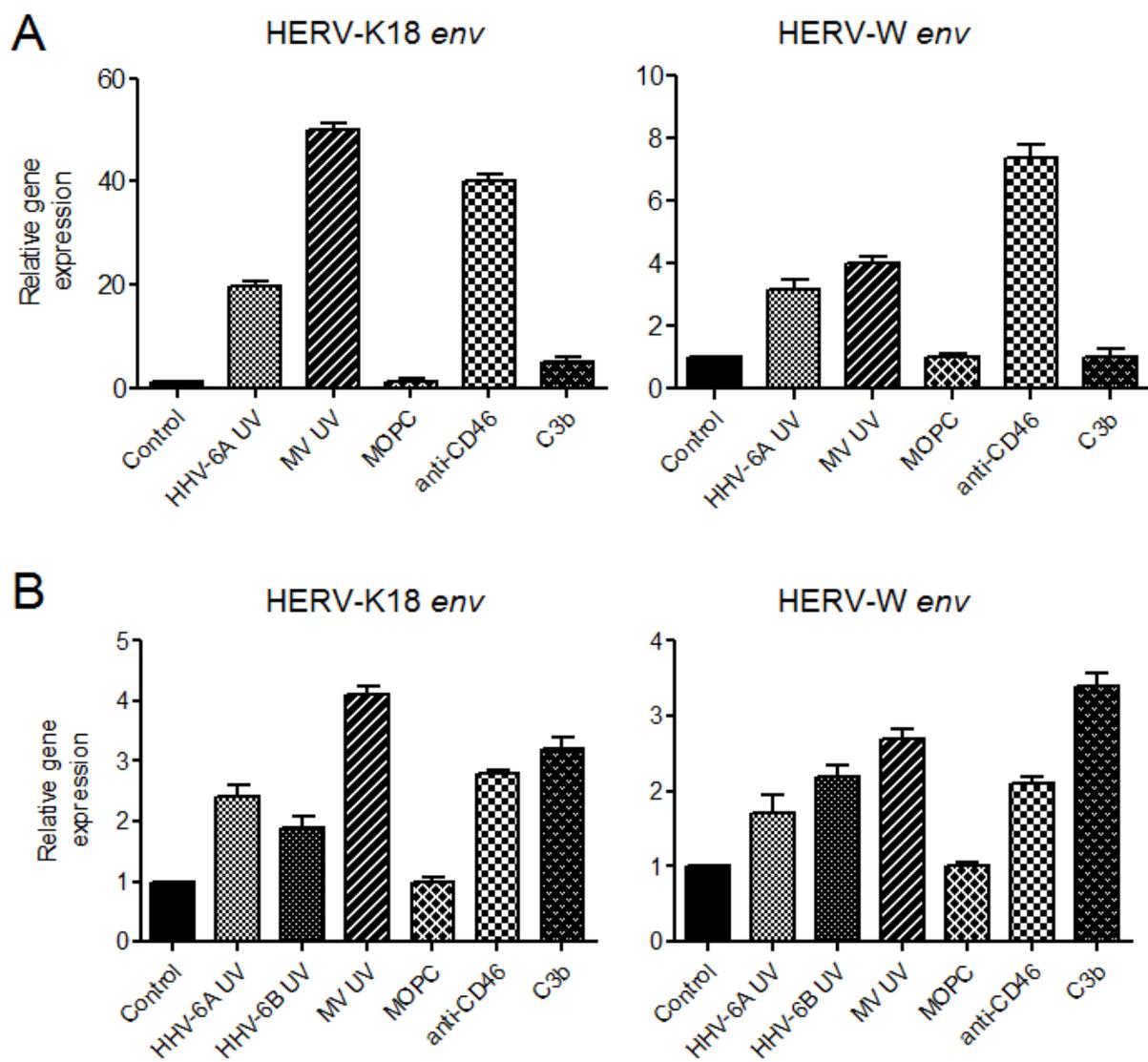


Figure 4

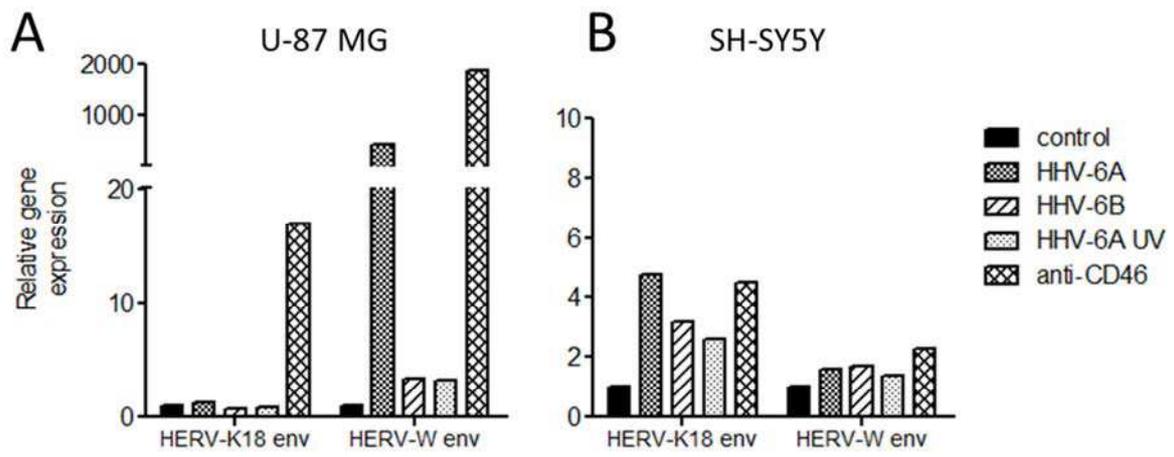


Figure 5

SUPPLEMENTARY FIGURE

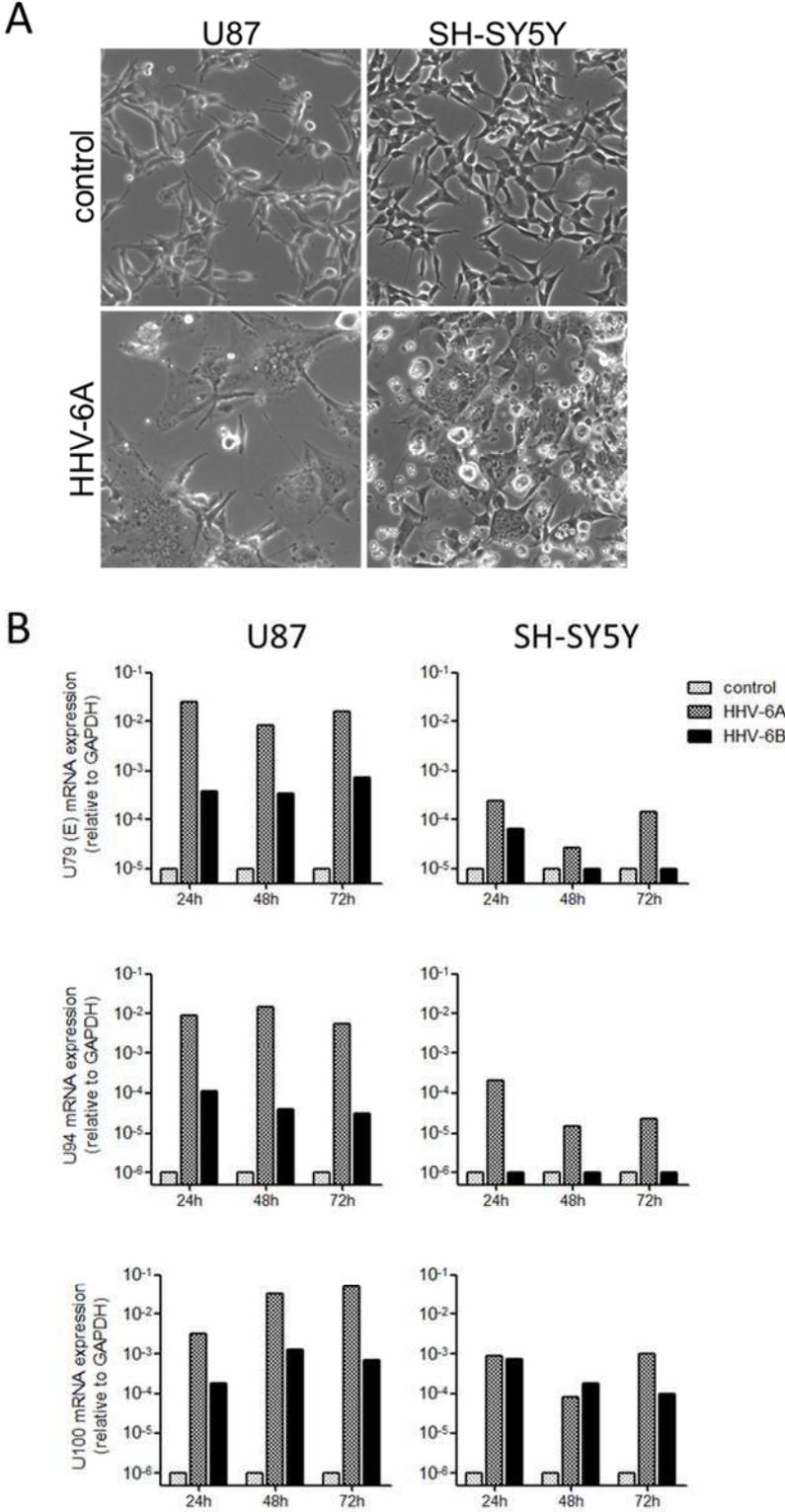
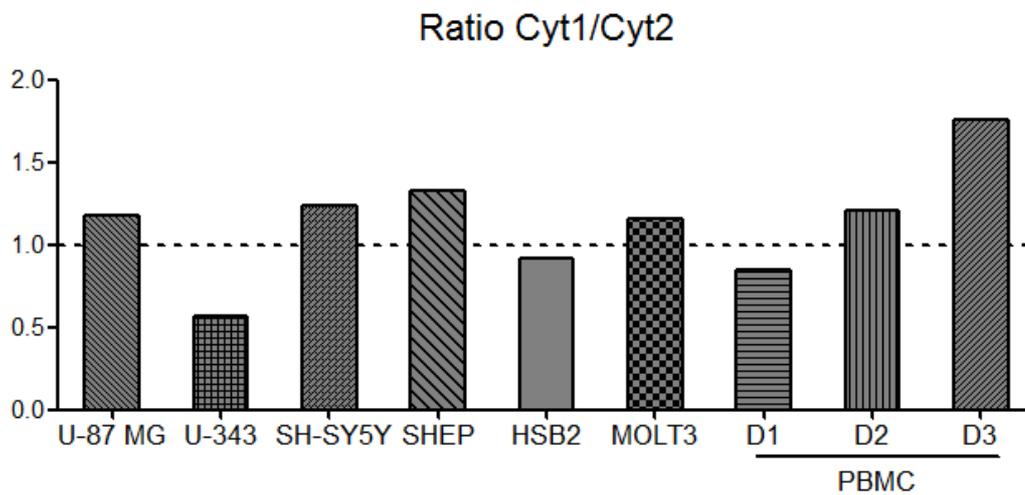


Figure S1

## Résultats supplémentaires

Les résultats présentés dans l'article 2 suggèrent que l'engagement de la protéine transmembranaire CD46 active l'expression de gènes *env* de rétrovirus endogènes. De plus, l'augmentation induite par la stimulation de CD46 semble particulièrement exacerbée dans la lignée neurale de glioblastome U-87 MG. Dans le cerveau, seule l'expression de l'isoforme Cyt2 de CD46 a été rapportée (Johnstone et al., 1993). Afin de déterminer si l'effet de l'engagement de CD46 sur l'expression des *env* est lié au domaine cytoplasmique exprimé, nous avons analysé en qPCR la production des transcrits CD46-Cyt1 et CD46-Cyt2 dans différents types cellulaires (figure 21). Dans toutes les cellules testées, la production des deux isoformes a été détectée. Dans les cellules U87-MG, les productions de Cyt1 et Cyt2 semblent similaires, puisque le rapport entre l'expression de Cyt1 et l'expression de Cyt2 (Cyt1/Cyt2) est proche de 1. De même, le ratio Cyt1/Cyt2 est proche de 1 dans les lignées lymphoïdes HSB2 et MOLT3, et dans les lignées de neuroblastome SHEP et SH-SY5Y. Dans la lignée de glioblastome U-343, CD46-Cyt2 semble majoritaire (ratio Cyt1/Cyt2  $\sim 0,5$ ). Nous avons de plus analysé l'expression de Cyt1 et Cyt2 dans les PBMC de trois donneurs. Pour l'un d'eux, seulement, l'isoforme Cyt1 semble exprimé en plus grande quantité (ratio Cyt1/Cyt2  $> 1,5$ ). Nous avons comparé ces différents ratios avec l'efficacité de l'activation des *env* via l'engagement de CD46 (non présenté ici), et n'avons pas observé de corrélation. Ainsi, la forte stimulation des *env* observée dans les cellules U-87 MG ne semble pas due à l'expression d'un domaine cytoplasmique de CD46 spécifique.



**Figure 21. Analyse de l'expression de CD46-Cyt1 et CD46-Cyt2 dans différents types cellulaires.** Les ARN totaux ont été extraits à partir de cellules U-87 MG, U-343 (glioblastome), SH-SY5Y, SHEP (neuroblastome), HSB2, MOLT3 (lymphocyte T), et de PBMC issues de trois donneurs (D1, D2, D3), puis retro-transcrits comme décrit précédemment (cf. article 1). Des amorces spécifiques de chaque isoforme (Astier et al., 2006) ont été utilisées pour quantifier l'expression de CD46-Cyt1 et CD46-Cyt2. Les réactions de qPCR ont été réalisées en duplicat avec le kit Platinum Sybr Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), sur un appareil Stepone Plus (Applied Biosystems). Les rapports Cyt1/Cyt2 sont présentés.

# Discussion et perspectives

---



Les travaux effectués au cours de cette thèse ont permis de mettre en évidence deux mécanismes pouvant expliquer l'implication d'HHV-6 dans des phénomènes de neuroinflammation. D'une part, cette étude décrit pour la première fois la caractérisation d'un modèle d'infection par HHV-6 chez la souris, et montre une divergence entre les espèces A et B d'HHV-6. De plus, ce modèle a permis de montrer la capacité du virus à induire la sécrétion de chimiokines par les cellules résidentes du SNC, et l'infiltration de leucocytes. D'autre part, la deuxième partie des résultats présentés ici suggère qu'HHV-6 pourrait également être impliqué dans les processus de neuroinflammation via des mécanismes encore peu connus d'activation de l'expression de protéines rétrovirales endogènes.

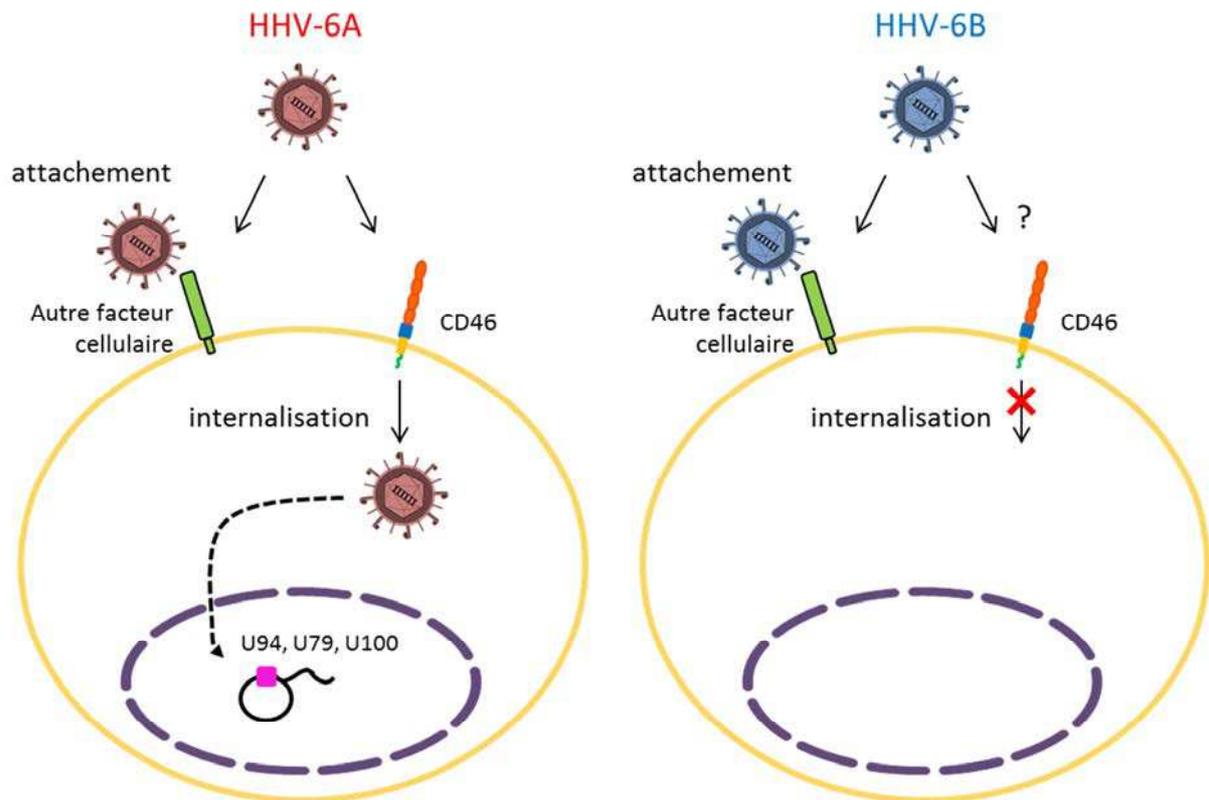
## **I. La souris CD46 transgénique comme modèle d'infection par HHV-6**

### **A. Infection des cellules murines CD46**

Nous avons dans un premier temps analysé l'infection de cellules murines M12 par HHV-6A, et observé qu'elle conduit à l'expression pendant plusieurs jours d'ARNm viraux, seulement lorsqu'elles expriment la protéine CD46. Ceci suggère que l'expression de CD46 par ces cellules permet l'entrée d'HHV-6A, et confirme les données précédentes obtenues par Santoro *et al.* avec la lignée de lymphocytes T murins EL-4 (Santoro et al., 1999). De plus, nous avons montré que ces ARN viraux sont exprimés suite à l'entrée du virus, puisque leur expression peut être bloquée par un traitement avec l'actinomycine D, qui inhibe la transcription par l'ARN polymérase. Lorsque CD46 est exprimé par les cellules murines, HHV-6A est donc internalisé, et son génome peut être transcrit. Toutefois, contrairement à ce qui est observé dans les lignées de lymphocytes T humains, aucun effet cytopathique n'a été observé dans ces cellules, et la quantité d'ADN viral dans les cultures décroît au cours du temps. Ceci montre que l'infection par HHV-6A dans les cellules M12-CD46 n'est pas productive et que le virus ne se réplique pas, bien que le gène U79, probablement impliqué dans la réplication virale (Taniguchi et al., 2000), ainsi que le gène de phase tardive U100 qui code pour une glycoprotéine d'enveloppe (Mori et al., 2003b), soient exprimés. La présence de transcrits du gène U94 est également détectée. Ce gène fait partie des quelques transcrits exprimés en cas de latence virale (Rotola et al., 1998), en l'absence de transcription de la plupart des autres gènes viraux. Ici, d'autres gènes habituellement exprimés lors d'infection productive sont exprimés. L'expression d'U94 ne permet donc pas de conclure

que l'infection par HHV-6A est latente. Ainsi, il est possible que l'infection des cellules M12-CD46 soit abortive, avec l'amorce d'un cycle répliatif, la transcription de gènes viraux, mais une absence de répliation du génome viral et de production de nouvelles particules (figure 22). Cette absence de cycle répliatif complet peut être due à l'absence chez la souris de certains facteurs cellulaires humains nécessaires à la répliation, ou au contraire à la présence de facteurs de restriction spécifiques à la souris, toutefois, ces facteurs n'ont pas été identifiés.

Les résultats obtenus avec les cellules gliales neurales primaires, générées à partir de souris CD46 transgéniques sont très similaires à ceux obtenus avec les cellules M12, et suggèrent ainsi que le même type d'infection se déroule dans ces cellules. Plusieurs études ont rapporté l'infection de cellules gliales humaines par HHV-6A. Si l'infection semble toujours productive dans les oligodendrocytes (Albright et al., 1998; Dietrich et al., 2004), quelques études mentionnent que l'infection d'astrocytes primaires humains avec un virus purifié (sans cellules) est non productive et sans effet cytopathique, contrairement à une infection effectuée par co-culture avec des lymphocytes infectés de façon productive (Meeuwsen et al., 2005). En se basant sur cette information, nous avons également effectué des co-cultures entre les cellules gliales murines et les lymphocytes humains infectés par HHV-6A, ce qui permet à la fois une production continue de grandes quantités de virus, et un contact cellule-cellule, qui facilite la propagation virale. Dans ces conditions, l'apparition de syncytia a été observée, ainsi que la présence de protéines virales dans le noyau des astrocytes. Ceci peut suggérer que les cellules gliales murines peuvent être infectées de façon productive par HHV-6A lorsqu'elles sont en contact avec de grandes quantités de virus. Des études ont montré qu'HHV-6A est capable d'induire la fusion cellulaire de façon CD46-dépendante, mais sans établir d'infection productive dans les cellules (Mori et al., 2002). L'apparition de polycaryocytes que nous observons n'est donc pas nécessairement liée à une infection productive. Lors de co-cultures entre lymphocytes infectés et astrocytes humains, une fusion entre les deux types cellulaires a été montrée, et dépend également de l'expression de CD46 (Cassiani-Ingoni et al., 2005). Dans notre système, il est ainsi probable que les lymphocytes humains puissent fusionner avec les cellules gliales murines. Le cytoplasme humain pourrait ainsi apporter les facteurs manquant aux cellules murines et permettrait une répliation virale complète. Nous avons de plus observé l'apparition de syncytia dans les cellules murines sauvages qui n'expriment pas CD46. Il serait donc possible qu'HHV-6A soit capable d'induire la fusion des cellules murines par d'autres moyens indépendants de CD46, et pourrait utiliser un autre récepteur d'entrée exprimé chez la souris, lorsqu'il est présent en grandes quantités.



**Figure 22. Schéma interprétatif des résultats d'infection par HHV-6A et HHV-6B de cellules murines exprimant CD46.** Dans le cas d'HHV-6A (partie gauche), le virus est internalisé grâce à son interaction avec CD46. Bien que nous ne l'ayons pas démontré dans cette étude, le génome viral serait ensuite potentiellement transporté jusqu'au noyau où plusieurs gènes viraux sont transcrits. Le génome viral n'est cependant pas répliqué. Dans le cas d'HHV-6B, la liaison éventuelle du virus à CD46 ne conduit probablement pas à son internalisation, puisque la transcription des gènes viraux n'est pas ou très peu détectée. HHV-6A et HHV-6B semble en revanche tous deux capables de s'attacher aux cellules murines par la liaison à d'autres facteurs présents à leur surface (autre protéine membranaire, glycosaminoglycanes...).

Aucune différence d'efficacité n'a été observée pendant l'infection par HHV-6A entre les cellules gliales qui expriment les isoformes CD46-Cyt1 et CD46-Cyt2, ce qui indique que la partie cytoplasmique de CD46 n'a pas d'importance dans la fusion qui fait suite à la liaison au récepteur, et est en accord avec les données de Mori *et al.*, qui montrent que seuls les domaines extracellulaires SCR2, 3 et 4 sont nécessaires à la fusion induite par HHV-6A (Mori et al., 2002).

Par ailleurs, en comparaison avec HHV-6A, l'expression de CD46 par les cellules murines a eu très peu d'influence sur l'infection par HHV-6B. Dans les cellules M12-CD46, de faibles niveaux d'ARN des gènes U79, U94 et U100 sont détectés à 24h post-infection et ne sont pas maintenus. De plus, l'expression du gène U79 est similaire dans les cultures de cellules gliales issues de souris CD46 transgéniques et de souris sauvages.

A la fois pour HHV-6A et pour HHV-6B, dans les cellules M12 et dans les cellules gliales, de l'ADN viral est détecté dans les cultures, même en l'absence de CD46. Il est probable que les deux virus puissent se lier à d'autres facteurs exprimés à la surface cellulaire et ainsi s'attacher aux cellules sans pour autant être internalisés (figure 24), à l'instar d'autres herpesvirus: HSV-1, par exemple, se lie à des glycosaminoglycanes via les protéines gB et gC, mais l'entrée et la fusion de l'enveloppe avec la membrane cellulaire nécessitent la liaison d'autres glycoprotéines virales à des récepteurs spécifiques (Akhtar and Shukla, 2009).

## **B. Infection *in vivo* chez la souris CD46-transgénique**

### Développement d'une réponse humorale anti-HHV-6

Afin de déterminer la susceptibilité des souris CD46 transgéniques à l'infection *in vivo* par HHV-6, nous avons ensuite inoculé ces souris avec les virus HHV-6A ou HHV-6B, par deux injections successives (la première intracrânienne et la seconde intra-péritonéale). Nous avons montré que toutes les souris, sauvages ou CD46 transgéniques, développent une réponse IgG suite à l'infection par HHV-6A. La réponse semble légèrement augmentée, bien que de façon non significative, chez les souris CD46 par rapport aux souris sauvages, ce qui pourrait traduire un effet de la liaison à CD46 dans le développement de la réponse humorale à l'infection. Aucune différence significative n'a été observée entre les souris exprimant les différents isoformes de la protéine, ce qui souligne à nouveau la moindre importance de la queue cytoplasmique de CD46 dans l'infection par HHV-6A. Avec le virus

inactivé, une réponse anticorps similaire est développée (données non présentées ici). Ceci indique que la réplication virale n'est pas nécessaire pour induire une réponse humorale, et est en accord avec les résultats de Svensson *et al*, qui montrent que l'injection intra-péritonéale de virus HHV-6B inactivé induit une réponse IgG dans des souris sauvages (Svensson et al., 2010).

Lorsque nous avons analysé l'infection dans les splénocytes des souris infectées, l'ADN viral a été détecté dans quelques souris, à des temps précoces après l'inoculation, mais très rarement et en faible quantité plus tardivement. Il est donc probable que dans notre système, l'injection intra-péritonéale de cellules infectées par HHV-6A ou HHV-6B soit responsable de l'induction d'une réponse anticorps anti-HHV-6, sans conduire à une infection virale répliquative en périphérie.

### Infection du SNC par HHV-6A

Svensson *et al.* mentionnent avoir tenté d'infecter des souris CD46 transgéniques avec le virus HHV-6B sans succès (Svensson et al., 2010). Dans notre étude, nous avons ciblé directement les cellules du SNC, qui font partie des cellules cibles des virus A et B, en injectant le virus par voie intracrânienne, et cette méthode nous a permis de mettre en évidence une importance de CD46 dans l'infection par HHV-6A. En effet, nous avons pu montrer que, dans le cerveau des souris CD46 transgéniques uniquement, le virus HHV-6A peut établir une forme de persistance pendant plusieurs mois. En accord avec les données *in vitro*, ceci suggère donc qu'HHV-6A peut infecter le cerveau murin sans être éliminé par le système immunitaire. En revanche, contrairement aux résultats obtenus avec les cultures gliales, nous n'avons pas détecté l'expression d'ARN viraux dans le cerveau des souris infectées. Ceci peut signifier que l'infection par HHV-6A *in vivo* ne conduit pas à la production d'ARN viraux. Une seconde possibilité serait que l'infection du SNC murin soit faible et/ou restreinte à certains types cellulaires ou à certaines régions du cerveau, de sorte que l'analyse des ARN totaux extraits à partir d'hémi-cerveaux ne permet pas leur détection. Chez l'Homme, la présence de transcrits viraux est détectée uniquement chez les individus présentant des pathologies du SNC (Ahtiluoto et al., 2000; Opsahl and Kennedy, 2005). Les souris infectées par HHV-6A n'ayant développé aucun signe clinique de maladie neurologique, l'absence d'ARN viraux est donc peu surprenante. L'absence de symptômes cliniques clairs de maladie chez les souris infectées n'est probablement pas spécifique à cet animal, puisque la plupart des études réalisées chez le singe rapportent uniquement des signes cliniques légers (Lusso et al., 2007; Yalcin et al., 1992). De même, chez l'homme les

pathologies sévères associées à l'infection par HHV-6A se déclenchent en général dans des conditions particulières, par exemple en cas d'immunosuppression (Zerr, 2006). Dans ce contexte, nous pourrions également émettre l'hypothèse que l'infection par HHV-6A est contrôlée par le système immunitaire murin, qui empêcherait la propagation et la réplication virale. Cependant nos résultats indiquent que la réponse immunitaire innée, en particulier l'IFN de type I ne semble pas jouer un rôle important dans ce contrôle. Il pourrait être intéressant d'analyser si l'absence de réponse adaptative permet la réplication virale chez la souris en déplaçant certains types de cellules immunitaires (e.g. lymphocytes T ou B). Néanmoins les travaux de Leibovitch *et al.* chez le singe suggèrent que les signes neurologiques observés suite à l'infection par HHV-6A sont liés à la réponse immunitaire développée (réponse anticorps), plutôt qu'à la réplication virale (Leibovitch et al., 2013). La déplétion de cellules effectrices chez la souris pourrait donc permettre la propagation virale, mais probablement pas le développement de signe clinique.

#### Absence d'infection par HHV-6B : un rôle divergent pour CD46 ?

Contrairement à ce que nous avons observé pour HHV-6A, le virus HHV-6B ne semble pas capable de persister chez les souris CD46 transgéniques ou sauvage, ni dans le cerveau, ni dans les splénocytes. En accord avec les résultats des expériences d'infection *in vitro*, il semble donc que l'expression de CD46 ne permet pas l'infection des cellules murines par HHV-6B, et suggère l'existence potentielle d'un autre récepteur ou co-récepteur pour HHV-6B, présent chez l'homme et absent chez la souris. Certaines études ont remis en question le rôle de CD46 dans l'entrée d'HHV-6B (souche HST), notamment en montrant que le complexe gH/gL/gQ de cette souche ne se lie pas à CD46 (Mori et al., 2004), contrairement à celui d'HHV-6A. Nous utilisons ici une souche différente d'HHV-6B (Z29) et nos résultats pourraient ainsi suggérer que, de façon plus générale, CD46 n'est pas impliqué dans l'entrée d'HHV-6B. De plus, le blocage de CD46 à l'aide d'un anticorps spécifique n'a pas semblé inhiber l'infection par HHV-6B dans les cellules MOLT3, ce qui conforte cette hypothèse. Cependant, ceci est en contradiction avec d'autres études qui montrent que les souches Z29 et PL-1 d'HHV-6B utilisent bel et bien CD46 comme récepteur d'entrée et pour induire la fusion cellulaire (Pedersen et al., 2006; Santoro et al., 1999). De plus, les résultats présentés dans la 2<sup>ème</sup> partie de cette étude suggèrent qu'HHV-6B est capable d'induire une signalisation via CD46 dans les cellules humaines. Il est donc difficile de conclure sur le rôle de CD46 dans l'infection par les différentes souches HHV-6B, et d'autres expériences seraient nécessaires afin de mieux évaluer son importance dans l'entrée du virus.

## II. Effets neuroinflammatoires de l'infection par HHV-6A

La compilation des différents résultats obtenus à partir des expériences *in vitro* et *in vivo* semble donc indiquer que la souris CD46 transgénique ne constitue pas un bon modèle animal d'infection par HHV-6B. Néanmoins, dans le cas d'HHV-6A, bien que l'infection ne soit pas productive et ne conduise pas à des signes cliniques importants, il pourrait présenter un intérêt pour l'étude de la persistance virale dans le SNC. En outre, notre méthode d'injection intracrânienne de virus HHV-6A dans le cerveau constitue une augmentation brutale de la quantité d'ADN et de protéines virales dans le SNC, qui pourrait être représentative d'une réactivation virale, et permettrait ainsi l'analyse des conséquences de cette réactivation. C'est dans cette optique nous avons cherché à étudier les conséquences inflammatoires de la présence du virus HHV-6A dans le système nerveux central.

### A. Induction de l'expression de chimiokines dans le système nerveux central

Dans les cultures de cellules gliales générées à partir de souris CD46 transgéniques, nous avons montré qu'HHV-6A induit la sécrétion de plusieurs chimiokines, dont CCL2 (MCP1), CCL5 (RANTES), CXCL10 (IP10) ou encore CXCL1 (MIP2), de façon indépendante de la réplication virale. Ces différentes cytokines sont connues pour être sécrétées par les astrocytes et les cellules microgliales en cas d'infection, et pour être impliquées dans le recrutement de cellules immunitaires dans le SNC (Hosking and Lane, 2010). Notamment, CXCL1 est impliqué dans le recrutement de neutrophiles, CXCL10 les lymphocytes T activés et les cellules NK, tandis que CCL5 et CCL2 sont capables de se lier à des récepteurs exprimés par divers types de cellules immunitaires, dont les monocytes, les lymphocytes T et les cellules NK. L'augmentation de l'expression de ces chimiokines semble principalement dépendre de l'expression de CD46 par les cellules murines. On notera toutefois qu'une légère augmentation de la sécrétion de CCL5 et CCL2 est observée dans les cultures cellulaires qui n'expriment pas le récepteur, ce qui indique que l'induction de la sécrétion de ces chimiokines peut probablement passer par plusieurs voies différentes.

Nos résultats suggèrent que la présence d'HHV-6 peut également augmenter la production d'autres protéines. Notamment, nous observons une légère augmentation pour l'inhibiteur de métalloprotéinase TIMP1, dont l'expression dans le SNC a été associée à diverses pathologies neuroinflammatoires (Gardner and Ghorpade, 2003).

## B. Implication d'HHV-6A dans les processus de neuroinflammation

Grâce à des analyses immunohistologiques, nous avons ensuite pu mettre en évidence la capacité d'HHV-6A à induire une infiltration leucocytaire dans le SNC. Chez les souris CD46 transgéniques infectées par HHV-6A, nous avons en effet détecté la présence de cellules immunitaires infiltrantes, notamment de lymphocytes T ( $CD3^+$ ), dans le cerveau, au niveau des régions péri-ventriculaires. Cette migration pourrait être en lien avec la sécrétion de CCL5, CCL2 et CXCL10 par les cellules gliales du SNC suite à l'infection. Cependant, nos résultats *in vivo* montrent que l'augmentation de l'expression de CCL5 est détectée à la fois chez les souris infectées CD46 transgéniques et sauvages. Ceci indique donc à nouveau qu'HHV-6A peut probablement induire la sécrétion de chimiokines dans le SNC par plusieurs voies dépendantes ou indépendantes de CD46, et suggère que d'autres mécanismes pourraient réguler l'infiltration des leucocytes dans le SNC.

La surexpression d'autres chimiokines qui n'ont pas été analysées, comme CCL20 qui se lie à CCR6, récepteur exprimé par les cellules B, pourrait par ailleurs expliquer la présence de lymphocytes B infiltrants dans quelques souris. Une présence de macrophages a également été observée plus fréquemment chez les souris infectées et est possiblement associée à l'expression de CCL2.

La présence d'HHV-6A dans le cerveau de souris CD46 transgéniques peut donc induire l'infiltration de lymphocytes dans le cerveau, et ainsi initier un processus de neuroinflammation, mais qui reste d'une importance restreinte, les cellules infiltrantes étant en général peu nombreuses et ne causant pas de dommages visibles en histologie. En effet, plusieurs tentatives de colorations histologiques en luxol fast blue, utilisées pour marquer les gaines de myéline, ont été réalisées, mais n'ont pas permis de détecter de démyélinisation associée à l'infiltration. L'inflammation induite par HHV-6A est donc insuffisante pour causer une pathologie neuroinflammatoire démyélinisante associée à des symptômes neurologiques chez la souris. Elle semble en revanche suffisante pour aggraver les signes cliniques d'EAE, modèle animal de SEP utilisé classiquement chez la souris. Toutefois, la capacité d'HHV-6A à augmenter la sévérité de l'EAE est indépendante de l'expression de CD46 chez la souris. Comme l'infiltration lymphocytaire que nous avons observée suite à l'inoculation intracrânienne d'HHV-6A semble au contraire dépendre de l'expression de CD46, il est probable qu'elle ne soit pas la cause de l'aggravation de l'EAE. Le protocole d'infection utilisé lors des expériences d'EAE comprend en plus de l'injection intracrânienne une injection intra-péritonéale de cellules infectées. Nous avons montré que ce protocole d'infection entraîne le développement d'une réponse immunitaire en

périphérie (réponse humorale), indépendamment de la réplication virale. De plus, d'après les données de Svensson *et al.*, le virus HHV-6B induit lui aussi le même type de réponse anticorps (Svensson *et al.*, 2010). On pourrait ainsi supposer que c'est la réponse immunitaire induite en périphérie qui participerait à l'augmentation de la sévérité de l'EAE dans nos expériences, et non la présence du virus dans le cerveau. En outre, les résultats obtenus avec le VSV, un virus à ARN négatif de la famille des Rhabdoviridae et qui possède donc peu de similarités structurales avec HHV-6, indiquent que cette capacité à aggraver les symptômes de l'EAE chez la souris n'est pas spécifique d'HHV-6. Il est donc également possible que la présence d'antigènes ou d'acides nucléiques viraux et le développement d'une réponse anticorps antivirale puissent participer à la progression de l'EAE, quelque soit la nature du virus impliqué.

### **C. Mécanisme d'induction de la sécrétion de chimiokines par HHV-6A**

Les résultats présentés dans cette étude montrent que l'activation de l'expression de chimiokines pro-inflammatoires par HHV-6A dans les cellules gliales murines est indépendante de la réplication virale, mais nécessite l'expression de CD46 par ces cellules. Les domaines intra-cytoplasmiques cyt1 et cyt2 de CD46 sont tous deux capables de transmettre des signaux intra-cellulaires (Ludford-Menting *et al.*, 2002; Ni Choileain *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2000), et possèdent des propriétés inflammatoires différentes (Marie *et al.*, 2002). Ici, l'absence de différence dans l'activation par HHV-6A de l'expression de chimiokines entre les souris CD46-cyt1, CD46-cyt2 ou CD46ge suggère que la signalisation en aval de CD46 n'est pas impliquée dans cette induction. En revanche, en permettant l'internalisation des particules virales, la liaison à CD46 peut participer à la reconnaissance du virus par des récepteurs de l'immunité innée en intra-cellulaire.

Le récepteur TLR9 est spécialisé dans la reconnaissance de l'ADN double brin à motifs CpG non méthylés, et est localisé dans l'endosome. De plus, plusieurs études ont montré qu'il est exprimé dans les astrocytes et les cellules microgliales murines (Bowman *et al.*, 2003; El-Hage *et al.*, 2011; McKimmie and Fazakerley, 2005). Dans cette étude, nous montrons que ce récepteur joue un rôle dans la surexpression de chimiokines induite par HHV-6A dans les cultures primaires de cellules gliales murines. En général, au cours d'un cycle viral réplcatif classique pour les Herpesviridae, l'ADN viral n'est libéré que dans le noyau des cellules. Afin d'être en contact avec TLR9, cet ADN viral doit donc être libéré de la capsid, et acheminé jusqu'au compartiment cellulaire dans lequel TLR9 est exprimé. Dans

les pDC, qui sont spécialisées dans la détection de l'ADN viral par TLR9, cette reconnaissance est dépendante des mécanismes d'endocytose (Lund et al., 2003). Les astrocytes et les cellules microgliales sont capables d'assurer des fonctions immunitaires importantes, notamment de présentation antigénique et de phagocytose (Olson and Miller, 2004). Il est donc probable qu'elles soient capables, comme les pDC de détecter la présence de l'ADN viral lorsqu'elles sont en présence de virus. HHV-6A n'est par ailleurs pas le seul herpesvirus susceptible d'être reconnu via TLR9 dans des cellules autres que des pDC, puisque HSV-1 peut lui aussi induire l'expression de cytokines pro-inflammatoires via TLR9 dans des cellules endothéliales de cornée (Takeda et al., 2011). La reconnaissance d'HHV-6A dans les cellules gliales murines semble néanmoins nécessiter l'expression de CD46. Il est donc probable que l'expression de CD46 à la surface de ces cellules permet l'internalisation d'HHV-6A et son accès au compartiment cellulaire dans lequel TLR9 est localisé.

De plus, nous avons montré qu'HHV-6A est également capable d'activer le récepteur TLR9 humain, dans un système rapporteur luciférase dans des cellules humaines HEK. Ceci est en accord avec une étude précédente qui montre que l'infection par HHV-6A peut activer des voies de signalisation en aval de TLR9 dans des lymphocytes T humains (Chi et al., 2012b). Au contraire, le virus HHV-6B ne semble pas activer le récepteur TLR9 humain dans les cellules HEK. Pourtant une étude a montré que ce virus est active TLR9 dans les pDC (Nordström and Eriksson, 2012). Une hypothèse qui pourrait expliquer cette différence serait qu'HHV-6B peut être internalisé par les pDC, mais pas par les cellules HEK, ce qui empêcherait la reconnaissance de l'ADN viral par TLR9 dans l'endosome.

Le croisement de souris CD46 transgéniques avec une lignée délétée du gène TLR9 est actuellement en cours. L'utilisation de ces souris CD46 x TLR9KO et leur comparaison avec des souris CD46 classiques devrait ainsi nous permettre de confirmer le rôle de ce récepteur dans l'induction par HHV-6A de la sécrétion de chimiokines dans les cellules gliales et dans l'infiltration leucocytaire observée dans le cerveau des souris infectées.

Il est toutefois possible que d'autres récepteurs de l'immunité innée soient impliqués dans la reconnaissance d'HHV-6. Plusieurs récepteurs cytosoliques sont capables, comme TLR9, de détecter la présence d'ADN viral dans les cellules infectées (Holm et al., 2013). De plus, certains ADN double brin peuvent être transcrits en ARN dans le cytoplasme par l'ARN polymérase III, et peuvent activer le récepteur RIG-I, spécialisé dans la reconnaissance des ARN (Ablasser et al., 2009). De façon intéressante, le transcrit de l'EBV EBER, un petit ARN non codant, peut également être reconnu par RIG-I (Samanta et al., 2006). Il serait donc possible que des transcrits d'HHV-6 soient de la même façon détectés par ce récepteur. Le récepteur TLR2 a de plus été impliqué dans la reconnaissance de protéines virales de

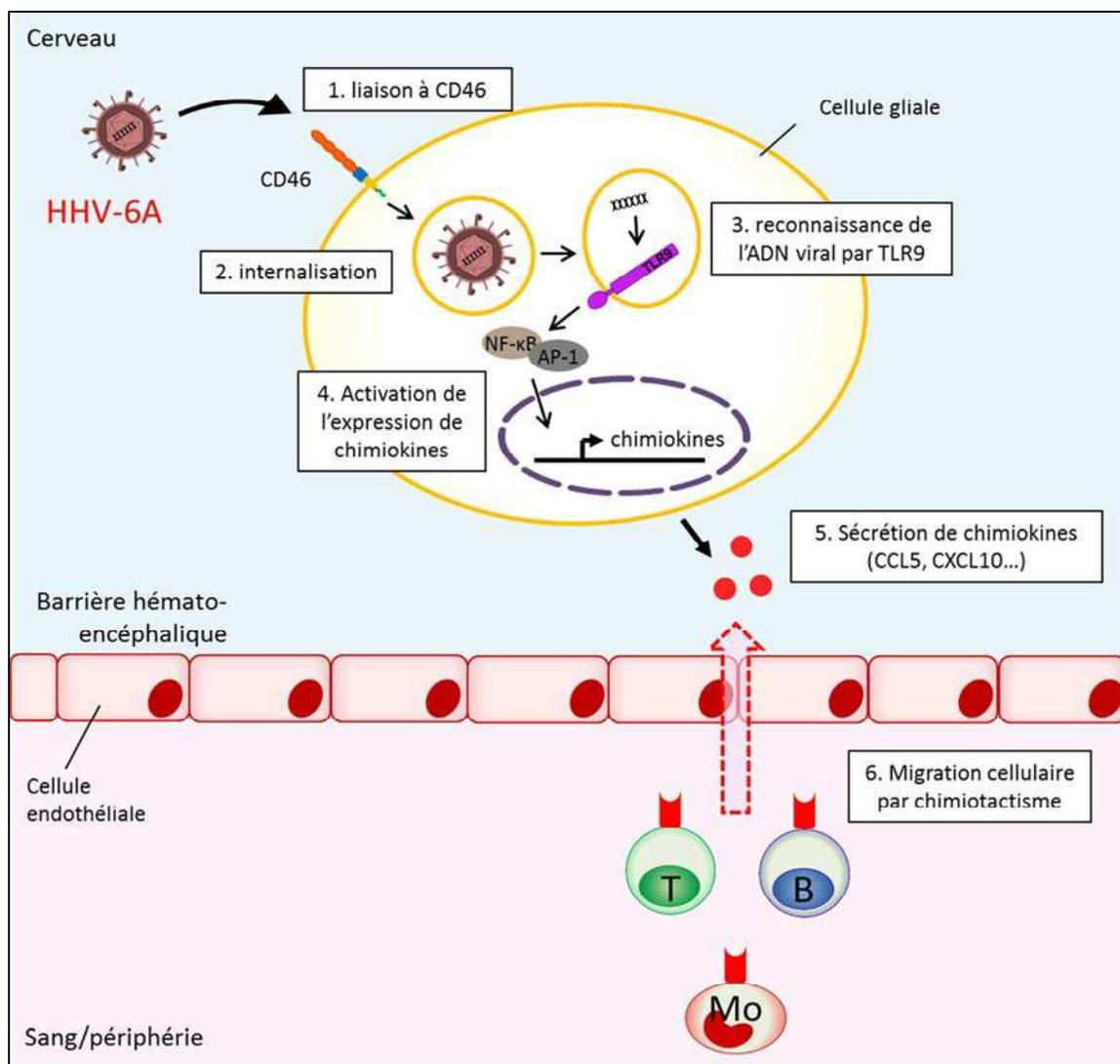
plusieurs herpèsvirus (Cai et al., 2012) et pourrait avoir une importance dans la réponse cellulaire induite par HHV-6.

## D. Modèle d'induction de neuroinflammation par HHV-6A

En nous basant sur l'ensemble des résultats obtenus dans cette étude, un modèle d'induction d'une infiltration leucocytaire par le virus HHV-6A dans le SNC peut être déduit (Figure 23). La présence de particules virales HHV-6A dans le cerveau, due par exemple à une propagation du virus suite à l'infection primaire, ou à une réactivation virale peut être détectée par les cellules résidentes. Chez l'homme, toutes les cellules du SNC expriment CD46, ce qui permet probablement l'entrée du virus dans les cellules gliales, et ainsi la reconnaissance de l'ADN viral par TLR9. L'engagement de TLR9 conduit à l'activation de l'expression de chimiokines pro-inflammatoires, qui peuvent participer au recrutement de cellules immunitaires, telles que les lymphocytes T et B, mais aussi les macrophages et les neutrophiles.

Les données obtenues récemment dans le modèle marmouset (Leibovitch et al., 2013), ainsi que les résultats présentés ici constituent de solides confirmations de la capacité d'HHV-6A à infecter le SNC, à y induire une infiltration lymphocytaire et à provoquer l'apparition de signes cliniques de maladie neurologique de type SEP. Ceci conforte donc l'hypothèse d'un rôle de l'infection par ce virus dans la progression ou le déclenchement de certains cas de SEP, et pourrait conduire à la mise en place de nouvelles études cliniques qui viseraient à analyser la validité de l'utilisation de traitements antiherpétiques chez des catégories de patients concernés par une infection HHV-6A active. Même si des études cliniques spécifiques font encore défaut, plusieurs antiviraux efficaces contre l'infection par HHV-6 *in vitro* et *in vivo* ont été décrits. Notamment le ganciclovir et le foscarnet, deux inhibiteurs de la polymérase virale (De Bolle et al., 2005a), sont capables de franchir la barrière hémato-encéphalique et pourraient être utilisés dans ce type d'études.

En outre, cette étude met en évidence l'implication de TLR9 dans l'induction de l'expression de chimiokines pro-inflammatoires par HHV-6A. Ces données suggèrent donc que la reconnaissance de l'ADN viral par ce récepteur pourrait jouer un rôle important dans le déclenchement de maladies neuroinflammatoires telles que des encéphalites ou des méningites suite à une infection primaire ou à une réactivation d'HHV-6A. Bien qu'ils nécessitent d'être confirmés par de futures analyses *in vivo* et *in vitro* sur des cellules humaines, ces résultats pourraient permettre d'envisager la voie TLR9 comme nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de ces maladies.



**Figure 23. Modèle d'induction de l'infiltration leucocytaire par HHV-6A.** Lorsqu'HHV-6A est présent dans le cerveau, il peut se lier à CD46 (1) et être internalisé par les cellules gliales (2). L'ADN viral accéderait alors au compartiment endosomal par des voies non élucidées et pourrait être reconnu par TLR9 (3). La stimulation de ce récepteur active les voies de signalisation en aval et conduit probablement à la translocation nucléaire des facteurs NF-κB et AP-1, impliqués dans l'activation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires (4). Les cellules gliales sécrètent ainsi différentes chimiokines dans le SNC (5), qui peuvent, par chimiotactisme, induire la migration des leucocytes au travers de la barrière hémato-encéphalique (6).

### III. HHV-6 et expression de *env* de HERV-W dans le modèle cellulaire humain

#### A. HHV-6A et HHV-6B induisent l'expression de gènes *env* d'HERV dans les lymphocytes humains

Au cours de cette étude, nous avons analysé l'expression des gènes d'enveloppe de rétrovirus endogènes dans plusieurs types de cellules hématopoïétiques humaines. Nous avons tout d'abord observé une augmentation de l'expression du gène *env* de HERV-K18 dans une lignée de lymphocytes T (HSB2), suite à l'infection par HHV-6A, confirmant ainsi les résultats obtenus par Tai *et al.* (Tai et al., 2009). De la même façon, nos résultats indiquent que l'infection par HHV-6B induit une augmentation similaire dans des PBMC primaires, en accord avec les données d'une seconde étude (Turcanova et al., 2009).

De plus, nous décrivons ici une première analyse de l'effet de l'infection par HHV-6A et HHV-6B sur l'expression de gènes *env* d'HERV-W, dont MSRV *env*, et la syncytine. Les résultats que nous avons obtenus sont apparus très variables, au cours des multiples expériences réalisées. Nous avons notamment analysé l'expression des différents gènes *env* à différents temps post-infection, et la plus forte augmentation a été observée à 24h dans certaines expériences, et à 48h dans d'autres. Une telle variabilité est mentionnée par Turcanova *et al.* dans l'analyse de HERV-K18 *env* dans les PBMC et peut être expliquée par la diversité des donneurs de cellules primaires (Turcanova et al., 2009). Nous avons également remarqué des différences cinétiques dans la lignée cellulaire HSB2, qui pourraient être dues au nombre de passages effectués ou à l'état des cellules avant l'infection. Dans chaque expérience, plusieurs gènes de référence ont été analysés pour la normalisation des échantillons. Bien que, de façon globale, les variations entre échantillons dans l'expression de chacun de ces gènes étaient faibles, la normalisation de l'expression des gènes *env* par rapport à l'un ou l'autre de ces gènes a parfois donné des résultats différents. Par ailleurs, dans certaines expériences, nous avons pu observer une augmentation de l'expression avec les amorces génériques (HERV-W), mais ni avec les amorces spécifique de MSRV, ni avec les amorces spécifiques de la syncytine, ce qui suggère l'existence de transcrits HERV-W *env* différents. A l'inverse, nous avons parfois détecté une augmentation de l'expression de la syncytine sans pour autant détecter d'augmentation avec les amorces génériques. Ceci peut être dû à des différences dans l'efficacité et la sensibilité de la réaction de PCR entre les différents couples d'amorces.

Malgré ces variabilités, nous avons observé de façon systématique une augmentation dans l'expression des gènes *env* d'HERV-W, que ce soit avec les amorces spécifiques pour la

syncytine ou MSRV, ou avec les amorces HERV-W, suite à l'infection par HHV-6A ou HHV-6B. Ce résultat est observé dans la lignée lymphocytaire T HSB2, ainsi que dans les CBMC pour HHV-6A, et dans les CBMC, les PBMC pour HHV-6B. L'analyse plus précise au sein des PBMC des populations de lymphocytes et de monocytes a révélé une augmentation plus faible dans les monocytes, contrairement à ce qui a été montré précédemment pour HERV-K18 *env* (Turcanova et al., 2009).

## B. Rôle de CD46

La stimulation de l'expression de HERV-W *env* et HERV-K18 *env* s'est révélée indépendante de la réplication virale et a pu être reproduite avec plusieurs autres ligands de CD46, le récepteur cellulaire pour HHV-6A et HHV-6B, en accord avec les données de Turcanova *et al.* qui montrent que l'activation de HERV-K18 *env* par HHV-6B dépend de l'interaction entre CD46 et la glycoprotéine virale gH (Turcanova et al., 2009). La stimulation de CD46 semble donc capable de transactiver les gènes *env* de plusieurs groupes de HERV.

Nous avons observé une stimulation avec des ligands qui se lient à CD46 au niveau de sites différents : C3b se lie aux régions SCR3-4 (Liszewski et al., 2000), le virus de la rougeole aux régions SCR1-2 (Buchholz et al., 1997), HHV-6 aux régions SCR2-3 (Greenstone et al., 2002), et l'anticorps anti-CD46 (clone Tra-2) à la région SCR1. La stimulation de *env* via CD46 ne semble donc pas dépendre du site de fixation à CD46. Ainsi il est probable que d'autres pathogènes qui se lient à CD46, tels que les bactéries *Neisseria* et *Streptococcus* ou l'adénovirus, soient eux aussi susceptibles de moduler la transcription de HERV-W *env*. D'autre part, un des ligands physiologiques de CD46 est le fragment du complément C3b. Les différentes infections pourraient donc également induire l'expression des gènes *env* en provoquant l'activation du système du complément. Les protéines codées par les gènes *env* analysés dans cette étude possèdent toutes des propriétés proinflammatoires (Perron et al., 2001; Rolland et al., 2006; Sutkowski et al., 2001) et pourraient potentiellement jouer un rôle dans la réponse inflammatoire contre les infections virales et bactériennes. De même, l'expression des protéines ENV pourrait avoir une importance dans la réponse immunitaire développée lors des vaccinations contre la rougeole, puisque les souches vaccinales de ce virus se lient à CD46 (Bartz et al., 1998).

CD46 étant exprimé de façon ubiquitaire chez l'homme, l'expression des gènes HERV-W peut potentiellement être activée dans un grand nombre de tissus, et donc avoir des conséquences diverses. De plus, la signalisation intracellulaire induite par CD46 peut être variable selon les types cellulaires. L'engagement de CD46, dans les cellules T notamment, induit la phosphorylation ou l'activation de nombreuses protéines impliquées dans

l'activation lymphocytaire (Astier et al., 2000; Sánchez et al., 2004; Zaffran et al., 2001). La stimulation de CD46 affecte également la polarité cellulaire, et peut être à l'origine de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dans d'autres types cellulaires (Ghali and Schneider-Schaulies, 1998; Vaknin-Dembinsky et al., 2008). L'activation d'une de ces voies peut être impliquée dans la surexpression de HERV-W *env*. De plus, la signalisation induite via CD46 dépend du domaine intra-cytoplasmique exprimé. Les isoformes CD46-Cyt1 et CD46-Cyt2 interagissent avec des protéines différentes, induisent des voies de signalisation distinctes (Ludford-Menting et al., 2002; Wang et al., 2000), et possèdent des propriétés inflammatoires antagonistes, le domaine Cyt-1 ayant des propriétés plutôt anti-inflammatoires, et le domaine Cyt-2 plutôt pro-inflammatoires (Marie et al., 2002; Ni Choileain et al., 2011). Ainsi, la stimulation de l'un ou l'autre isoforme de CD46 pourrait avoir un effet différentiel sur l'expression de HERV-W *env*.

Cependant, la stimulation de CD46 n'est probablement pas la seule voie d'activation de HERV-W *env*. En effet d'autres virus, qui ne se lient pas à CD46 sont aussi capables de transactiver *env*, notamment EBV, HSV-1 ou encore la grippe (Nellåker et al., 2006). EBV semble par ailleurs capable d'induire l'expression *env* de plusieurs façons : il est capable d'induire HERV-K18 *env* en se liant à son récepteur CD21 (Hsiao et al., 2006), et d'induire HERV-W *env* probablement via la voie NF- $\kappa$ B (Mameli et al., 2012). Ainsi, l'expression des gènes *env* de HERV peut vraisemblablement être activée par divers mécanismes, dont l'engagement de CD46.

### **C. Induction de l'expression de *env* dans les cellules gliales humaines**

De façon intéressante, les résultats de quelques expériences similaires effectuées sur des lignées de cellules neurales soutiennent les données précédentes. Ils montrent en effet une très forte augmentation de l'expression de HERV-W *env* suite à l'infection par HHV-6A dans la lignée de glioblastome U-87 MG. L'infection d'autres lignées de cellules neurales dont la lignée de neuroblastome SH-SY5Y n'a pas provoqué d'augmentation aussi importante. Mameli *et al.* ont également rapporté une augmentation de MSR *env* et syncytine-1 dans les cellules U-87 MG après infection par l'EBV (Mameli et al., 2012). L'expression des gènes HERV-W pourrait être particulièrement sensible dans les cellules U-87 MG.

La stimulation par CD46 a également fortement stimulé l'expression de HERV-W *env*. pourtant, en contradiction avec les résultats obtenus avec les cellules T et les PBMC, cette stimulation n'est pas observée avec les virus HHV-6B et HHV-6A inactivé. Ces résultats

semblent difficiles à interpréter et devraient donc être répétés et confirmés par de plus amples analyses afin de pouvoir conclure. Cependant l'augmentation observée dans les cellules U-87 MG est très forte en comparaison avec celle observée dans les PBMC et les lymphocytes T, ce qui suggère que la stimulation de l'expression de HERV-W *env* via CD46 pourrait être plus importante dans les cellules du SNC que dans les cellules lymphoïdes. De façon intéressante, seul l'isoforme CD46-Cyt2 est exprimé dans le cerveau (Johnstone et al., 1993). Il serait donc possible que cette forte augmentation soit due à l'expression préférentielle de ce domaine cytoplasmique dans les cellules neurales U-87 MG. Cependant, nous avons analysé l'expression de Cyt1 et Cyt2 dans ces cellules par PCR quantitative à l'aide d'amorces spécifiques, et nous avons constaté que les deux isoformes sont exprimés.

## D. Intérêt dans le contexte de la sclérose en plaques

L'infection par HHV-6 a souvent été associée à la SEP. De nombreuses études cliniques ont montré que l'ADN d'HHV-6 est détecté plus fréquemment dans le sang des patients atteints de SEP, que chez les donneurs sains (Chapenko et al., 2003; Soldan et al., 1997). De façon intéressante, les transcrits MSR/V sont également détectés plus fréquemment chez les patients SEP (Dolei et al., 2002; Garson et al., 1998). Notre étude apporte donc une explication potentielle à cette coïncidence, et suggère que la présence accrue d'HHV-6 dans le sang des patients pourrait provoquer l'augmentation de la transcription de MSR/V *env*. De plus, la protéine ENV MSR/V pourrait participer à la mise en place de cette maladie inflammatoire. En effet, même si nous ne montrons pas ici une production de protéine ENV, une surexpression du gène *env* de MSR/V dans les cellules T peut conduire à l'expression de la protéine ENV MSR/V et ainsi participer au développement de l'inflammation. Cette protéine est capable d'exercer une activité superantigène et d'induire une activation polyclonale des lymphocytes T (Perron et al., 2001). La partie extracellulaire de MSR/V-ENV est également capable de stimuler TLR4 dans les monocytes et les DC, et ainsi favoriser le développement de phénotypes pro-inflammatoires chez les cellules T (Rolland et al., 2006).

En outre, HHV-6 est un virus neurotrope, et l'infection par HHV-6 dans le SNC a été reliée au développement de la SEP par plusieurs études. La présence de transcrits et d'antigènes viraux, caractéristique d'une infection virale répliquative, est détectée plus fréquemment dans les cerveaux de patients atteints de SEP, et tout particulièrement dans les régions démyélinisées (Challoner et al., 1995; Opsahl and Kennedy, 2005). L'induction de l'expression de protéines d'enveloppe de HERV-W par HHV-6 pourrait alors constituer un

lien entre la présence du virus HHV-6 et la démyélinisation. En effet, les protéines d'enveloppe d'HERV-W, en particulier la syncytine, sont également surexprimées dans les cerveaux de patients SEP, spécialement dans les cellules gliales activées (Antony et al., 2006). De plus, la syncytine possède diverses propriétés neuroinflammatoires et neurodégénératives : lorsqu'elle est exprimée dans les astrocytes murins, elle induit un stress du réticulum endoplasmique et la production de radicaux libres. Ceci peut entraîner des dommages sur les oligodendrocytes, particulièrement sensibles au stress oxydant, et donc induire une démyélinisation (Antony et al., 2004, 2007).

## Conclusions générales

Bien que l'infection par HHV-6 chez la souris CD46 transgénique semble non productive et ne conduise pas au développement d'une pathologie neurologique, l'utilisation du modèle murin s'est révélée d'un intérêt particulier pour l'étude des conséquences de la présence du virus dans le SNC. Ce modèle nous a notamment permis de montrer qu'HHV-6A peut activer la sécrétion de chimiokines via le récepteur TLR9, et provoquer l'infiltration de plusieurs types de cellules immunitaires dans le SNC *in vivo*. En outre, les deux parties de cette étude suggèrent qu'HHV-6 a la capacité d'induire diverses réponses inflammatoires dans les cellules gliales du SNC, l'un des sites préférentiels d'infection chez l'homme, ce qui soutient ainsi l'hypothèse d'un rôle pour ce virus dans diverses maladies neuroinflammatoires. De plus, nos différents résultats mettent en évidence la multiplicité des voies potentiellement activées par HHV-6A dans ces cellules, notamment la stimulation de récepteurs de l'immunité innée ou l'induction directe de signaux intracellulaires via sa liaison à son récepteur CD46.



# Références

---



**A**berle, S.W., Mandl, C.W., Kunz, C., and Popow-Kraupp, T. (1996). Presence of human herpesvirus 6 variants A and B in saliva and peripheral blood mononuclear cells of healthy adults. *J. Clin. Microbiol.* *34*, 3223–3225.

Ablashi, D.V., Lusso, P., Hung, C.L., Salahuddin, S.Z., Josephs, S.F., Llana, T., Kramarsky, B., Biberfeld, P., Markham, P.D., and Gallo, R.C. (1988). Utilization of human hematopoietic cell lines for the propagation and characterization of HBLV (human herpesvirus 6). *Int. J. Cancer* *42*, 787–791.

Ablashi, D.V., Balachandran, N., Josephs, S.F., Hung, C.L., Krueger, G.R., Kramarsky, B., Salahuddin, S.Z., and Gallo, R.C. (1991). Genomic polymorphism, growth properties, and immunologic variations in human herpesvirus-6 isolates. *Virology* *184*, 545–552.

Ablashi, D.V., Lapps, W., Kaplan, M., Whitman, J.E., Richert, J.R., and Pearson, G.R. (1998). Human Herpesvirus-6 (HHV-6) infection in multiple sclerosis: a preliminary report. *Mult. Scler.* *4*, 490–496.

Ablasser, A., Bauernfeind, F., Hartmann, G., Latz, E., Fitzgerald, K.A., and Hornung, V. (2009). RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat. Immunol.* *10*, 1065–1072.

Agut, H. (2011a). Herpèsvirus et herpèsviroses humaines. *Bull. Acad. Vét. France* *164*, 287–291.

Agut, H. (2011b). Deciphering the clinical impact of acute human herpesvirus 6 (HHV-6) infections. *J. Clin. Virol.* *52*, 164–171.

Ahlqvist, J., Fotheringham, J., Akhyani, N., Yao, K., Fogdell-Hahn, A., and Jacobson, S. (2005). Differential tropism of human herpesvirus 6 (HHV-6) variants and induction of latency by HHV-6A in oligodendrocytes. *J. Neurovirol.* *11*, 384–394.

Ahtiluoto, S., Mannonen, L., Paetau, A., Vaheri, A., Koskiniemi, M., Rautiainen, P., and Muttillainen, M. (2000). In situ hybridization detection of human herpesvirus 6 in brain tissue from fatal encephalitis. *Pediatrics* *105*, 431–433.

Akashi, K., Eizuru, Y., Sumiyoshi, Y., Minematsu, T., Hara, S., Harada, M., Kikuchi, M., Niho, Y., and Minamishima, Y. (1993). Brief report: severe infectious mononucleosis-like syndrome and primary human herpesvirus 6 infection in an adult. *N. Engl. J. Med.* *329*, 168–171.

Akhtar, J., and Shukla, D. (2009). Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry. *FEBS J.* *276*, 7228–7236.

Akhyani, N., Berti, R., Brennan, M.B., Soldan, S.S., Eaton, J.M., McFarland, H.F., and Jacobson, S. (2000). Tissue distribution and variant characterization of human herpesvirus (HHV)-6: increased prevalence of HHV-6A in patients with multiple sclerosis. *J. Infect. Dis.* *182*, 1321–1325.

- Albright, A.V., Lavi, E., Black, J.B., Goldberg, S., O'Connor, M.J., and González-Scarano, F. (1998). The effect of human herpesvirus-6 (HHV-6) on cultured human neural cells: oligodendrocytes and microglia. *J. Neurovirol.* *4*, 486–494.
- Allen, N.J., and Barres, B.A. (2009). Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature* *457*, 675–677.
- Alvarez-Lafuente, R., De las Heras, V., Bartolomé, M., Picazo, J.J., and Arroyo, R. (2004). Relapsing-remitting multiple sclerosis and human herpesvirus 6 active infection. *Arch. Neurol.* *61*, 1523–1527.
- Alvarez-Lafuente, R., Fernández-Gutiérrez, B., de Miguel, S., Jover, J.A., Rollin, R., Loza, E., Clemente, D., and Lamas, J.R. (2005). Potential relationship between herpes viruses and rheumatoid arthritis: analysis with quantitative real time polymerase chain reaction. *Ann. Rheum. Dis.* *64*, 1357–1359.
- Anderson, D.J., Abbott, A.F., and Jack, R.M. (1993). The role of complement component C3b and its receptors in sperm-oocyte interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *90*, 10051–10055.
- Antony, J.M., van Marle, G., Opii, W., Butterfield, D.A., Mallet, F., Yong, V.W., Wallace, J.L., Deacon, R.M., Warren, K., and Power, C. (2004). Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination. *Nat. Neurosci.* *7*, 1088–1095.
- Antony, J.M., Izad, M., Bar-Or, A., Warren, K.G., Vodjgani, M., Mallet, F., and Power, C. (2006). Quantitative analysis of human endogenous retrovirus-W env in neuroinflammatory diseases. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *22*, 1253–1259.
- Antony, J.M., Ellestad, K.K., Hammond, R., Imaizumi, K., Mallet, F., Warren, K.G., and Power, C. (2007). The human endogenous retrovirus envelope glycoprotein, syncytin-1, regulates neuroinflammation and its receptor expression in multiple sclerosis: a role for endoplasmic reticulum chaperones in astrocytes. *J. Immunol.* *179*, 1210–1224.
- Aravalli, R.N., Hu, S., Rowen, T.N., Palmquist, J.M., and Lokensgard, J.R. (2005). Cutting edge: TLR2-mediated proinflammatory cytokine and chemokine production by microglial cells in response to herpes simplex virus. *J. Immunol.* *175*, 4189–4193.
- Arbuckle, J.H., and Medveczky, P.G. (2011). The molecular biology of human herpesvirus-6 latency and telomere integration. *Microbes Infect.* *13*, 731–741.
- Arbuckle, J.H., Medveczky, M.M., Luka, J., Hadley, S.H., Luegmayer, A., Ablashi, D., Lund, T.C., Tolar, J., De Meirleir, K., Montoya, J.G., et al. (2010). The latent human herpesvirus-6A genome specifically integrates in telomeres of human chromosomes in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 5563–5568.
- Arena, A., Liberto, M.C., Capozza, A.B., and Focà, A. (1997). Productive HHV-6 infection in differentiated U937 cells: role of TNF alpha in regulation of HHV-6. *New Microbiol.* *20*, 13–20.

Arena, A., Merendino, R.A., Bonina, L., Iannello, D., Stassi, G., and Mastroeni, P. (2000). Role of IL-15 on monocytic resistance to human herpesvirus 6 infection. *New Microbiol.* *23*, 105–112.

Arpaia, N., and Barton, G.M. (2011). Toll-like receptors: key players in antiviral immunity. *Curr Opin Virol* *1*, 447–454.

Asano, Y., Yoshikawa, T., Kajita, Y., Ogura, R., Suga, S., Yazaki, T., Nakashima, T., Yamada, A., and Kurata, T. (1992). Fatal encephalitis/encephalopathy in primary human herpesvirus-6 infection. *Arch. Dis. Child.* *67*, 1484–1485.

Asano, Y., Yoshikawa, T., Suga, S., Kobayashi, I., Nakashima, T., Yazaki, T., Kajita, Y., and Ozaki, T. (1994). Clinical features of infants with primary human herpesvirus 6 infection (exanthem subitum, roseola infantum). *Pediatrics* *93*, 104–108.

Asensio, V.C., and Campbell, I.L. (1997). Chemokine gene expression in the brains of mice with lymphocytic choriomeningitis. *J. Virol.* *71*, 7832–7840.

Astier, A., Trescol-Biémont, M.C., Azocar, O., Lamouille, B., and Rabourdin-Combe, C. (2000). Cutting edge: CD46, a new costimulatory molecule for T cells, that induces p120CBL and LAT phosphorylation. *J. Immunol.* *164*, 6091–6095.

Astier, A.L., Meiffren, G., Freeman, S., and Hafler, D.A. (2006). Alterations in CD46-mediated Tr1 regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* *116*, 3252–3257.

Aubin, J.T., Collandre, H., Candotti, D., Ingrand, D., Rouzioux, C., Burgard, M., Richard, S., Huraux, J.M., and Agut, H. (1991). Several groups among human herpesvirus 6 strains can be distinguished by Southern blotting and polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* *29*, 367–372.

Aubin, J.T., Agut, H., Collandre, H., Yamanishi, K., Chandran, B., Montagnier, L., and Huraux, J.M. (1993). Antigenic and genetic differentiation of the two putative types of human herpes virus 6. *J. Virol. Methods* *41*, 223–234.

**B**alada, E., Vilardell-Tarrés, M., and Ordi-Ros, J. (2010). Implication of human endogenous retroviruses in the development of autoimmune diseases. *Int. Rev. Immunol.* *29*, 351–370.

Bao, M., and Liu, Y.-J. (2013). Regulation of TLR7/9 signaling in plasmacytoid dendritic cells. *Protein Cell* *4*, 40–52.

Barber, G.N. (2011). Cytoplasmic DNA innate immune pathways. *Immunol. Rev.* *243*, 99–108.

Barone, S.R., Kaplan, M.H., and Krilov, L.R. (1995). Human herpesvirus-6 infection in children with first febrile seizures. *J. Pediatr.* *127*, 95–97.

Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic

retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868–871.

Bartz, R., Firsching, R., Rima, B., ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, J. (1998). Differential receptor usage by measles virus strains. *J. Gen. Virol.* 79 ( Pt 5), 1015–1025.

Benveniste, E.N. (1992). Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function, and mechanism of action. *Am. J. Physiol.* 263, C1–16.

Berneman, Z.N., Ablashi, D.V., Li, G., Eger-Fletcher, M., Reitz, M.S., Jr, Hung, C.L., Brus, I., Komaroff, A.L., and Gallo, R.C. (1992). Human herpesvirus 7 is a T-lymphotropic virus and is related to, but significantly different from, human herpesvirus 6 and human cytomegalovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 10552–10556.

Berti, R., Brennan, M.B., Soldan, S.S., Ohayon, J.M., Casareto, L., McFarland, H.F., and Jacobson, S. (2002). Increased detection of serum HHV-6 DNA sequences during multiple sclerosis (MS) exacerbations and correlation with parameters of MS disease progression. *J. Neurovirol.* 8, 250–256.

Biancotto, A., Grivel, J.-C., Lisco, A., Vanpouille, C., Markham, P.D., Gallo, R.C., Margolis, L.B., and Lusso, P. (2009). Evolution of SIV toward RANTES resistance in macaques rapidly progressing to AIDS upon coinfection with HHV-6A. *Retrovirology* 6, 61.

Biberfeld, P., Kramarsky, B., Salahuddin, S.Z., and Gallo, R.C. (1987). Ultrastructural characterization of a new human B lymphotropic DNA virus (human herpesvirus 6) isolated from patients with lymphoproliferative disease. *J. Natl. Cancer Inst.* 79, 933–941.

Bieback, K., Lien, E., Klagge, I.M., Avota, E., Schneider-Schaulies, J., Duprex, W.P., Wagner, H., Kirschning, C.J., Ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, S. (2002). Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *J. Virol.* 76, 8729–8736.

Blond, J.L., Besème, F., Duret, L., Bouton, O., Bedin, F., Perron, H., Mandrand, B., and Mallet, F. (1999). Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family. *J. Virol.* 73, 1175–1185.

Boehmer, P.E., and Villani, G. (2003). Herpes simplex virus type-1: a model for genome transactions. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 75, 139–171.

De Bolle, L., Naesens, L., and De Clercq, E. (2005a). Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 217–245.

De Bolle, L., Van Loon, J., De Clercq, E., and Naesens, L. (2005b). Quantitative analysis of human herpesvirus 6 cell tropism. *J. Med. Virol.* 75, 76–85.

Bowman, C.C., Rasley, A., Tranguch, S.L., and Marriott, I. (2003). Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. *Glia* 43, 281–291.

Braun, D.K., Dominguez, G., and Pellett, P.E. (1997). Human herpesvirus 6. *Clin. Microbiol. Rev.* 10, 521–567.

Broccolo, F., Drago, F., Paolino, S., Cassina, G., Gatto, F., Fusetti, L., Matteoli, B., Zaccaria, E., Parodi, A., Lusso, P., et al. (2009). Reactivation of human herpesvirus 6 (HHV-6) infection in patients with connective tissue diseases. *J. Clin. Virol.* *46*, 43–46.

Brudek, T., Lühdorf, P., Christensen, T., Hansen, H.J., and Møller-Larsen, A. (2007). Activation of endogenous retrovirus reverse transcriptase in multiple sclerosis patient lymphocytes by inactivated HSV-1, HHV-6 and VZV. *J. Neuroimmunol.* *187*, 147–155.

Brudek, T., Christensen, T., Aagaard, L., Petersen, T., Hansen, H.J., and Møller-Larsen, A. (2009). B cells and monocytes from patients with active multiple sclerosis exhibit increased surface expression of both HERV-H Env and HERV-W Env, accompanied by increased seroreactivity. *Retrovirology* *6*, 104.

Bsibsi, M., Ravid, R., Gveric, D., and van Noort, J.M. (2002). Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *61*, 1013–1021.

Buchholz, C.J., Koller, D., Devaux, P., Mumenthaler, C., Schneider-Schaulies, J., Braun, W., Gerlier, D., and Cattaneo, R. (1997). Mapping of the primary binding site of measles virus to its receptor CD46. *J. Biol. Chem.* *272*, 22072–22079.

Burbelo, P.D., Bayat, A., Wagner, J., Nutman, T.B., Baraniuk, J.N., and Iadarola, M.J. (2012). No serological evidence for a role of HHV-6 infection in chronic fatigue syndrome. *Am J Transl Res* *4*, 443–451.

**C**ai, M., Li, M., and Zheng, C. (2012). Herpesviral infection and Toll-like receptor 2. *Protein Cell* *3*, 590–601.

Cardone, J., Le Friec, G., Vantourout, P., Roberts, A., Fuchs, A., Jackson, I., Suddason, T., Lord, G., Atkinson, J.P., Cope, A., et al. (2010). Complement regulator CD46 temporally regulates cytokine production by conventional and unconventional T cells. *Nat. Immunol.* *11*, 862–871.

Caruso, A., Rotola, A., Comar, M., Favilli, F., Galvan, M., Tosetti, M., Campello, C., Caselli, E., Alessandri, G., Grassi, M., et al. (2002). HHV-6 infects human aortic and heart microvascular endothelial cells, increasing their ability to secrete proinflammatory chemokines. *J. Med. Virol.* *67*, 528–533.

Caruso, A., Favilli, F., Rotola, A., Comar, M., Horejsh, D., Alessandri, G., Grassi, M., Di Luca, D., and Fiorentini, S. (2003). Human herpesvirus-6 modulates RANTES production in primary human endothelial cell cultures. *J. Med. Virol.* *70*, 451–458.

Caselli, E., Bracci, A., Galvan, M., Boni, M., Rotola, A., Bergamini, C., Cermelli, C., Dal Monte, P., Gompels, U.A., Cassai, E., et al. (2006). Human herpesvirus 6 (HHV-6) U94/REP protein inhibits betaherpesvirus replication. *Virology* *346*, 402–414.

Caselli, E., Zatelli, M.C., Rizzo, R., Benedetti, S., Martorelli, D., Trasforini, G., Cassai, E., degli Uberti, E.C., Di Luca, D., and Dolcetti, R. (2012). Virologic and immunologic evidence supporting an association between HHV-6 and Hashimoto's thyroiditis. *PLoS Pathog.* *8*, e1002951.

- Caserta, M.T., Hall, C.B., Schnabel, K., McIntyre, K., Long, C., Costanzo, M., Dewhurst, S., Insel, R., and Epstein, L.G. (1994). Neuroinvasion and persistence of human herpesvirus 6 in children. *J. Infect. Dis.* *170*, 1586–1589.
- Cassiani-Ingoni, R., Greenstone, H.L., Donati, D., Fogdell-Hahn, A., Martinelli, E., Refai, D., Martin, R., Berger, E.A., and Jacobson, S. (2005). CD46 on glial cells can function as a receptor for viral glycoprotein-mediated cell-cell fusion. *Glia* *52*, 252–258.
- Cattaneo, R. (2004). Four viruses, two bacteria, and one receptor: membrane cofactor protein (CD46) as pathogens' magnet. *J. Virol.* *78*, 4385–4388.
- Cermelli, C., Concari, M., Carubbi, F., Fabio, G., Sabbatini, A.M., Pecorari, M., Pietrosemoli, P., Meacci, M., Guicciardi, E., Carulli, N., et al. (1996). Growth of human herpesvirus 6 in HEPG2 cells. *Virus Res.* *45*, 75–85.
- Challoner, P.B., Smith, K.T., Parker, J.D., MacLeod, D.L., Coulter, S.N., Rose, T.M., Schultz, E.R., Bennett, J.L., Garber, R.L., and Chang, M. (1995). Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *92*, 7440–7444.
- Chan, P.K., Ng, H.K., Hui, M., Ip, M., Cheung, J.L., and Cheng, A.F. (1999). Presence of human herpesviruses 6, 7, and 8 DNA sequences in normal brain tissue. *J. Med. Virol.* *59*, 491–495.
- Chan, P.K., Ng, H.K., Hui, M., and Cheng, A.F. (2001). Prevalence and distribution of human herpesvirus 6 variants A and B in adult human brain. *J. Med. Virol.* *64*, 42–46.
- Chandran, B., Tirawatnpong, S., Pfeiffer, B., and Ablashi, D.V. (1992). Antigenic relationships among human herpesvirus-6 isolates. *J. Med. Virol.* *37*, 247–254.
- Chapenko, S., Millers, A., Nora, Z., Logina, I., Kukaine, R., and Murovska, M. (2003). Correlation between HHV-6 reactivation and multiple sclerosis disease activity. *J. Med. Virol.* *69*, 111–117.
- Chen, M., Popescu, N., Woodworth, C., Berneman, Z., Corbellino, M., Lusso, P., Ablashi, D.V., and DiPaolo, J.A. (1994). Human herpesvirus 6 infects cervical epithelial cells and transactivates human papillomavirus gene expression. *J. Virol.* *68*, 1173–1178.
- Chi, J., Gu, B., Zhang, C., Peng, G., Zhou, F., Chen, Y., Zhang, G., Guo, Y., Guo, D., Qin, J., et al. (2012a). Human herpesvirus 6 latent infection in patients with glioma. *J. Infect. Dis.* *206*, 1394–1398.
- Chi, J., Wang, F., Li, L., Feng, D., Qin, J., Xie, F., Zhou, F., Chen, Y., Wang, J., and Yao, K. (2012b). The role of MAPK in CD4(+) T cells toll-like receptor 9-mediated signaling following HHV-6 infection. *Virology* *422*, 92–98.
- Chicha, L., Tussiwand, R., Traggiai, E., Mazzucchelli, L., Bronz, L., Piffaretti, J.-C., Lanzavecchia, A., and Manz, M.G. (2005). Human adaptive immune system Rag2-/- gamma(c)-/- mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1044*, 236–243.

Christensen, T. (2005). Association of human endogenous retroviruses with multiple sclerosis and possible interactions with herpes viruses. *Rev. Med. Virol.* *15*, 179–211.

Christensen, J.E., Simonsen, S., Fenger, C., Sørensen, M.R., Moos, T., Christensen, J.P., Finsen, B., and Thomsen, A.R. (2009). Fulminant lymphocytic choriomeningitis virus-induced inflammation of the CNS involves a cytokine-chemokine-cytokine-chemokine cascade. *J. Immunol.* *182*, 1079–1087.

Cirone, M., Zompetta, C., Angeloni, A., Ablashi, D.V., Salahuddin, S.Z., Pavan, A., Torrisi, M.R., Frati, L., and Faggioni, A. (1992). Infection by human herpesvirus 6 (HHV-6) of human lymphoid T cells occurs through an endocytic pathway. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *8*, 2031–2037.

Clark, D.A. (2000). Human herpesvirus 6. *Rev. Med. Virol.* *10*, 155–173.

Cole, D.S., Hughes, T.R., Gasque, P., and Morgan, B.P. (2006). Complement regulator loss on apoptotic neuronal cells causes increased complement activation and promotes both phagocytosis and cell lysis. *Mol. Immunol.* *43*, 1953–1964.

Cone, R.W., Huang, M.L., Hackman, R.C., and Corey, L. (1996). Coinfection with human herpesvirus 6 variants A and B in lung tissue. *J. Clin. Microbiol.* *34*, 877–881.

Constantinescu, C.S., Tani, M., Ransohoff, R.M., Wysocka, M., Hilliard, B., Fujioka, T., Murphy, S., Tighe, P.J., Das Sarma, J., Trinchieri, G., et al. (2005). Astrocytes as antigen-presenting cells: expression of IL-12/IL-23. *J. Neurochem.* *95*, 331–340.

Crimeen-Irwin, B., Ellis, S., Christiansen, D., Ludford-Menting, M.J., Milland, J., Lanteri, M., Loveland, B.E., Gerlier, D., and Russell, S.M. (2003). Ligand binding determines whether CD46 is internalized by clathrin-coated pits or macropinocytosis. *J. Biol. Chem.* *278*, 46927–46937.

Cuomo, L., Trivedi, P., Cardillo, M.R., Gagliardi, F.M., Vecchione, A., Caruso, R., Calogero, A., Frati, L., Faggioni, A., and Ragona, G. (2001). Human herpesvirus 6 infection in neoplastic and normal brain tissue. *J. Med. Virol.* *63*, 45–51.

**D**aibata, M., Taguchi, T., Kamioka, M., Kubonishi, I., Taguchi, H., and Miyoshi, I. (1998). Identification of integrated human herpesvirus 6 DNA in early pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* *12*, 1002–1004.

Daibata, M., Taguchi, T., Nemoto, Y., Taguchi, H., and Miyoshi, I. (1999). Inheritance of chromosomally integrated human herpesvirus 6 DNA. *Blood* *94*, 1545–1549.

Davison, A.J., Dolan, A., Akter, P., Addison, C., Dargan, D.J., Alcendor, D.J., McGeoch, D.J., and Hayward, G.S. (2003). The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J. Gen. Virol.* *84*, 17–28.

Dénes, A., Humphreys, N., Lane, T.E., Grecis, R., and Rothwell, N. (2010). Chronic systemic infection exacerbates ischemic brain damage via a CCL5 (regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted)-mediated proinflammatory response in mice. *J. Neurosci.* *30*, 10086–10095.

- Dewhurst, S., McIntyre, K., Schnabel, K., and Hall, C.B. (1993). Human herpesvirus 6 (HHV-6) variant B accounts for the majority of symptomatic primary HHV-6 infections in a population of U.S. infants. *J. Clin. Microbiol.* *31*, 416–418.
- Dewin, D.R., Catusse, J., and Gompels, U.A. (2006). Identification and characterization of U83A viral chemokine, a broad and potent beta-chemokine agonist for human CCRs with unique selectivity and inhibition by spliced isoform. *J. Immunol.* *176*, 544–556.
- Dhepakson, P., Mori, Y., Jiang, Y.B., Huang, H.L., Akkapaiboon, P., Okuno, T., and Yamanishi, K. (2002). Human herpesvirus-6 rep/U94 gene product has single-stranded DNA-binding activity. *J. Gen. Virol.* *83*, 847–854.
- Dietrich, J., Blumberg, B.M., Roshal, M., Baker, J.V., Hurley, S.D., Mayer-Pröschel, M., and Mock, D.J. (2004). Infection with an endemic human herpesvirus disrupts critical glial precursor cell properties. *J. Neurosci.* *24*, 4875–4883.
- Dockrell, D.H., and Paya, C.V. (2001). Human herpesvirus-6 and -7 in transplantation. *Rev. Med. Virol.* *11*, 23–36.
- Dolei, A., Serra, C., Mamei, G., Pugliatti, M., Sechi, G., Cirotto, M.C., Rosati, G., and Sotgiu, S. (2002). Multiple sclerosis-associated retrovirus (MSRV) in Sardinian MS patients. *Neurology* *58*, 471–473.
- Dominguez, G., Dambaugh, T.R., Stamey, F.R., Dewhurst, S., Inoue, N., and Pellett, P.E. (1999). Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A. *J. Virol.* *73*, 8040–8052.
- Donati, D., Akhyani, N., Fogdell-Hahn, A., Cermelli, C., Cassiani-Ingoni, R., Vortmeyer, A., Heiss, J.D., Cogen, P., Gaillard, W.D., Sato, S., et al. (2003). Detection of human herpesvirus-6 in mesial temporal lobe epilepsy surgical brain resections. *Neurology* *61*, 1405–1411.
- Donati, D., Martinelli, E., Cassiani-Ingoni, R., Ahlqvist, J., Hou, J., Major, E.O., and Jacobson, S. (2005). Variant-specific tropism of human herpesvirus 6 in human astrocytes. *J. Virol.* *79*, 9439–9448.
- Dong, Y., and Benveniste, E.N. (2001). Immune function of astrocytes. *Glia* *36*, 180–190.
- Downing, R.G., Sewankambo, N., Serwadda, D., Honess, R., Crawford, D., Jarrett, R., and Griffin, B.E. (1987). Isolation of human lymphotropic herpesviruses from Uganda. *Lancet* *2*, 390.
- Drobyski, W.R., Knox, K.K., Majewski, D., and Carrigan, D.R. (1994). Brief report: fatal encephalitis due to variant B human herpesvirus-6 infection in a bone marrow-transplant recipient. *N. Engl. J. Med.* *330*, 1356–1360.
- Dunzendorfer, S., Lee, H.-K., Soldau, K., and Tobias, P.S. (2004). Toll-like receptor 4 functions intracellularly in human coronary artery endothelial cells: roles of LBP and sCD14 in mediating LPS responses. *FASEB J.* *18*, 1117–1119.

Van Duyne, R., Pedati, C., Guendel, I., Carpio, L., Kehn-Hall, K., Saifuddin, M., and Kashanchi, F. (2009). The utilization of humanized mouse models for the study of human retroviral infections. *Retrovirology* 6, 76.

Ehlers, B., Ochs, A., Leendertz, F., Goltz, M., Boesch, C., and Mätz-Rensing, K. (2003). Novel simian homologues of Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 77, 10695–10699.

El-Hage, N., Podhaizer, E.M., Sturgill, J., and Hauser, K.F. (2011). Toll-like receptor expression and activation in astroglia: differential regulation by HIV-1 Tat, gp120, and morphine. *Immunol. Invest.* 40, 498–522.

Ewald, S.E., Lee, B.L., Lau, L., Wickliffe, K.E., Shi, G.-P., Chapman, H.A., and Barton, G.M. (2008). The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature* 456, 658–662.

Fancy, S.P.J., Chan, J.R., Baranzini, S.E., Franklin, R.J.M., and Rowitch, D.H. (2011). Myelin regeneration: a recapitulation of development? *Annu. Rev. Neurosci.* 34, 21–43.

De Filippis, L., Foglieni, C., Silva, S., Vescovi, A.L., Lusso, P., and Malnati, M.S. (2006). Differentiated human neural stem cells: a new ex vivo model to study HHV-6 infection of the central nervous system. *J. Clin. Virol.* 37 Suppl 1, S27–32.

Fiola, S., Gosselin, D., Takada, K., and Gosselin, J. (2010). TLR9 contributes to the recognition of EBV by primary monocytes and plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* 185, 3620–3631.

Firouzi, R., Rolland, A., Michel, M., Jouvin-Marche, E., Hauw, J.J., Malcus-Vocanson, C., Lazarini, F., Gebuhrer, L., Seigneurin, J.M., Touraine, J.L., et al. (2003). Multiple sclerosis-associated retrovirus particles cause T lymphocyte-dependent death with brain hemorrhage in humanized SCID mice model. *J. Neurovirol.* 9, 79–93.

Flamand, L., Gosselin, J., D'Addario, M., Hiscott, J., Ablashi, D.V., Gallo, R.C., and Menezes, J. (1991). Human herpesvirus 6 induces interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha, but not interleukin-6, in peripheral blood mononuclear cell cultures. *J. Virol.* 65, 5105–5110.

Flamand, L., Stefanescu, I., and Menezes, J. (1996). Human herpesvirus-6 enhances natural killer cell cytotoxicity via IL-15. *J. Clin. Invest.* 97, 1373–1381.

Fleischli, C., Verhaagh, S., Havenga, M., Sirena, D., Schaffner, W., Cattaneo, R., Greber, U.F., and Hemmi, S. (2005). The distal short consensus repeats 1 and 2 of the membrane cofactor protein CD46 and their distance from the cell membrane determine productive entry of species B adenovirus serotype 35. *J. Virol.* 79, 10013–10022.

Fogdell-Hahn, A., Soldan, S.S., Shue, S., Akhyani, N., Refai, H., Ahlqvist, J., and Jacobson, S. (2005). Co-purification of soluble membrane cofactor protein (CD46) and human herpesvirus 6 variant A genome in serum from multiple sclerosis patients. *Virus Res.* 110, 57–63.

Fontana, A., Fierz, W., and Wekerle, H. (1984). Astrocytes present myelin basic protein to encephalitogenic T-cell lines. *Nature* 307, 273–276.

Forest, F., Duband, S., Pillet, S., Stachowicz, M.-L., Cornillon, J., Dumollard, J.-M., and Peoc'h, M. (2011). Lethal human herpesvirus-6 encephalitis after cord blood transplant. *Transpl Infect Dis* 13, 646–649.

Fotheringham, J., Akhyani, N., Vortmeyer, A., Donati, D., Williams, E., Oh, U., Bishop, M., Barrett, J., Gea-Banacloche, J., and Jacobson, S. (2007). Detection of active human herpesvirus-6 infection in the brain: correlation with polymerase chain reaction detection in cerebrospinal fluid. *J. Infect. Dis.* 195, 450–454.

Frenkel, N., Schirmer, E.C., Wyatt, L.S., Katsafanas, G., Roffman, E., Danovich, R.M., and June, C.H. (1990). Isolation of a new herpesvirus from human CD4+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 748–752.

Le Friec, G., Sheppard, D., Whiteman, P., Karsten, C.M., Shamoun, S.A.-T., Laing, A., Bugeon, L., Dallman, M.J., Melchionna, T., Chillakuri, C., et al. (2012). The CD46-Jagged1 interaction is critical for human TH1 immunity. *Nat. Immunol.* 13, 1213–1221.

Friedman, J.E., Lyons, M.J., Cu, G., Ablashi, D.V., Whitman, J.E., Edgar, M., Koskiniemi, M., Vaheri, A., and Zabriskie, J.B. (1999). The association of the human herpesvirus-6 and MS. *Mult. Scler.* 5, 355–362.

**G**aggar, A., Shayakhmetov, D.M., and Lieber, A. (2003). CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat. Med.* 9, 1408–1412.

Gao, J., Luo, X., Tang, K., Li, X., and Li, G. (2006). Epstein-Barr virus integrates frequently into chromosome 4q, 2q, 1q and 7q of Burkitt's lymphoma cell line (Raji). *J. Virol. Methods* 136, 193–199.

Garcia-Montojo, M., Martinez, A., De Las Heras, V., Dominguez-Mozo, M.I., Cenit, M. del C., López-Cavanillas, M., Garcia-Martinez, A., Arias-Leal, A.M., Gomez de la Concha, E., Urcelay, E., et al. (2011). Herpesvirus active replication in multiple sclerosis: a genetic control? *J. Neurol. Sci.* 311, 98–102.

Gardell, J.L., Dazin, P., Islar, J., Menge, T., Genain, C.P., and Lalive, P.H. (2006). Apoptotic effects of Human Herpesvirus-6A on glia and neurons as potential triggers for central nervous system autoimmunity. *J. Clin. Virol.* 37 *Suppl 1*, S11–16.

Gardner, J., and Ghorpade, A. (2003). Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1: the TIMPed balance of matrix metalloproteinases in the central nervous system. *J. Neurosci. Res.* 74, 801–806.

Garson, J.A., Tuke, P.W., Giraud, P., Paranhos-Baccala, G., and Perron, H. (1998). Detection of virion-associated MSRVA-RNA in serum of patients with multiple sclerosis. *Lancet* 351, 33.

Ghali, M., and Schneider-Schaulies, J. (1998). Receptor (CD46)- and replication-mediated interleukin-6 induction by measles virus in human astrocytoma cells. *J. Neurovirol.* 4, 521–530.

Giannakis, E., Jokiranta, T.S., Ormsby, R.J., Duthy, T.G., Male, D.A., Christiansen, D., Fischetti, V.A., Bagley, C., Loveland, B.E., and Gordon, D.L. (2002). Identification of the streptococcal M protein binding site on membrane cofactor protein (CD46). *J. Immunol.* *168*, 4585–4592.

Glass, W.G., Lim, J.K., Cholera, R., Pletnev, A.G., Gao, J.-L., and Murphy, P.M. (2005). Chemokine receptor CCR5 promotes leukocyte trafficking to the brain and survival in West Nile virus infection. *J. Exp. Med.* *202*, 1087–1098.

Gobbi, A., Stoddart, C.A., Malnati, M.S., Locatelli, G., Santoro, F., Abbey, N.W., Bare, C., Linnik-Stepps, V., Moreno, M.B., Herndier, B.G., et al. (1999). Human herpesvirus 6 (HHV-6) causes severe thymocyte depletion in SCID-hu Thy/Liv mice. *J. Exp. Med.* *189*, 1953–1960.

Gobbi, A., Stoddart, C.A., Locatelli, G., Santoro, F., Bare, C., Linnik-Stepps, V., Moreno, M.E., Abbey, N.W., Herndier, B.G., Malnati, M.S., et al. (2000). Coinfection of SCID-hu Thy/Liv mice with human herpesvirus 6 and human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* *74*, 8726–8731.

Gompels, U.A., Carrigan, D.R., Carss, A.L., and Arno, J. (1993). Two groups of human herpesvirus 6 identified by sequence analyses of laboratory strains and variants from Hodgkin's lymphoma and bone marrow transplant patients. *J. Gen. Virol.* *74* ( Pt 4), 613–622.

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

Goodman, A.D., Mock, D.J., Powers, J.M., Baker, J.V., and Blumberg, B.M. (2003). Human herpesvirus 6 genome and antigen in acute multiple sclerosis lesions. *J. Infect. Dis.* *187*, 1365–1376.

Greenstone, H.L., Santoro, F., Lusso, P., and Berger, E.A. (2002). Human Herpesvirus 6 and Measles Virus Employ Distinct CD46 Domains for Receptor Function. *J. Biol. Chem.* *277*, 39112–39118.

Grivel, J.C., Ito, Y., Fagà, G., Santoro, F., Shaheen, F., Malnati, M.S., Fitzgerald, W., Lusso, P., and Margolis, L. (2001). Suppression of CCR5- but not CXCR4-tropic HIV-1 in lymphoid tissue by human herpesvirus 6. *Nat. Med.* *7*, 1232–1235.

Grivel, J.-C., Santoro, F., Chen, S., Fagà, G., Malnati, M.S., Ito, Y., Margolis, L., and Lusso, P. (2003). Pathogenic effects of human herpesvirus 6 in human lymphoid tissue ex vivo. *J. Virol.* *77*, 8280–8289.

Gu, B., Zhang, G.-F., Li, L.-Y., Zhou, F., Feng, D.-J., Ding, C.-L., Chi, J., Zhang, C., Guo, D.-D., Wang, J.-F., et al. (2011). Human herpesvirus 6A induces apoptosis of primary human fetal astrocytes via both caspase-dependent and -independent pathways. *Virol. J.* *8*, 530.

**H**akulinen, J., and Keski-Oja, J. (2006). ADAM10-mediated release of complement membrane cofactor protein during apoptosis of epithelial cells. *J. Biol. Chem.* *281*, 21369–21376.

- Hall, B.M., Verma, N.D., Tran, G.T., and Hodgkinson, S.J. (2011). Distinct regulatory CD4<sup>+</sup>T cell subsets; differences between naïve and antigen specific T regulatory cells. *Curr. Opin. Immunol.* 23, 641–647.
- Hall, C.B., Long, C.E., Schnabel, K.C., Caserta, M.T., McIntyre, K.M., Costanzo, M.A., Knott, A., Dewhurst, S., Insel, R.A., and Epstein, L.G. (1994). Human herpesvirus-6 infection in children. A prospective study of complications and reactivation. *N. Engl. J. Med.* 331, 432–438.
- Hall, C.B., Caserta, M.T., Schnabel, K.C., Long, C., Epstein, L.G., Insel, R.A., and Dewhurst, S. (1998). Persistence of human herpesvirus 6 according to site and variant: possible greater neurotropism of variant A. *Clin. Infect. Dis.* 26, 132–137.
- Hara, T., Kuriyama, S., Kiyohara, H., Nagase, Y., Matsumoto, M., and Seya, T. (1992). Soluble forms of membrane cofactor protein (CD46, MCP) are present in plasma, tears, and seminal fluid in normal subjects. *Clin. Exp. Immunol.* 89, 490–494.
- Harberts, E., Yao, K., Wohler, J.E., Maric, D., Ohayon, J., Henkin, R., and Jacobson, S. (2011). Human herpesvirus-6 entry into the central nervous system through the olfactory pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 13734–13739.
- Härmä, M., Höckerstedt, K., and Lautenschlager, I. (2003). Human herpesvirus-6 and acute liver failure. *Transplantation* 76, 536–539.
- He, J., McCarthy, M., Zhou, Y., Chandran, B., and Wood, C. (1996). Infection of primary human fetal astrocytes by human herpesvirus 6. *J. Virol.* 70, 1296–1300.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., et al. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740–745.
- Hidaka, Y., Kusuhara, K., Takabayashi, A., Okada, K., Miyazaki, C., Aoki, T., and Ueda, K. (1997). Symptomatic primary infection with human herpesvirus 6 variant A. *Clin. Infect. Dis.* 24, 1022–1023.
- Higashi, K., Asada, H., Kurata, T., Ishikawa, K., Hayami, M., Spriatna, Y., Sutarman, and Yamanishi, K. (1989). Presence of antibody to human herpesvirus 6 in monkeys. *J. Gen. Virol.* 70 ( Pt 12), 3171–3176.
- Holm, C.K., Paludan, S.R., and Fitzgerald, K.A. (2013). DNA recognition in immunity and disease. *Curr. Opin. Immunol.* 25, 13–18.
- Horvat, B., Rivaller, P., Varior-Krishnan, G., Cardoso, A., Gerlier, D., and Rabourdin-Combe, C. (1996). Transgenic mice expressing human measles virus (MV) receptor CD46 provide cells exhibiting different permissivities to MV infections. *J. Virol.* 70, 6673–6681.
- Hosking, M.P., and Lane, T.E. (2010). The role of chemokines during viral infection of the CNS. *PLoS Pathog.* 6, e1000937.

Hosking, M.P., Liu, L., Ransohoff, R.M., and Lane, T.E. (2009). A protective role for ELR+ chemokines during acute viral encephalomyelitis. *PLoS Pathog.* 5, e1000648.

Hsi, B.L., Hunt, J.S., and Atkinson, J.P. (1991). Differential expression of complement regulatory proteins on subpopulations of human trophoblast cells. *J. Reprod. Immunol.* 19, 209–223.

Hsiao, F.C., Lin, M., Tai, A., Chen, G., and Huber, B.T. (2006). Cutting edge: Epstein-Barr virus transactivates the HERV-K18 superantigen by docking to the human complement receptor 2 (CD21) on primary B cells. *J. Immunol.* 177, 2056–2060.

Huang, H., Li, Y., Sadaoka, T., Tang, H., Yamamoto, T., Yamanishi, K., and Mori, Y. (2006). Human herpesvirus 6 envelope cholesterol is required for virus entry. *J. Gen. Virol.* 87, 277–285.

I nagi, R., Guntapong, R., Nakao, M., Ishino, Y., Kawanishi, K., Isegawa, Y., and Yamanishi, K. (1996). Human herpesvirus 6 induces IL-8 gene expression in human hepatoma cell line, Hep G2. *J. Med. Virol.* 49, 34–40.

Inoue, Y., Yasukawa, M., and Fujita, S. (1997). Induction of T-cell apoptosis by human herpesvirus 6. *J. Virol.* 71, 3751–3759.

Isegawa, Y., Mukai, T., Nakano, K., Kagawa, M., Chen, J., Mori, Y., Sunagawa, T., Kawanishi, K., Sashihara, J., Hata, A., et al. (1999). Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B. *J. Virol.* 73, 8053–8063.

J ack, C.S., Arbour, N., Manusow, J., Montgrain, V., Blain, M., McCrea, E., Shapiro, A., and Antel, J.P. (2005). TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *J. Immunol.* 175, 4320–4330.

Janeway, C. (2001). *Immunobiology: the immune system in health and disease* (New York: Garland Pub.).

Jaworska, J., Gravel, A., and Flamand, L. (2010). Divergent susceptibilities of human herpesvirus 6 variants to type I interferons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 8369–8374.

Johnstone, R.W., and Loveland, B.E. (1993). Identification and quantification of complement regulator CD46 on normal human tissues. *Immunology* 79, 341–347.

Johnstone, R.W., Russell, S.M., Loveland, B.E., and McKenzie, I.F. (1993). Polymorphic expression of CD46 protein isoforms due to tissue-specific RNA splicing. *Mol. Immunol.* 30, 1231–1241.

Joubert, P.-E., Meiffren, G., Grégoire, I.P., Pontini, G., Richetta, C., Flacher, M., Azocar, O., Vidalain, P.-O., Vidal, M., Lotteau, V., et al. (2009). Autophagy induction by the pathogen receptor CD46. *Cell Host Microbe* 6, 354–366.

**K**ällström, H., Liszewski, M.K., Atkinson, J.P., and Jonsson, A.B. (1997). Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic *Neisseria*. *Mol. Microbiol.* *25*, 639–647.

Källström, H., Blackmer Gill, D., Albiger, B., Liszewski, M.K., Atkinson, J.P., and Jonsson, A.B. (2001). Attachment of *Neisseria gonorrhoeae* to the cellular pilus receptor CD46: identification of domains important for bacterial adherence. *Cell. Microbiol.* *3*, 133–143.

Karasneh, G.A., and Shukla, D. (2011). Herpes simplex virus infects most cell types in vitro: clues to its success. *Viol. J.* *8*, 481.

Karp, C.L., Wysocka, M., Wahl, L.M., Ahearn, J.M., Cuomo, P.J., Sherry, B., Trinchieri, G., and Griffin, D.E. (1996). Mechanism of suppression of cell-mediated immunity by measles virus. *Science* *273*, 228–231.

Karpus, W.J. (2001). Chemokines and central nervous system disorders. *J. Neurovirol.* *7*, 493–500.

Katsafanas, G.C., Schirmer, E.C., Wyatt, L.S., and Frenkel, N. (1996). In vitro activation of human herpesviruses 6 and 7 from latency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *93*, 9788–9792.

Kawai, T., and Akira, S. (2007). TLR signaling. *Semin. Immunol.* *19*, 24–32.

Kemper, C., Chan, A.C., Green, J.M., Brett, K.A., Murphy, K.M., and Atkinson, J.P. (2003). Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature* *421*, 388–392.

Kikuta, H., Nakane, A., Lu, H., Taguchi, Y., Minagawa, T., and Matsumoto, S. (1990). Interferon induction by human herpesvirus 6 in human mononuclear cells. *J. Infect. Dis.* *162*, 35–38.

Kim, Y.-M., Brinkmann, M.M., Paquet, M.-E., and Ploegh, H.L. (2008). UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* *452*, 234–238.

Klein, R.S., Lin, E., Zhang, B., Luster, A.D., Tollett, J., Samuel, M.A., Engle, M., and Diamond, M.S. (2005). Neuronal CXCL10 directs CD8+ T-cell recruitment and control of West Nile virus encephalitis. *J. Virol.* *79*, 11457–11466.

Knox, K.K., and Carrigan, D.R. (1994). Disseminated active HHV-6 infections in patients with AIDS. *Lancet* *343*, 577–578.

Kondo, K., and Yamanishi, K. (2007). HHV-6A, 6B, and 7: molecular basis of latency and reactivation. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P.S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, and K. Yamanishi, eds. (Cambridge: Cambridge University Press),.

Kondo, K., Kondo, T., Okuno, T., Takahashi, M., and Yamanishi, K. (1991). Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. *J. Gen. Virol.* *72* ( Pt 6), 1401–1408.

Kondo, K., Shimada, K., Sashihara, J., Tanaka-Taya, K., and Yamanishi, K. (2002). Identification of human herpesvirus 6 latency-associated transcripts. *J. Virol.* 76, 4145–4151.

Kositanont, U., Wasi, C., Wanprapar, N., Bowonkiratikachorn, P., Chokephaibulkit, K., Chearskul, S., Chimabuttra, K., Sutthent, R., Foongladda, S., Inagi, R., et al. (1999). Primary infection of human herpesvirus 6 in children with vertical infection of human immunodeficiency virus type 1. *J. Infect. Dis.* 180, 50–55.

Krueger, G.R., Sander, C., Hoffmann, A., Barth, A., Koch, B., and Braun, M. (1991). Isolation of human herpesvirus-6 (HHV-6) from patients with collagen vascular diseases. *In Vivo* 5, 217–225.

Krug, A., Luker, G.D., Barchet, W., Leib, D.A., Akira, S., and Colonna, M. (2004). Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* 103, 1433–1437.

Kumagai, T., Yoshikawa, T., Yoshida, M., Okui, T., Ihira, M., Nagata, N., Yano, S., Shiraki, K., Yamada, M., Ichihara, K., et al. (2006). Time course characteristics of human herpesvirus 6 specific cellular immune response and natural killer cell activity in patients with exanthema subitum. *J. Med. Virol.* 78, 792–799.

Kurata, T., Iwasaki, T., Sata, T., Wakabayashi, T., Yamaguchi, K., Okuno, T., Yamanishi, K., and Takei, Y. (1990). Viral pathology of human herpesvirus 6 infection. *Adv. Exp. Med. Biol.* 278, 39–47.

Kurt-Jones, E.A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L.M., Jones, L.P., Tripp, R.A., Walsh, E.E., Freeman, M.W., Golenbock, D.T., Anderson, L.J., et al. (2000). Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat. Immunol.* 1, 398–401.

Laconte, V., Verschoor, E.J., Nerrienet, E., and Gessain, A. (2005). A novel homologue of Human herpesvirus 6 in chimpanzees. *J. Gen. Virol.* 86, 2135–2140.

Lawrence, G.L., Chee, M., Craxton, M.A., Gompels, U.A., Honess, R.W., and Barrell, B.G. (1990). Human herpesvirus 6 is closely related to human cytomegalovirus. *J. Virol.* 64, 287–299.

Lee, W.J., Kwun, H.J., Kim, H.S., and Jang, K.L. (2003). Activation of the human endogenous retrovirus W long terminal repeat by herpes simplex virus type 1 immediate early protein 1. *Mol. Cells* 15, 75–80.

Leibovitch, E., Wohler, J.E., Cummings Macri, S.M., Motanic, K., Harberts, E., Gaitán, M.I., Maggi, P., Ellis, M., Westmoreland, S., Silva, A., et al. (2013). Novel marmoset (*Callithrix jacchus*) model of human Herpesvirus 6A and 6B infections: immunologic, virologic and radiologic characterization. *PLoS Pathog.* 9, e1003138.

Leong, H.N., Tuke, P.W., Tedder, R.S., Khanom, A.B., Eglin, R.P., Atkinson, C.E., Ward, K.N., Griffiths, P.D., and Clark, D.A. (2007). The prevalence of chromosomally integrated human herpesvirus 6 genomes in the blood of UK blood donors. *J. Med. Virol.* 79, 45–51.

- Levy, D.E., Marié, I.J., and Durbin, J.E. (2011). Induction and function of type I and III interferon in response to viral infection. *Curr Opin Virol* 1, 476–486.
- Li, L., Gu, B., Zhou, F., Chi, J., Wang, F., Peng, G., Xie, F., Qing, J., Feng, D., Lu, S., et al. (2011). Human herpesvirus 6 suppresses T cell proliferation through induction of cell cycle arrest in infected cells in the G2/M phase. *J. Virol.* 85, 6774–6783.
- Liszewski, M.K., Post, T.W., and Atkinson, J.P. (1991). Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu. Rev. Immunol.* 9, 431–455.
- Liszewski, M.K., Leung, M., Cui, W., Subramanian, V.B., Parkinson, J., Barlow, P.N., Manchester, M., and Atkinson, J.P. (2000). Dissecting sites important for complement regulatory activity in membrane cofactor protein (MCP; CD46). *J. Biol. Chem.* 275, 37692–37701.
- Lopez, C. (1975). Genetics of natural resistance to herpesvirus infections in mice. *Nature* 258, 152–153.
- Lopez, C., Pellett, P., Stewart, J., Goldsmith, C., Sanderlin, K., Black, J., Warfield, D., and Feorino, P. (1988). Characteristics of human herpesvirus-6. *J. Infect. Dis.* 157, 1271–1273.
- Di Luca, D., Dolcetti, R., Mirandola, P., De Re, V., Secchiero, P., Carbone, A., Boiocchi, M., and Cassai, E. (1994). Human herpesvirus 6: a survey of presence and variant distribution in normal peripheral lymphocytes and lymphoproliferative disorders. *J. Infect. Dis.* 170, 211–215.
- Ludford-Menting, M.J., Thomas, S.J., Crimeen, B., Harris, L.J., Loveland, B.E., Bills, M., Ellis, S., and Russell, S.M. (2002). A functional interaction between CD46 and DLG4: a role for DLG4 in epithelial polarization. *J. Biol. Chem.* 277, 4477–4484.
- Ludford-Menting, M.J., Crimeen-Irwin, B., Oliaro, J., Pasam, A., Williamson, D., Pedersen, N., Guillaumot, P., Christansen, D., Manie, S., Gaus, K., et al. (2011). The Reorientation of T-Cell Polarity and Inhibition of Immunological Synapse Formation by CD46 Involves Its Recruitment to Lipid Rafts. *J Lipids* 2011, 521863.
- Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R., and Iwasaki, A. (2003). Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 198, 513–520.
- Luppi, M., Barozzi, P., Maiorana, A., Marasca, R., and Torelli, G. (1994). Human herpesvirus 6 infection in normal human brain tissue. *J. Infect. Dis.* 169, 943–944.
- Luppi, M., Barozzi, P., Maiorana, A., Marasca, R., Trovato, R., Fano, R., Ceccherini-Nelli, L., and Torelli, G. (1995). Human herpesvirus-6: a survey of presence and distribution of genomic sequences in normal brain and neuroglial tumors. *J. Med. Virol.* 47, 105–111.

Luppi, M., Barozzi, P., Morris, C., Maiorana, A., Garber, R., Bonacorsi, G., Donelli, A., Marasca, R., Tabilio, A., and Torelli, G. (1999). Human herpesvirus 6 latently infects early bone marrow progenitors in vivo. *J. Virol.* *73*, 754–759.

Lusso, P. (1996). Human herpesvirus 6 (HHV-6). *Antiviral Res.* *31*, 1–21.

Lusso, P., Markham, P.D., Tschachler, E., di Marzo Veronese, F., Salahuddin, S.Z., Ablashi, D.V., Pahwa, S., Krohn, K., and Gallo, R.C. (1988). In vitro cellular tropism of human B-lymphotropic virus (human herpesvirus-6). *J. Exp. Med.* *167*, 1659–1670.

Lusso, P., Ensoli, B., Markham, P.D., Ablashi, D.V., Salahuddin, S.Z., Tschachler, E., Wong-Staal, F., and Gallo, R.C. (1989). Productive dual infection of human CD4+ T lymphocytes by HIV-1 and HHV-6. *Nature* *337*, 370–373.

Lusso, P., Markham, P.D., DeRocco, S.E., and Gallo, R.C. (1990). In vitro susceptibility of T lymphocytes from chimpanzees (*Pan troglodytes*) to human herpesvirus 6 (HHV-6): a potential animal model to study the interaction between HHV-6 and human immunodeficiency virus type 1 in vivo. *J. Virol.* *64*, 2751–2758.

Lusso, P., Malnati, M., De Maria, A., Balotta, C., DeRocco, S.E., Markham, P.D., and Gallo, R.C. (1991). Productive infection of CD4+ and CD8+ mature human T cell populations and clones by human herpesvirus 6. Transcriptional down-regulation of CD3. *J. Immunol.* *147*, 685–691.

Lusso, P., Malnati, M.S., Garzino-Demo, A., Crowley, R.W., Long, E.O., and Gallo, R.C. (1993). Infection of natural killer cells by human herpesvirus 6. *Nature* *362*, 458–462.

Lusso, P., Secchiero, P., and Crowley, R.W. (1994). In vitro susceptibility of *Macaca nemestrina* to human herpesvirus 6: a potential animal model of coinfection with primate immunodeficiency viruses. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *10*, 181–187.

Lusso, P., Garzino-Demo, A., Crowley, R.W., and Malnati, M.S. (1995). Infection of gamma/delta T lymphocytes by human herpesvirus 6: transcriptional induction of CD4 and susceptibility to HIV infection. *J. Exp. Med.* *181*, 1303–1310.

Lusso, P., Crowley, R.W., Malnati, M.S., Di Serio, C., Ponzoni, M., Biancotto, A., Markham, P.D., and Gallo, R.C. (2007). Human herpesvirus 6A accelerates AIDS progression in macaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 5067–5072.

Lüttichau, H.R., Clark-Lewis, I., Jensen, P.Ø., Moser, C., Gerstoft, J., and Schwartz, T.W. (2003). A highly selective CCR2 chemokine agonist encoded by human herpesvirus 6. *J. Biol. Chem.* *278*, 10928–10933.

**M**aeki, T., and Mori, Y. (2012). Features of Human Herpesvirus-6A and -6B Entry. *Adv Virol* *2012*, 384069.

Mallet, F., Bouton, O., Prudhomme, S., Cheynet, V., Oriol, G., Bonnaud, B., Lucotte, G., Duret, L., and Mandrand, B. (2004). The endogenous retroviral locus ERVWE1 is a bona fide gene involved in hominoid placental physiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 1731–1736.

Mameli, G., Poddighe, L., Astone, V., Delogu, G., Arru, G., Sotgiu, S., Serra, C., and Dolei, A. (2009). Novel reliable real-time PCR for differential detection of MSR<sub>V</sub>env and syncytin-1 in RNA and DNA from patients with multiple sclerosis. *J. Virol. Methods* *161*, 98–106.

Mameli, G., Poddighe, L., Mei, A., Uleri, E., Sotgiu, S., Serra, C., Manetti, R., and Dolei, A. (2012). Expression and activation by Epstein Barr virus of human endogenous retroviruses-W in blood cells and astrocytes: inference for multiple sclerosis. *PLoS ONE* *7*, e44991.

Manchester, M., Gairin, J.E., Patterson, J.B., Alvarez, J., Liszewski, M.K., Eto, D.S., Atkinson, J.P., and Oldstone, M.B. (1997). Measles virus recognizes its receptor, CD46, via two distinct binding domains within SCR1-2. *Virology* *233*, 174–184.

Marie, J.C., Astier, A.L., Rivaller, P., Roubourdin-Combe, C., Wild, T.F., and Horvat, B. (2002). Linking innate and acquired immunity: divergent role of CD46 cytoplasmic domains in T cell induced inflammation. *Nat. Immunol.* *3*, 659–666.

Matsumoto, H., Hatanaka, D., Ogura, Y., Chida, A., Nakamura, Y., and Nonoyama, S. (2011). Severe human herpesvirus 6-associated encephalopathy in three children: analysis of cytokine profiles and the carnitine palmitoyltransferase 2 gene. *Pediatr. Infect. Dis. J.* *30*, 999–1001.

Mayne, M., Cheadle, C., Soldan, S.S., Cermelli, C., Yamano, Y., Akhyani, N., Nagel, J.E., Taub, D.D., Becker, K.G., and Jacobson, S. (2001). Gene expression profile of herpesvirus-infected T cells obtained using immunomicroarrays: induction of proinflammatory mechanisms. *J. Virol.* *75*, 11641–11650.

McCune, J.M. (1996). Development and applications of the SCID-hu mouse model. *Semin. Immunol.* *8*, 187–196.

McKimmie, C.S., and Fazakerley, J.K. (2005). In response to pathogens, glial cells dynamically and differentially regulate Toll-like receptor gene expression. *J. Neuroimmunol.* *169*, 116–125.

Meeuwssen, S., Persoon-Deen, C., Bsibsi, M., Bajramovic, J.J., Ravid, R., De Bolle, L., and van Noort, J.M. (2005). Modulation of the cytokine network in human adult astrocytes by human herpesvirus-6A. *J. Neuroimmunol.* *164*, 37–47.

Minagar, A., Shapshak, P., Fujimura, R., Ownby, R., Heyes, M., and Eisdorfer, C. (2002). The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* *202*, 13–23.

Mock, D.J., Strathmann, F., Blumberg, B.M., and Mayer-Proschel, M. (2006). Infection of murine oligodendroglial precursor cells with Human Herpesvirus 6 (HHV-6)--establishment of a murine in vitro model. *J. Clin. Virol.* *37 Suppl 1*, S17–23.

Mori, Y., Dhepakson, P., Shimamoto, T., Ueda, K., Gomi, Y., Tani, H., Matsuura, Y., and Yamanishi, K. (2000). Expression of human herpesvirus 6B rep within infected cells and

binding of its gene product to the TATA-binding protein in vitro and in vivo. *J. Virol.* *74*, 6096–6104.

Mori, Y., Seya, T., Huang, H.L., Akkapaiboon, P., Dhepakson, P., and Yamanishi, K. (2002). Human herpesvirus 6 variant A but not variant B induces fusion from without in a variety of human cells through a human herpesvirus 6 entry receptor, CD46. *J. Virol.* *76*, 6750–6761.

Mori, Y., Yang, X., Akkapaiboon, P., Okuno, T., and Yamanishi, K. (2003a). Human herpesvirus 6 variant A glycoprotein H-glycoprotein L-glycoprotein Q complex associates with human CD46. *J. Virol.* *77*, 4992–4999.

Mori, Y., Akkapaiboon, P., Yang, X., and Yamanishi, K. (2003b). The human herpesvirus 6 U100 gene product is the third component of the gH-gL glycoprotein complex on the viral envelope. *J. Virol.* *77*, 2452–2458.

Mori, Y., Akkapaiboon, P., Yonemoto, S., Koike, M., Takemoto, M., Sadaoka, T., Sasamoto, Y., Konishi, S., Uchiyama, Y., and Yamanishi, K. (2004). Discovery of a second form of tripartite complex containing gH-gL of human herpesvirus 6 and observations on CD46. *J. Virol.* *78*, 4609–4616.

Mori, Y., Koike, M., Moriishi, E., Kawabata, A., Tang, H., Oyaizu, H., Uchiyama, Y., and Yamanishi, K. (2008). Human herpesvirus-6 induces MVB formation, and virus egress occurs by an exosomal release pathway. *Traffic* *9*, 1728–1742.

**N**acheva, E.P., Ward, K.N., Brazma, D., Virgili, A., Howard, J., Leong, H.N., and Clark, D.A. (2008). Human herpesvirus 6 integrates within telomeric regions as evidenced by five different chromosomal sites. *J. Med. Virol.* *80*, 1952–1958.

Nagyoszi, P., Wilhelm, I., Farkas, A.E., Fazakas, C., Dung, N.T.K., Haskó, J., and Krizbai, I.A. (2010). Expression and regulation of toll-like receptors in cerebral endothelial cells. *Neurochem. Int.* *57*, 556–564.

Naniche, D., Wild, T.F., Rabourdin-Combe, C., and Gerlier, D. (1992). A monoclonal antibody recognizes a human cell surface glycoprotein involved in measles virus binding. *J. Gen. Virol.* *73* ( Pt 10), 2617–2624.

Naniche, D., Varior-Krishnan, G., Cervoni, F., Wild, T.F., Rossi, B., Rabourdin-Combe, C., and Gerlier, D. (1993). Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J. Virol.* *67*, 6025–6032.

Nellåker, C., Yao, Y., Jones-Brando, L., Mallet, F., Yolken, R.H., and Karlsson, H. (2006). Transactivation of elements in the human endogenous retrovirus W family by viral infection. *Retrovirology* *3*, 44.

Ni Choileain, S., Weyand, N.J., Neumann, C., Thomas, J., So, M., and Astier, A.L. (2011). The dynamic processing of CD46 intracellular domains provides a molecular rheostat for T cell activation. *PLoS ONE* *6*, e16287.

Niiya, H., Lei, J., Guo, Y., Azuma, T., Yakushijin, Y., Sakai, I., Hato, T., Tohyama, M., Hashimoto, K., and Yasukawa, M. (2006). Human herpesvirus 6 impairs differentiation of monocytes to dendritic cells. *Exp. Hematol.* *34*, 642–653.

Nordström, I., and Eriksson, K. (2012). HHV-6B Induces IFN-Lambda1 Responses in Cord Plasmacytoid Dendritic Cells through TLR9. *PLoS ONE* *7*, e38683.

**O**gata, M. (2009). Human herpesvirus 6 in hematological malignancies. *J Clin Exp Hematop* *49*, 57–67.

Ogata, M., Kikuchi, H., Satou, T., Kawano, R., Ikewaki, J., Kohno, K., Kashima, K., Ohtsuka, E., and Kadota, J.-I. (2006). Human herpesvirus 6 DNA in plasma after allogeneic stem cell transplantation: incidence and clinical significance. *J. Infect. Dis.* *193*, 68–79.

Okada, N., Liszewski, M.K., Atkinson, J.P., and Caparon, M. (1995). Membrane cofactor protein (CD46) is a keratinocyte receptor for the M protein of the group A streptococcus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *92*, 2489–2493.

Oliaro, J., Pasam, A., Waterhouse, N.J., Browne, K.A., Ludford-Menting, M.J., Trapani, J.A., and Russell, S.M. (2006). Ligation of the cell surface receptor, CD46, alters T cell polarity and response to antigen presentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 18685–18690.

Olson, J.K., and Miller, S.D. (2004). Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J. Immunol.* *173*, 3916–3924.

Opsahl, M.L., and Kennedy, P.G.E. (2005). Early and late HHV-6 gene transcripts in multiple sclerosis lesions and normal appearing white matter. *Brain* *128*, 516–527.

Øster, B., Bundgaard, B., and Höllsberg, P. (2005). Human herpesvirus 6B induces cell cycle arrest concomitant with p53 phosphorylation and accumulation in T cells. *J. Virol.* *79*, 1961–1965.

**P**ark, B.S., Song, D.H., Kim, H.M., Choi, B.-S., Lee, H., and Lee, J.-O. (2009). The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* *458*, 1191–1195.

Pedersen, S.M., Oster, B., Bundgaard, B., and Höllsberg, P. (2006). Induction of cell-cell fusion from without by human herpesvirus 6B. *J. Virol.* *80*, 9916–9920.

Perron, H., Geny, C., Laurent, A., Mouriquand, C., Pellat, J., Perret, J., and Seigneurin, J.M. (1989). Leptomeningeal cell line from multiple sclerosis with reverse transcriptase activity and viral particles. *Res. Virol.* *140*, 551–561.

Perron, H., Lalande, B., Gratacap, B., Laurent, A., Genoulaz, O., Geny, C., Mallaret, M., Schuller, E., Stoebner, P., and Seigneurin, J.M. (1991). Isolation of retrovirus from patients with multiple sclerosis. *Lancet* *337*, 862–863.

Perron, H., Garson, J.A., Bedin, F., Beseme, F., Paranhos-Baccala, G., Komurian-Pradel, F., Mallet, F., Tuke, P.W., Voisset, C., Blond, J.L., et al. (1997). Molecular identification of a novel

retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 7583–7588.

Perron, H., Jouvin-Marche, E., Michel, M., Ounanian-Paraz, A., Camelo, S., Dumon, A., Jolivet-Reynaud, C., Marcel, F., Souillet, Y., Borel, E., et al. (2001). Multiple sclerosis retrovirus particles and recombinant envelope trigger an abnormal immune response in vitro, by inducing polyclonal Vbeta16 T-lymphocyte activation. *Virology* 287, 321–332.

Perron, H., Bernard, C., Bertrand, J.-B., Lang, A.B., Popa, I., Sanhadji, K., and Portoukalian, J. (2009). Endogenous retroviral genes, Herpesviruses and gender in Multiple Sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 286, 65–72.

Persson, B.D., Schmitz, N.B., Santiago, C., Zocher, G., Larvie, M., Scheu, U., Casasnovas, J.M., and Stehle, T. (2010). Structure of the extracellular portion of CD46 provides insights into its interactions with complement proteins and pathogens. *PLoS Pathog.* 6, e1001122.

Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., et al. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282, 2085–2088.

Potenza, L., Luppi, M., Barozzi, P., Rossi, G., Cocchi, S., Codeluppi, M., Pecorari, M., Masetti, M., Di Benedetto, F., Gennari, W., et al. (2008). HHV-6A in syncytial giant-cell hepatitis. *N. Engl. J. Med.* 359, 593–602.

**R**assa, J.C., Meyers, J.L., Zhang, Y., Kudaravalli, R., and Ross, S.R. (2002). Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 2281–2286.

Reynaud, J.M., and Horvat, B. (2013). Human Herpesvirus 6 and Neuroinflammation. *ISRN Virology* 2013, 11.

Riley, R.C., Kemper, C., Leung, M., and Atkinson, J.P. (2002). Characterization of human membrane cofactor protein (MCP; CD46) on spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 62, 534–546.

Riley-Vargas, R.C., Gill, D.B., Kemper, C., Liszewski, M.K., and Atkinson, J.P. (2004). CD46: expanding beyond complement regulation. *Trends Immunol.* 25, 496–503.

Rolland, A., Jouvin-Marche, E., Viret, C., Faure, M., Perron, H., and Marche, P.N. (2006). The envelope protein of a human endogenous retrovirus-W family activates innate immunity through CD14/TLR4 and promotes Th1-like responses. *J. Immunol.* 176, 7636–7644.

Rotola, A., Ravaioli, T., Gonelli, A., Dewhurst, S., Cassai, E., and Di Luca, D. (1998). U94 of human herpesvirus 6 is expressed in latently infected peripheral blood mononuclear cells and blocks viral gene expression in transformed lymphocytes in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 13911–13916.

Ruprecht, K., Obojes, K., Wengel, V., Gronen, F., Kim, K.S., Perron, H., Schneider-Schaulies, J., and Rieckmann, P. (2006). Regulation of human endogenous retrovirus W protein expression by herpes simplex virus type 1: implications for multiple sclerosis. *J. Neurovirol.* 12, 65–71.

Russell, S.M., Sparrow, R.L., McKenzie, I.F., and Purcell, D.F. (1992). Tissue-specific and allelic expression of the complement regulator CD46 is controlled by alternative splicing. *Eur. J. Immunol.* *22*, 1513–1518.

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

Samanta, M., Iwakiri, D., Kanda, T., Imaizumi, T., and Takada, K. (2006). EB virus-encoded RNAs are recognized by RIG-I and activate signaling to induce type I IFN. *EMBO J.* *25*, 4207–4214.

Samuelsson, C., Hausmann, J., Lauterbach, H., Schmidt, M., Akira, S., Wagner, H., Chaplin, P., Suter, M., O’Keefe, M., and Hochrein, H. (2008). Survival of lethal poxvirus infection in mice depends on TLR9, and therapeutic vaccination provides protection. *J. Clin. Invest.* *118*, 1776–1784.

Sánchez, A., Feito, M.J., and Rojo, J.M. (2004). CD46-mediated costimulation induces a Th1-biased response and enhances early TCR/CD3 signaling in human CD4+ T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* *34*, 2439–2448.

Sanders, V.J., Felisan, S., Waddell, A., and Tourtellotte, W.W. (1996). Detection of herpesviridae in postmortem multiple sclerosis brain tissue and controls by polymerase chain reaction. *J. Neurovirol.* *2*, 249–258.

Santoro, F., Kennedy, P.E., Locatelli, G., Malnati, M.S., Berger, E.A., and Lusso, P. (1999). CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell* *99*, 817–827.

Santoro, F., Greenstone, H.L., Insinga, A., Liszewski, M.K., Atkinson, J.P., Lusso, P., and Berger, E.A. (2003). Interaction of glycoprotein H of human herpesvirus 6 with the cellular receptor CD46. *J. Biol. Chem.* *278*, 25964–25969.

Sasai, M., Linehan, M.M., and Iwasaki, A. (2010). Bifurcation of Toll-like receptor 9 signaling by adaptor protein 3. *Science* *329*, 1530–1534.

Schirmer, E.C., Wyatt, L.S., Yamanishi, K., Rodriguez, W.J., and Frenkel, N. (1991). Differentiation between two distinct classes of viruses now classified as human herpesvirus 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *88*, 5922–5926.

Secchiero, P., Carrigan, D.R., Asano, Y., Benedetti, L., Crowley, R.W., Komaroff, A.L., Gallo, R.C., and Lusso, P. (1995). Detection of human herpesvirus 6 in plasma of children with primary infection and immunosuppressed patients by polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.* *171*, 273–280.

Segerman, A., Atkinson, J.P., Marttila, M., Dennerquist, V., Wadell, G., and Arnberg, N. (2003). Adenovirus type 11 uses CD46 as a cellular receptor. *J. Virol.* *77*, 9183–9191.

Serra, C., Sotgiu, S., Mameli, G., Pugliatti, M., Rosati, G., and Dolei, A. (2001). Multiple sclerosis and multiple sclerosis-associated retrovirus in Sardinia. *Neurol. Sci.* *22*, 171–173.

- Seya, T., Turner, J.R., and Atkinson, J.P. (1986). Purification and characterization of a membrane protein (gp45-70) that is a cofactor for cleavage of C3b and C4b. *J. Exp. Med.* *163*, 837–855.
- Seya, T., Nomura, M., Murakami, Y., Begum, N.A., Matsumoto, M., and Nagasawa, S. (1998). CD46 (membrane cofactor protein of complement, measles virus receptor): structural and functional divergence among species (review). *Int. J. Mol. Med.* *1*, 809–816.
- Seya, T., Hirano, A., Matsumoto, M., Nomura, M., and Ueda, S. (1999). Human membrane cofactor protein (MCP, CD46): multiple isoforms and functions. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *31*, 1255–1260.
- Shao, S., He, F., Yang, Y., Yuan, G., Zhang, M., and Yu, X. (2012). Th17 cells in type 1 diabetes. *Cell. Immunol.* *280*, 16–21.
- Simpson, S., Jr, Taylor, B., Dwyer, D.E., Taylor, J., Blizzard, L., Ponsonby, A.-L., Pittas, F., Dwyer, T., and van der Mei, I. (2012). Anti-HHV-6 IgG titer significantly predicts subsequent relapse risk in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* *18*, 799–806.
- Sirena, D., Lilienfeld, B., Eisenhut, M., Kälin, S., Boucke, K., Beerli, R.R., Vogt, L., Ruedl, C., Bachmann, M.F., Greber, U.F., et al. (2004). The human membrane cofactor CD46 is a receptor for species B adenovirus serotype 3. *J. Virol.* *78*, 4454–4462.
- Smith, A., Santoro, F., Di Lullo, G., Dagna, L., Verani, A., and Lusso, P. (2003). Selective suppression of IL-12 production by human herpesvirus 6. *Blood* *102*, 2877–2884.
- Smith, A.P., Paolucci, C., Di Lullo, G., Burastero, S.E., Santoro, F., and Lusso, P. (2005). Viral replication-independent blockade of dendritic cell maturation and interleukin-12 production by human herpesvirus 6. *J. Virol.* *79*, 2807–2813.
- Soldan, S.S., Bertj, R., Salem, N., Secchiero, P., Flamand, L., Calabresi, P.A., Brennan, M.B., Maloni, H.W., McFarland, H.F., Lin, H.C., et al. (1997). Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nat. Med.* *3*, 1394–1397.
- Soldan, S.S., Fogdell-Hahn, A., Brennan, M.B., Mittleman, B.B., Ballerini, C., Massacesi, L., Seya, T., McFarland, H.F., and Jacobson, S. (2001). Elevated serum and cerebrospinal fluid levels of soluble human herpesvirus type 6 cellular receptor, membrane cofactor protein, in patients with multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* *50*, 486–493.
- Sotgiu, S., Arru, G., Mameli, G., Serra, C., Pugliatti, M., Rosati, G., and Dolei, A. (2006). Multiple sclerosis-associated retrovirus in early multiple sclerosis: a six-year follow-up of a Sardinian cohort. *Mult. Scler.* *12*, 698–703.
- Sullivan, B.M., and Coscoy, L. (2008). Downregulation of the T-cell receptor complex and impairment of T-cell activation by human herpesvirus 6 u24 protein. *J. Virol.* *82*, 602–608.

Sutkowski, N., Conrad, B., Thorley-Lawson, D.A., and Huber, B.T. (2001). Epstein-Barr virus transactivates the human endogenous retrovirus HERV-K18 that encodes a superantigen. *Immunity* 15, 579–589.

Svensson, A., Almqvist, N., Chandy, A.G., Nordström, I., and Eriksson, K. (2010). Exposure to human herpes virus type 6 protects against asthma in mice. *J Allerg Ther* 1.

**T**ai, A.K., Luka, J., Ablashi, D., and Huber, B.T. (2009). HHV-6A infection induces expression of HERV-K18-encoded superantigen. *J. Clin. Virol.* 46, 47–48.

Takahashi, K., Sonoda, S., Higashi, K., Kondo, T., Takahashi, H., Takahashi, M., and Yamanishi, K. (1989). Predominant CD4 T-lymphocyte tropism of human herpesvirus 6-related virus. *J. Virol.* 63, 3161–3163.

Takeda, K., Okuno, T., Isegawa, Y., and Yamanishi, K. (1996). Identification of a variant A-specific neutralizing epitope on glycoprotein B (gB) of human herpesvirus-6 (HHV-6). *Virology* 222, 176–183.

Takeda, S., Miyazaki, D., Sasaki, S., Yamamoto, Y., Terasaka, Y., Yakura, K., Yamagami, S., Ebihara, N., and Inoue, Y. (2011). Roles played by toll-like receptor-9 in corneal endothelial cells after herpes simplex virus type 1 infection. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 6729–6736.

Tang, H., Kawabata, A., Takemoto, M., Yamanishi, K., and Mori, Y. (2008). Human herpesvirus-6 infection induces the reorganization of membrane microdomains in target cells, which are required for virus entry. *Virology* 378, 265–271.

Taniguchi, T., Shimamoto, T., Isegawa, Y., Kondo, K., and Yamanishi, K. (2000). Structure of transcripts and proteins encoded by U79-80 of human herpesvirus 6 and its subcellular localization in infected cells. *Virology* 271, 307–320.

Tatsuo, H., Ono, N., Tanaka, K., and Yanagi, Y. (2000). SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* 406, 893–897.

Thäder-Voigt, A., Jacobs, E., Lehmann, W., and Bandt, D. (2011). Development of a microwell adapted immunoblot system with recombinant antigens for distinguishing human herpesvirus (HHV)6A and HHV6B and detection of human cytomegalovirus. *Clin. Chem. Lab. Med.* 49, 1891–1898.

Theodore, W.H., Epstein, L., Gaillard, W.D., Shinnar, S., Wainwright, M.S., and Jacobson, S. (2008). Human herpes virus 6B: a possible role in epilepsy? *Epilepsia* 49, 1828–1837.

Thompson, M.R., Kaminski, J.J., Kurt-Jones, E.A., and Fitzgerald, K.A. (2011). Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses* 3, 920–940.

Tsujimura, A., Shida, K., Kitamura, M., Nomura, M., Takeda, J., Tanaka, H., Matsumoto, M., Matsumiya, K., Okuyama, A., Nishimune, Y., et al. (1998). Molecular cloning of a murine homologue of membrane cofactor protein (CD46): preferential expression in testicular germ cells. *Biochem. J.* 330 ( Pt 1), 163–168.

Turcanova, V.L., Bundgaard, B., and Höllsberg, P. (2009). Human herpesvirus-6B induces expression of the human endogenous retrovirus K18-encoded superantigen. *J. Clin. Virol.* *46*, 15–19.

**V**aknin-Dembinsky, A., Murugaiyan, G., Hafler, D.A., Astier, A.L., and Weiner, H.L. (2008). Increased IL-23 secretion and altered chemokine production by dendritic cells upon CD46 activation in patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* *195*, 140–145.

**W**ang, F.-Z., and Pellett, P.E. (2007). HHV-6A, 6B, and 7: immunobiology and host response. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P.S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, and K. Yamanishi, eds. (Cambridge: Cambridge University Press),.

Wang, F., Yao, K., Yin, Q.-Z., Zhou, F., Ding, C.-L., Peng, G.-Y., Xu, J., Chen, Y., Feng, D.-J., Ma, C.-L., et al. (2006). Human herpesvirus-6-specific interleukin 10-producing CD4+ T cells suppress the CD4+ T-cell response in infected individuals. *Microbiol. Immunol.* *50*, 787–803.

Wang, G., Liszewski, M.K., Chan, A.C., and Atkinson, J.P. (2000). Membrane cofactor protein (MCP; CD46): isoform-specific tyrosine phosphorylation. *J. Immunol.* *164*, 1839–1846.

Wang, X., Ma, C., Wu, J., and Zhu, J. (2013). Roles of T helper 17 cells and interleukin-17 in neuroautoimmune diseases with emphasis on multiple sclerosis and Guillain-Barré syndrome as well as their animal models. *J. Neurosci. Res.* 871–881.

Ward, K.N. (2005). The natural history and laboratory diagnosis of human herpesviruses-6 and -7 infections in the immunocompetent. *J. Clin. Virol.* *32*, 183–193.

Wilborn, F., Schmidt, C.A., Brinkmann, V., Jendroska, K., Oettle, H., and Siegert, W. (1994). A potential role for human herpesvirus type 6 in nervous system disease. *J. Neuroimmunol.* *49*, 213–214.

Wu, E., Trauger, S.A., Pache, L., Mullen, T.-M., von Seggern, D.J., Siuzdak, G., and Nemerow, G.R. (2004). Membrane cofactor protein is a receptor for adenoviruses associated with epidemic keratoconjunctivitis. *J. Virol.* *78*, 3897–3905.

**Y**alcin, S., Mukai, T., Kondo, K., Ami, Y., Okawa, T., Kojima, A., Kurata, T., and Yamanishi, K. (1992). Experimental infection of cynomolgus and African green monkeys with human herpesvirus 6. *J. Gen. Virol.* *73* ( Pt 7), 1673–1677.

Yamanishi, K., Okuno, T., Shiraki, K., Takahashi, M., Kondo, T., Asano, Y., and Kurata, T. (1988). Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet* *1*, 1065–1067.

Yanagihara, K., Tanaka-Taya, K., Itagaki, Y., Toribe, Y., Arita, K., Yamanishi, K., and Okada, S. (1995). Human herpesvirus 6 meningoencephalitis with sequelae. *Pediatr. Infect. Dis. J.* *14*, 240–242.

Yao, K., Graham, J., Akahata, Y., Oh, U., and Jacobson, S. (2010a). Mechanism of neuroinflammation: enhanced cytotoxicity and IL-17 production via CD46 binding. *J Neuroimmune Pharmacol* 5, 469–478.

Yao, K., Crawford, J.R., Komaroff, A.L., Ablashi, D.V., and Jacobson, S. (2010b). Review part 2: Human herpesvirus-6 in central nervous system diseases. *J. Med. Virol.* 82, 1669–1678.

Yasukawa, M., Inoue, Y., Ohminami, H., Terada, K., and Fujita, S. (1998). Apoptosis of CD4+ T lymphocytes in human herpesvirus-6 infection. *J. Gen. Virol.* 79 ( Pt 1), 143–147.

Yasukawa, M., Ohminami, H., Sada, E., Yakushijin, Y., Kaneko, M., Yanagisawa, K., Kohno, H., Bando, S., and Fujita, S. (1999). Latent infection and reactivation of human herpesvirus 6 in two novel myeloid cell lines. *Blood* 93, 991–999.

Yoshikawa, T., Asano, Y., Ihira, M., Suzuki, K., Ohashi, M., Suga, S., Kudo, K., Horibe, K., Kojima, S., Kato, K., et al. (2002). Human herpesvirus 6 viremia in bone marrow transplant recipients: clinical features and risk factors. *J. Infect. Dis.* 185, 847–853.

Yoshikawa, T., Ohashi, M., Miyake, F., Fujita, A., Usui, C., Sugata, K., Suga, S., Hashimoto, S., and Asano, Y. (2009). Exanthem subitum-associated encephalitis: nationwide survey in Japan. *Pediatr. Neurol.* 41, 353–358.

Zaffran, Y., Destaing, O., Roux, A., Ory, S., Nheu, T., Jurdic, P., Rabourdin-Combe, C., and Astier, A.L. (2001). CD46/CD3 costimulation induces morphological changes of human T cells and activation of Vav, Rac, and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase. *J. Immunol.* 167, 6780–6785.

Zerr, D.M. (2006). Human herpesvirus 6 and central nervous system disease in hematopoietic cell transplantation. *J. Clin. Virol.* 37 Suppl 1, S52–56.

Zerr, D.M., Gooley, T.A., Yeung, L., Huang, M.L., Carpenter, P., Wade, J.C., Corey, L., and Anasetti, C. (2001). Human herpesvirus 6 reactivation and encephalitis in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.* 33, 763–771.

Zhang, B., Chan, Y.K., Lu, B., Diamond, M.S., and Klein, R.S. (2008). CXCR3 mediates region-specific antiviral T cell trafficking within the central nervous system during West Nile virus encephalitis. *J. Immunol.* 180, 2641–2649.

Zhu, J., Huang, X., and Yang, Y. (2007). Innate immune response to adenoviral vectors is mediated by both Toll-like receptor-dependent and -independent pathways. *J. Virol.* 81, 3170–3180.

Zou, P., Isegawa, Y., Nakano, K., Haque, M., Horiguchi, Y., and Yamanishi, K. (1999). Human herpesvirus 6 open reading frame U83 encodes a functional chemokine. *J. Virol.* 73, 5926–5933.

# Annexes

---



## **ARTICLE 3 (Revue)**

# **Human Herpesvirus 6 and neuroinflammation**

Joséphine M. Reynaud et Branka Horvat

*ISRN Virology, 2013*



## Review Article

# Human Herpesvirus 6 and Neuroinflammation

**Joséphine M. Reynaud and Branka Horvat**

*International Center for Infectiology Research (CIRI), INSERM U1111, CNRS UMR5308, University of Lyon 1, ENS-Lyon, 21 Avenue T. Garnier, 69365 Lyon, France*

Correspondence should be addressed to Branka Horvat; [branka.horvat@inserm.fr](mailto:branka.horvat@inserm.fr)

Received 21 January 2013; Accepted 13 February 2013

Academic Editors: B. Kim, M. Magnani, and L. Margolis

Copyright © 2013 J. M. Reynaud and B. Horvat. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Human herpesvirus (HHV-) 6A and HHV-6B are two distinct  $\beta$ -herpesviruses which have been associated with various neurological diseases, including encephalitis, meningitis, epilepsy, and multiple sclerosis. Although the reactivation of both viruses is recognized as the cause of some neurological complications in conditions of immunosuppression, their involvement in neuroinflammatory diseases in immunocompetent people is still unclear, and the mechanisms involved have not been completely elucidated. Here, we review the available data providing evidence for the capacity of HHV-6A and -6B to infect the central nervous system and to induce proinflammatory responses by infected cells. We discuss the potential role of both viruses in neuroinflammatory pathologies and the mechanisms which could explain virus-induced neuropathogenesis.

## 1. Introduction

Human herpesvirus (HHV-) 6 was first isolated in 1986 by Salahuddin and colleagues [1]. This enveloped DNA virus belongs to the  $\beta$ -herpesvirus family and, together with its closest homologue HHV-7, forms the roseoloviruses subfamily. HHV-6 is widely spread in the population (seroprevalence > 90%) and can establish a persistent and most often asymptomatic infection in humans. Based on genetic, epidemiological, and functional features, the numerous isolated strains of HHV-6 were initially separated into two variants, HHV-6A and HHV-6B, which have recently been recognized as two distinct viruses. HHV-6A and -6B share an overall sequence identity of 90%, and several open reading frames are present in only one of the two viruses [2]. Primary infection with HHV-6B generally happens before the age of two; the virus is transmitted through saliva and close contacts with parents [3] and provokes *exanthem subitum* (or roseola), a benign febrile illness with skin rash. HHV-6A infection is thought to happen later in life and was not yet clearly identified as the causative agent for any disease.

To date, the only identified cellular receptor for both HHV-6A and -6B is the complement-regulatory transmembrane protein CD46 [4]. This protein is ubiquitously expressed in humans, allowing the viruses to infect a wide range of cells and tissues, including cells from the central

nervous system (CNS). Both viruses have a high tropism towards T cells, which are the best virus producers *in vitro*, and can establish a persistent infection in different tissues, including the salivary glands (for HHV-6B only) and peripheral lymphocytes.

In immunocompromised patients, HHV-6A and -6B often reactivate and can provoke neurological pathologies. Moreover, many clinical studies have reported an association between HHV-6A and -6B and neuroinflammatory diseases, such as encephalitis or multiple sclerosis (MS), suggesting a role for both viruses in inflammatory processes. Indeed, although HHV-6A and -6B are generally considered as immunosuppressive agents, allowing them to evade the immune system, reports showing their proinflammatory properties are accumulating. Here, we review the available data providing evidence for HHV-6A and -6B infection in the human brain and their involvement in neurological diseases, and we discuss the potential mechanisms by which they could participate in neuroinflammation.

## 2. HHV-6A and HHV-6B Are Neurotropic Viruses

*2.1. Evidence for the Presence of HHV-6A and -6B in the Brain.* Although HHV-6 was first identified as a lymphotropic virus,

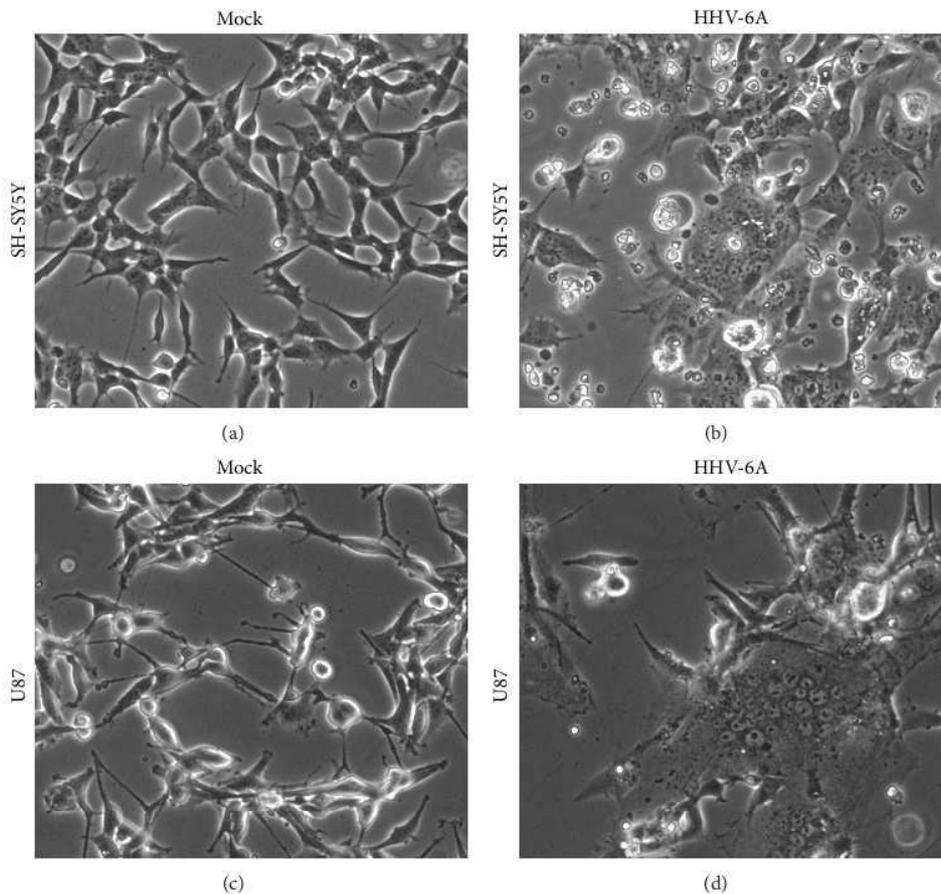


FIGURE 1: HHV-6A infects SH-SY5Y (neuroblastoma) and U87 (glioblastoma) cells and induces syncytia formation. Cells were infected at 1 TCID<sub>50</sub>/cell and observed 24 hours after infection.

it is now admitted that both HHV-6A and -B can also infect the brain. Indeed, several studies have reported the presence of HHV-6 DNA in different brain regions of healthy immunocompetent adults [5–11] as well as some viral transcripts, using *in situ* hybridization techniques [12]. However, in most of these studies, investigators failed to detect viral antigens, suggesting that HHV-6 may establish a latent infection in the brain in normal conditions. Overall, HHV-6B DNA was found more frequently in the brain than HHV-6A [7–9], in correlation with its higher prevalence, which indicates that both viruses have similar neuroinvasive properties. In contradiction, the analysis of the presence of HHV-6A and -6B DNA in the cerebrospinal fluid (CSF) of children with acute primary infection suggested that HHV-6A infection is more often restricted to the brain [13]. In some cases, both viruses can coexist in the brain, though their DNA was detected in different brain areas [9, 13]. Very little is known concerning the mechanisms of HHV-6 entry in the CNS. HHV-6B is thought to invade the brain and to establish persistent infection directly after primary infection [14]. Concerning HHV-6A, a recent study indicated that it might be able to travel through the olfactory pathway to reach the

brain, thanks to its ability to infect specialized glial cells located in the nasal cavity [15].

**2.2. Cell Tropism within the Human Brain.** Histology analyses suggest that HHV-6A and -6B infect oligodendrocytes *in vivo* [7, 12], especially in case of productive infection (characterized by mRNA expression and production of viral proteins). *In vitro* experiments confirmed the capacity of the virus to infect oligodendroglial cell lines [16–18], as well as primary adult oligodendrocytes [19] and primary oligodendrocyte precursors, in which both HHV-6A and HHV-6B were able to induce syncytia formation, cell cycle arrest, and cell differentiation [20]. By histology analysis, Donati et al. found HHV-6 antigens in cells expressing the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the brain of patients with temporal lobe epilepsy, indicating that HHV-6 can also infect astrocytes *in vivo* [21]. HHV-6A inoculation resulted in productive infection in primary fetal astrocytes [22–24] and induced apoptosis in both primary cells and astrogloma cell lines [17, 25] with syncytia formation (Figure 1). On the contrary, infection of astrocytes with HHV-6B seems to be less efficient, leading to decreasing viral DNA load and fewer

TABLE 1: Modulation of the immune response by HHV-6A and HHV-6B in different cell types.

Cell type	HHV-6A	HHV-6B	References
Lymphoid cells			
PBMC	↗ IL-1 $\beta$ <sup>b</sup> , TNF $\alpha$ <sup>b</sup> , IFN $\alpha$ <sup>b</sup> , IL-10, IL-15 ↘ IL-12, IFN $\gamma$ , IL-2		[29, 41–43]
T cells (primary and cell lines)	↗ IL-18, IL-2R, IFN $\gamma$ R, CCL-2 ↘ IL-10, IL-14, IL-10R, IL-13R, IL-2	↗ IL-18, IL-2R ↘ IL-10, IL-14, IL-10R, IL-13R	[29, 44, 45]
NK cells	↗ IL-15, cytotoxicity		[46]
Monocytes (primary and cell lines)	↗ TNF $\alpha$ , IL-10, IL-12, IL-15		[47, 48, 126]
Tonsillar cells ( <i>ex vivo</i> )	↗ CCL-5	↗ CCL-5	[50, 51]
Dendritic cells	↘ maturation <sup>b</sup> , IL-12 <sup>b</sup>	↗ IFN $\alpha$ -1 <sup>b</sup> ↘ maturation <sup>b</sup> , IL-12 <sup>b</sup>	[40, 49]
Macrophages	↘ IL-12		[39]
Brain cells			
Astrocytes (primary and cell line)	↗ CCL-5, CCL-2, IL-6, CXCL-2, CCL-3, IL-1 $\beta$ , GM-CSF, CXCL-6, IL-10, TNF $\alpha$ , IL-7R ↘ CCR-2	↗ IL-6 <sup>b</sup> , IL-1 $\beta$ <sup>b</sup>	[45, 127]
Other cell types			
Endothelial cells	↗ CCL-5, CXCL-8, CCL-2		[52, 53]
Hepatoma cells	↗ CXCL-8 <sup>a</sup>		[54]

↗: enhanced production; ↘: inhibited production.

<sup>a</sup>Replication-dependent effect; <sup>b</sup>replication-independent effect.

morphological changes, which indicates that the two HHV-6 viruses may have different infection patterns within the brain. Fewer data concerning the infection of neurons and microglial cells are available; yet, some studies suggested that both cell types may be susceptible to HHV-6A and/or -6B infection *in vitro* [16, 17, 19, 24]. HHV-6A seems to be able to induce the formation of syncytia in neuroblastoma cell lines (Figure 1), and infected neurons were detected by immunostaining in patients who succumbed to HHV-6 encephalitis [26].

Both HHV-6A and -6B are then able to invade the central nervous system and to establish a persistent infection. However, HHV-6A seems to infect astrocytes and neurons more efficiently than HHV-6B, which may lead to the induction of different CNS pathologies.

### 3. Evidence for Proinflammatory Effects of HHV-6

HHV-6 was initially identified as an immunosuppressive virus. Primary infection with HHV-6B is indeed often associated with a decrease in leukocyte numbers [3], and both HHV-6A and -6B preferentially infect T lymphocytes *in vivo* and *in vitro*, reducing their proliferation [27–29] and inducing their apoptosis [30, 31]. Nevertheless, HHV-6A and -6B have also been demonstrated to exhibit proinflammatory properties in different contexts and have been suggested as potential agents in several inflammatory diseases, such as

hepatitis [32], Sjögren's syndrome [33, 34], rheumatoid arthritis [35, 36], systemic lupus erythematosus [35, 37], and more recently Hashimoto's thyroiditis [38]. While these associations remain hypothetical, extensive *in vitro* studies provide evidence for HHV-6A and -6B proinflammatory effects on a variety of cell types and tissues (summarized in Table 1).

The effects of HHV-6A and -6B on the cytokine expression profile in different types of immune cells have been widely investigated. Some studies have suggested that both viruses can induce a Th2 profile in T cells through the inhibition of IL-12 secretion by dendritic cells (DCs) and macrophages [39, 40] and through the induction of IL-10 production by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) [41]. In contradiction, other reports have shown that HHV-6 infection upregulates the expression of proinflammatory cytokines, including IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , and IFN $\alpha$  in PBMC [42, 43], induces IL-18 and IFN $\gamma$  receptor, and reduces IL-10 and IL-14 expression in T cells [44, 45], thus directing T cells towards a Th1 phenotype.

HHV-6A was also shown to exacerbate the cytotoxicity and IL-15 production in NK cells [46], as well as TNF $\alpha$  and IL-15 expression in monocytes [47, 48]. In plasmacytoid DC, HHV-6B was recently shown to induce type III IFN production, which has similar antiviral properties as type I IFN but had no effect on the Th1/Th2 balance [49].

In addition, studies on *ex vivo* cultures of lymphoid tissue showed that both HHV-6A and -6B can induce the secretion of chemokines in infected cells. Grivel et al. cultured freshly excised human tonsils and demonstrated that HHV-6A and -6B productive infection could be achieved, inducing

an upregulation of CCL-5 and CCL-3 expression [50, 51]. Meeuwssen et al. performed a transcriptional microarray analysis on infected astrocytes and showed that HHV-6A infection increased the expression of many proinflammatory cytokines upon stimulation with TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IFN $\gamma$ , including several chemokines (e.g., CCL-2, CCL-5, and CXCL-2) [45]. Moreover, HHV-6A was found to up-regulate the production of chemokines in primary endothelial cells [52, 53] and in a hepatoma cell line [54], indicating that the infection can promote the recruitment of leukocytes to different targeted tissues.

Altogether, these studies indicate that HHV-6A and -6B both have diverse proinflammatory effects on a variety of cell types. Although they could exhibit anti-inflammatory effects on some cell types, they are also able to increase the production of proinflammatory cytokines by some other cell types (Table 1) and to induce the development of a Th1 phenotype in T cells, thus eliciting the immune response. Moreover, they participate in the establishment of the inflammation in infected tissues by inducing the production of chemokines by resident cells. There is an apparent contradiction in the observed effects of HHV-6 infection, which include both the induction of immunosuppression and the promotion of inflammation. These differences may depend on the analyzed cell types or on infection kinetics representing different stages of infection and would require additional studies to be better understood.

#### 4. HHV-6 and Neurological Diseases

HHV-6A and HHV-6B have both been directly or indirectly associated with neurological diseases [55–57], in cases of primary infection in immunocompetent young children, reactivation in otherwise healthy adults [3], or in immunosuppressed patients [58].

**4.1. Infection in the “Immunocompetent” Population.** HHV-6B was long ago conclusively identified as the etiologic agent for *exanthem subitum* (ES), a common infant febrile illness with skin rash [59]. Although ES is generally benign, it can be associated with various neurological complications, including convulsions, seizures, and encephalitis [60–62], often resulting in ataxia and epilepsy [63–66]. The most severe forms of encephalitis associated with ES can even lead to fatal outcome [67, 68].

In immunocompetent adults, evidence for the direct implication of HHV-6A or -6B in neurological diseases is more difficult to provide. Viral DNA loads in the serum and CSF, as well as IgM levels, are commonly used to detect HHV-6 infection. Based on these data, some cases of probable HHV-6-related encephalitis or meningoencephalitis have been reported in otherwise healthy adults and sometimes successfully treated with antiviral drugs [69–71]. Furthermore, studies of patients with encephalitis of unknown etiology strongly suggested that HHV-6 could be involved in disease establishment in certain cases [72–74].

**4.2. Reactivation in Immunosuppressed Patients.** As for other latent human herpesviruses, immunological defects are able to trigger HHV-6 reactivation from latency. Indeed, HHV-6A and -6B have been suggested to reactivate in immunocompromised patients, which received chemotherapy treatments or were diagnosed with AIDS. In hematopoietic stem cell transplant recipients especially, HHV-6 DNA (mostly -6B) was detected in the serum or PBMC in around 50% of the cases [58, 75, 76], indicating that viral reactivation has occurred. In several case reports, where no other possible cause was found, neurological complications in immunosuppressed people have been attributed to HHV-6 reactivation [56, 58]. Its involvement in encephalitis development was generally supported by the detection of viral DNA in the CSF and more rarely by the presence of viral proteins in affected areas of the brain at autopsy [26, 77, 78]. Moreover, several epidemiological studies have suggested a correlation between the risk of developing neurological symptoms and HHV-6 reactivation [79–81].

**4.3. Association with Multiple Sclerosis.** HHV-6 has long been cited as a potential candidate virus for the etiology of multiple sclerosis (MS). The importance of this inflammatory neurological disease, which represents the first cause of nontraumatic handicap in young adults, particularly inspired the research in this area. Abundant clinical studies have highlighted a correlation between MS and several parameters assessing for HHV-6 infection. For instance, the levels of HHV-6 DNA in the serum, which are characteristic of ongoing infection, are significantly increased in MS patients when compared to healthy donors or with patients with other diseases [82–85]. HHV-6 DNA was also detected at higher frequencies in the CSF and in the peripheral blood mononuclear cells of MS patients [82, 84, 86]. Moreover, the levels of HHV-6-specific IgG and IgM in the serum and in the CSF were reported to be higher in MS patients in several studies [83, 86, 87], although this phenomenon does not appear to be specific for HHV-6. Indeed, some groups have reported similar increases in the titers of antibodies against other viruses including Epstein-Barr virus or varicella-zoster virus. Soldan et al. also showed that lymphoproliferative responses against HHV-6 antigens were increased in MS patients [88]. The analysis of brain biopsies and postmortem tissues indicated that HHV-6 DNA was present more frequently in the brain of MS patients than in control brains, and that it was also more frequent in MS lesions than in normal areas of the same brains. Immunohistochemistry analyses confirmed the presence of viral proteins in oligodendrocytes and astrocytes in the brain from MS patients, with a higher frequency in demyelinating plaques [7, 12, 87, 89, 90]. Most interestingly, viral loads were detected more frequently, and levels of HHV-6-specific IgG were increased in MS patients experiencing disease exacerbation [84, 91–93], thus suggesting a correlation between HHV-6 infection and MS relapses.

As the distinction of HHV-6A and -6B as two different viruses was only recently adopted, many of the initial studies do not discriminate between the two variants. However, based on few reports, it appears that HHV-6A is found more

frequently than -6B in the serum of MS patients [94]. Especially in case of active infection, Alvarez-Lafuente et al. have found only HHV-6A [92]. In contrast, in one study, intrathecal HHV-6B IgG levels were more abundant than HHV-6A IgG in MS patients, and only HHV-6B-specific IgM levels were found [95].

The potential association between HHV-6A and HHV-6B infection and MS has often been discussed and remains controversial. Some studies provided contradictory results [96–98], raising methodological and technical questions, especially concerning the choice of control groups and the immunological state of the included patients, who often receive immunosuppressive treatments, that may provoke latent herpesvirus reactivation by itself. Some studies have taken these matters into account and therefore provide solid data supporting the existence of a correlation between HHV-6 infection and MS pathology. Yet, whether HHV-6 infection is the etiologic cause, a factor for disease progression, or a consequence of MS remains unclear and would need further investigation.

## 5. Potential Mechanisms for HHV-6-Induced Neuroinflammation

Although the potential role of HHV-6A and -6B in MS has not been completely elucidated, both viruses have been conclusively involved in some cases of encephalitis in immunocompromised patients and in neurological complications of *exanthem subitum*. Several observations may provide explanations on how HHV-6 could trigger or participate in the establishment of neuroinflammation.

**5.1. Molecular Mimicry.** Among the mechanisms proposed for virus-induced autoimmunity, molecular mimicry is one of the most popular ones. Based on the similarity in peptide sequence between viral proteins and self-proteins, it has been postulated that viral infections could activate cross-reactive T cells, able to recognize both viral and self-antigens, which could then trigger an autoimmune response and cause tissue damage. Several studies suggest that such a mechanism could be involved in HHV-6-induced neuroinflammation. A first study reported that 15%–25% of HHV-6-specific T cell clones obtained from healthy donors or MS patients were cross-reactive to myelin basic protein (MBP), one of the autoantigens implicated in MS pathology [99]. In fact, MBP and the U24 protein from HHV-6 were later shown to share an identical amino acid sequence of 7 residues. Moreover, T cells directed against an MBP peptide also recognized an HHV-6 peptide, both peptides containing the identical sequence. Interestingly, cross-reactive cells were more frequent in MS patients than in controls [100]. These data were further confirmed by a more recent study, in which the presence of cross-reactive CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells was found [101]. Altogether, these studies suggest that HHV-6 infection can activate T cell responses which can simultaneously be directed against myelin sheaths, thus strongly supporting the potential role for HHV-6 in autoimmune diseases affecting the CNS (Figure 2(a)).

**5.2. Infection of CNS Cells and Creation of a Proinflammatory Environment.** As mentioned earlier, HHV-6A and HHV-6B are able to infect several CNS cell types, both *in vitro* and *in vivo*, and to trigger proinflammatory responses in a variety of infected cells. In particular, HHV-6A can infect primary astrocytes and induce the expression of several proinflammatory genes, especially when the cells have been pre-treated with proinflammatory cytokines [45]. This suggests that HHV-6A could enhance the proinflammatory response of astrocytes, thus increasing leukocyte infiltration, in patients who already suffer from neuroinflammatory diseases (Figure 2(b)).

Recently, one study on dendritic cells demonstrated that HHV-6B can induce IFN $\lambda$ -1 production via TLR-9 signaling [49]. Moreover, TLR-9 has been shown to be expressed in human astrocytes [102]. It is then likely that HHV-6A can alter astrocyte cytokine expression profile through TLR-9 signaling.

Other pattern recognition receptors, including TLR-2, -3, and -4, are expressed by human glial cells [102, 103] and neurons [104]. As HHV-6A and -6B are present in the brain of a subset of people, they may bind to these receptors upon reactivation and activate innate immune responses, thus promoting inflammation in the CNS.

Another consequence of HHV-6 infection of CNS cells could be the unmasking of autoantigens. HHV-6A was shown to induce cell death in oligodendrocytes and astrocytes either directly [25] or indirectly, via the production of soluble factors by productively infected T cells [17, 105]. Therefore, HHV-6A productive infection of CNS cells or the presence of productively infected lymphocytes in the brain could provoke the death of glial cells and release previously unrecognized self-antigens, thus initiating an autoimmune response directed to the brain.

**5.3. Leukocyte Chemoattraction via Virokine Expression.** The genome of HHV-6 encodes two G protein-coupled receptors, U22 and U51, similar to human chemokine receptors [106, 107] and one single chemokine-like protein, U83. The U83 gene from HHV-6B encodes a functionally active, highly specific agonist of the chemokine receptor CCR-2 [108, 109], which is expressed on monocytes and macrophages. Similarly, the U83 gene from HHV-6A encodes a homologous protein which can bind with high potency to several receptors, including CCR-1, -4, -5, and -8 [110], expressed by a variety of leukocytes. U83 is one of the few genes which are not present in the genome of Human Herpesvirus 7 (HHV-7), the closest homologue of HHV-6A and -6B. Interestingly, this other roseolovirus has not yet been associated with neuroinflammatory diseases.

Therefore, the productive infection of resident cells by both HHV-6A and -6B and the production of the U83 protein in the brain could then promote leukocyte infiltration in the CNS by chemoattraction (Figure 2(b)).

**5.4. Infection of Endothelial Cells and Recruitment of Immune Cells to the CNS.** Several studies have shown that HHV-6A can infect endothelial cells obtained from different

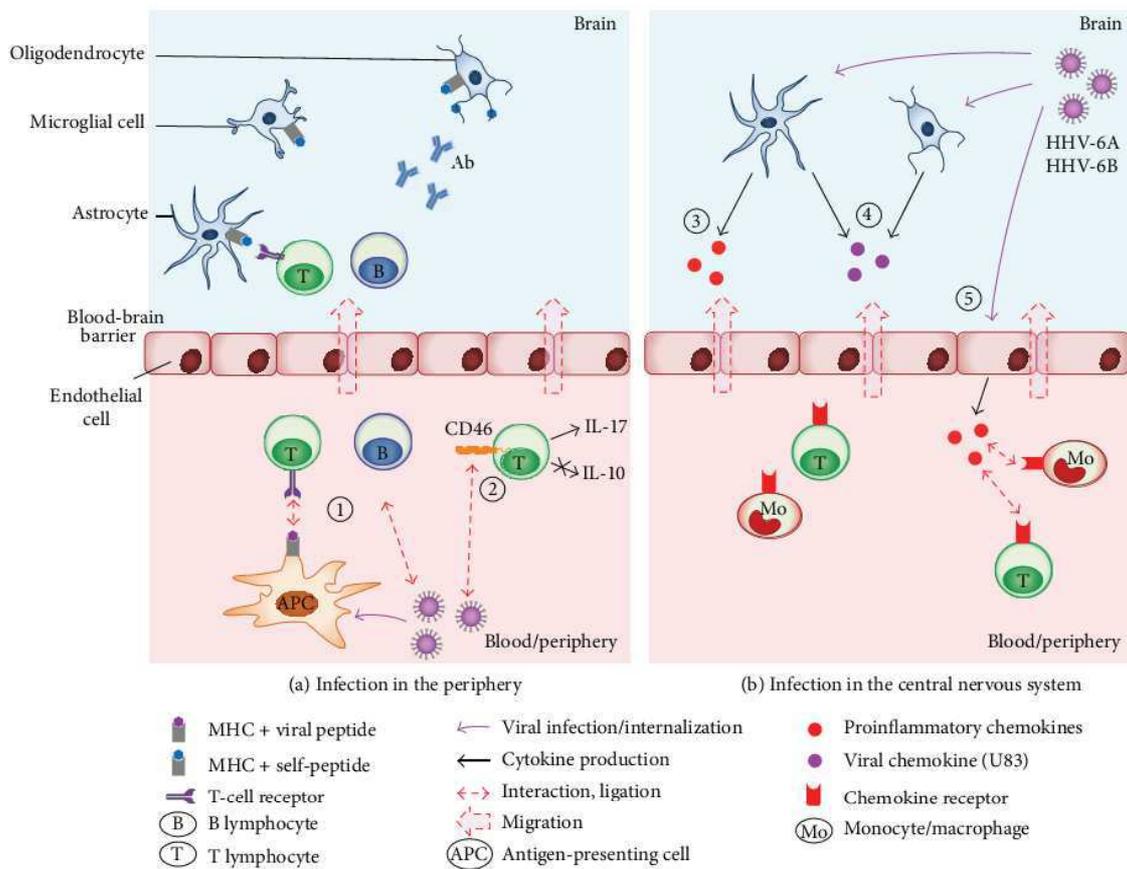


FIGURE 2: Potential mechanisms for HHV-6-induced neuroinflammation. (a) Based on similarities between viral proteins and brain proteins, HHV-6A or -6B infection in the periphery could lead to the activation of cross-reactive T and B cells, able to recognize both viral antigens and brain antigens, and to the development of an autoimmune response directed to the brain (molecular mimicry). This would promote lymphocyte infiltration in the CNS, where they could have cytotoxic activities against resident cells, especially oligodendrocytes which express myelin antigens (1). Peripheral infection could also increase the inflammation by inducing IL-17 and inhibiting IL-10 production by T cells through CD46 binding (2). (b) Infection of astrocytes in the brain can lead to the release of proinflammatory cytokines and chemokines, which promote the infiltration of leukocytes expressing the corresponding chemokine receptor (3). Productive infection of CNS cells can result in the production of the viral chemokine U83, which can also attract leukocytes to the brain (4). Finally, infection of endothelial cells can induce the secretion of chemokines, thus attracting circulating leukocytes and facilitating their transmigration through the blood-brain barrier (5).

organs [53, 111], and that infection induces the production of proinflammatory chemokines, such as CCL-5, CCL-2, and CXCL-8 [52, 53]. HHV-6A might then be able to infect endothelial cells of the brain vessels and, by increasing CCL-5 secretion, could potentially attract leukocytes to the blood-brain barrier. Moreover, a study reported that, in the context of liver transplantation, HHV-6 infection was correlated with overexpression of cell adhesion molecules, such as ICAM-1 and VCAM-1 in the vascular endothelium, and increased number of infiltrating lymphoid cells expressing their ligands, LFA-1 and VLA-4 [112]. Therefore, HHV-6 could potentially induce similar upregulation of cell adhesion proteins expression in CNS endothelial cells, thus increasing the blood-brain barrier permeability and facilitating the transfer of autoreactive lymphocytes in the brain (Figure 2(b)).

**5.5. CD46 Engagement.** The transmembrane protein CD46 is the only known entry receptor for both HHV-6A and -6B entry. This complement regulatory protein also plays an important role in the adaptive immune response as it can modulate T cell responses depending on which cytoplasmic tail is expressed [113] and can induce CD4<sup>+</sup> T cells toward a Tr1 phenotype, with high IL-10 production [114]. One could then hypothesize that HHV-6A and -6B, by binding to their receptor, could modulate its functions. In support to this theory, a clinical study indicated that increase in HHV-6 viral load was correlated to enhanced CD46 expression in MS patients [115], and several alterations in CD46 functions were described; the CD46-induced IL-10 secretion by T cells was strongly decreased [116], whereas the CD46-dependant IL-23 production by DC and IL-17 expression by T cells were

enhanced [117, 118]. This suggests that HHV-6 could participate in neuroinflammation in the context of MS, by promoting inflammatory processes through CD46 binding (Figure 2(a)).

**5.6. Interaction with Other Infectious Agents.** In the field of MS, many different genetic and environmental factors have been proposed as potential etiological agents. Yet, if considered separately, none of these candidates could be directly linked to the onset of the disease. Therefore, efforts are now focusing on combinations of factors, including both exogenous agents, such as living conditions or viral and bacterial infections, and endogenous factors, like genetic predispositions. One good example of these potential combinations is the interaction between herpesvirus infections and human endogenous retroviruses (HERVs) [119]. HERVs, which represent around 8% of the human genome, have been related to MS pathology since fully mature virions were isolated from leptomeningeal cells of an MS patient [120]. These viruses, and especially their envelope proteins, have strong inflammatory properties [121, 122]. HHV-6 infection seems to have direct transactivating properties on HERV, as it is able to increase their reverse transcriptase activity [123] and to stimulate the transcription of envelope genes [124, 125]. HHV-6 infection could then increase neuroinflammation by inducing HERV proteins, thus linking exogenous infections to endogenous factors.

## 6. Conclusion

HHV-6A and HHV-6B both exhibit neuroinvasive and proinflammatory properties. Moreover, both viruses are closely associated with neurological diseases involving inflammatory processes, which strongly supports the hypothesis that they can induce neuroinflammation.

The rare cases of encephalitis following primary HHV-6B infection, in which the virus is the only possible pathogenic cause of disease, provide evidence that HHV-6B has the ability to trigger inflammation in the brain. Whether this is a direct or indirect consequence of viral infection and whether the virus can induce such complications alone or in synergy with other factors remain to be clarified.

However, in other contexts, it is still difficult to bring solid proof of a decisive role for either HHV-6A or HHV-6B in the establishment of neuroinflammatory diseases. As HHV-6A appears to be more neurotropic and was more closely associated with multiple sclerosis, it may have more important implication in neurological diseases in adults. Yet, further investigations are still needed to better understand how these two viruses may participate in neuroinflammatory processes. The development of new tools, such as more complex *in vitro* systems or novel animal models in monkeys and humanized mice, could be of great help for the research in this field.

## Acknowledgments

The work was supported by INSERM and ARSEP, and J. M. Reynaud was supported by a doctoral fellowship from the French ministry of research.

## References

- [1] S. Z. Salahuddin, D. V. Ablashi, P. D. Markham et al., "Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders," *Science*, vol. 234, no. 4776, pp. 596–601, 1986.
- [2] G. Dominguez, T. R. Dambaugh, F. R. Stamey, S. Dewhurst, N. Inoue, and P. E. Pellett, "Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A," *Journal of Virology*, vol. 73, no. 10, pp. 8040–8052, 1999.
- [3] K. N. Ward, "The natural history and laboratory diagnosis of human herpesviruses-6 and -7 infections in the immunocompetent," *Journal of Clinical Virology*, vol. 32, no. 3, pp. 183–193, 2005.
- [4] F. Santoro, P. E. Kennedy, G. Locatelli, M. S. Malnati, E. A. Berger, and P. Lusso, "CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6," *Cell*, vol. 99, no. 7, pp. 817–827, 1999.
- [5] M. Luppi, P. Barozzi, A. Maiorana, R. Marasca, and G. Torelli, "Human herpesvirus 6 infection in normal human brain tissue," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 169, no. 4, pp. 943–944, 1994.
- [6] M. Luppi, P. Barozzi, A. Maiorana et al., "Human herpesvirus-6: a survey of presence and distribution of genomic sequences in normal brain and neuroglial tumors," *Journal of Medical Virology*, vol. 47, no. 1, pp. 105–111, 1995.
- [7] P. B. Challoner, K. T. Smith, J. D. Parker et al., "Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, no. 16, pp. 7440–7444, 1995.
- [8] P. K. Chan, H. K. Ng, M. Hui, M. Ip, J. L. Cheung, and A. F. Cheng, "Presence of human herpesviruses 6, 7, and 8 DNA sequences in normal brain tissue," *Journal of Medical Virology*, vol. 59, no. 4, pp. 491–495, 1999.
- [9] P. K. Chan, H. K. Ng, M. Hui, and A. F. Cheng, "Prevalence and distribution of human herpesvirus 6 variants A and B in adult human brain," *Journal of Medical Virology*, vol. 64, no. 1, pp. 42–46, 2001.
- [10] L. Cuomo, P. Trivedi, M. R. Cardillo et al., "Human herpesvirus 6 infection in neoplastic and normal brain tissue," *Journal of Medical Virology*, vol. 63, no. 1, pp. 45–51, 2001.
- [11] J. Chi, B. Gu, C. Zhang et al., "Human herpesvirus 6 latent infection in patients with glioma," *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 206, no. 9, pp. 1394–1398, 2012.
- [12] M. L. Opsahl and P. G. E. Kennedy, "Early and late HHV-6 gene transcripts in multiple sclerosis lesions and normal appearing white matter," *Brain*, vol. 128, no. part 3, pp. 516–527, 2005.
- [13] C. B. Hall, M. T. Caserta, K. C. Schnabel et al., "Persistence of human herpesvirus 6 according to site and variant: possible greater neurotropism of variant A," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 26, no. 1, pp. 132–137, 1998.
- [14] M. T. Caserta, C. B. Hall, K. Schnabel et al., "Neuroinvasion and persistence of human herpesvirus 6 in children," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 170, no. 6, pp. 1586–1589, 1994.
- [15] E. Harberts, K. Yao, J. E. Wohler et al., "Human herpesvirus-6 entry into the central nervous system through the olfactory pathway," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, no. 33, pp. 13734–13739, 2011.
- [16] L. De Bolle, J. Van Loon, E. De Clercq, and L. Naesens, "Quantitative analysis of human herpesvirus 6 cell tropism," *Journal of Medical Virology*, vol. 75, no. 1, pp. 76–85, 2005.
- [17] J. L. Gardell, P. Dazin, J. Islar, T. Menge, C. P. Genain, and P. H. Lalive, "Apoptotic effects of Human Herpesvirus-6A on glia

- and neurons as potential triggers for central nervous system autoimmunity," *Journal of Clinical Virology*, vol. 37, supplement 1, pp. S11–S16, 2006.
- [18] J. Ahlqvist, J. Fotheringham, N. Akhyani, K. Yao, A. Fogdell-Hahn, and S. Jacobson, "Differential tropism of human herpesvirus 6 (HHV-6) variants and induction of latency by HHV-6A in oligodendrocytes," *Journal of Neuro Virology*, vol. 11, no. 4, pp. 384–394, 2005.
- [19] A. V. Albright, E. Lavi, J. B. Black, S. Goldberg, M. J. O'Connor, and F. González-Scarano, "The effect of human herpesvirus-6 (HHV-6) on cultured human neural cells: oligodendrocytes and microglia," *Journal For Neurovirology*, vol. 4, no. 5, pp. 486–494, 1998.
- [20] J. Dietrich, B. M. Blumberg, M. Roshal et al., "Infection with an endemic human herpesvirus disrupts critical glial precursor cell properties," *Journal of Neuroscience*, vol. 24, no. 20, pp. 4875–4883, 2004.
- [21] D. Donati, N. Akhyani, A. Fogdell-Hahn et al., "Detection of human herpesvirus-6 in mesial temporal lobe epilepsy surgical brain resections," *Neurology*, vol. 61, no. 10, pp. 1405–1411, 2003.
- [22] D. Donati, E. Martinelli, R. Cassiani-Ingoni et al., "Variant-specific tropism of human herpesvirus 6 in human astrocytes," *Journal of Virology*, vol. 79, no. 15, pp. 9439–9448, 2005.
- [23] J. He, M. McCarthy, Y. Zhou, B. Chandran, and C. Wood, "Infection of primary human fetal astrocytes by human herpesvirus 6," *Journal of Virology*, vol. 70, no. 2, pp. 1296–1300, 1996.
- [24] L. De Filippis, C. Foglieni, S. Silva, A. L. Vescovi, P. Lusso, and M. S. Malnati, "Differentiated human neural stem cells: a new ex vivo model to study HHV-6 infection of the central nervous system," *Journal of Clinical Virology*, vol. 37, supplement 1, pp. S27–32, 2006.
- [25] B. Gu, G.-F. Zhang, L. Y. Li et al., "Human herpesvirus 6A induces apoptosis of primary human fetal astrocytes via both caspase-dependent and -independent pathways," *Journal of Virology*, vol. 8, p. 530, 2011.
- [26] W. R. Drobyski, K. K. Knox, D. Majewski, and D. R. Carrigan, "Brief report: fatal encephalitis due to variant B human herpesvirus-6 infection in a bone marrow-transplant recipient," *The New England Journal of Medicine*, vol. 330, no. 19, pp. 1356–1360, 1994.
- [27] B. Øster, B. Bundgaard, and P. Höllsberg, "Human herpesvirus 6B induces cell cycle arrest concomitant with p53 phosphorylation and accumulation in T cells," *Journal of Virology*, vol. 79, no. 3, pp. 1961–1965.
- [28] L. Li, B. Gu, F. Zhou et al., "Human herpesvirus 6 suppresses T cell proliferation through induction of cell cycle arrest in infected cells in the G2/M phase," *Journal of Virology*, vol. 85, no. 13, pp. 6774–6783, 2011.
- [29] L. Flamand, J. Gosselin, I. Stefanescu, D. Ablashi, and J. Menezes, "Immunosuppressive effect of human herpesvirus 6 on T-cell functions: suppression of interleukin-2 synthesis and cell proliferation," *Blood*, vol. 85, no. 5, pp. 1263–1271, 1995.
- [30] Y. Inoue, M. Yasukawa, and S. Fujita, "Induction of T-cell apoptosis by human herpesvirus 6," *Journal of Virology*, vol. 71, no. 5, pp. 3751–3759, 1997.
- [31] M. Yasukawa, Y. Inoue, H. Ohminami, K. Terada, and S. Fujita, "Apoptosis of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in human herpesvirus-6 infection," *Journal of General Virology*, vol. 79, part 1, pp. 143–147, 1998.
- [32] L. Potenza, M. Luppi, P. Barozzi et al., "HHV-6A in syncytial giant-cell hepatitis," *The New England Journal of Medicine*, vol. 359, no. 6, pp. 593–602, 2008.
- [33] R. I. Fox, I. Saito, E. K. Chan et al., "Viral genomes in lymphomas of patients with Sjögren's syndrome," *Journal of Autoimmunity*, vol. 2, no. 4, pp. 449–455, 1989.
- [34] S. Ranger-Rogez, E. Vidal, F. Liozon, and F. Denis, "Primary Sjögren's syndrome and antibodies to human herpesvirus type 6," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 19, pp. 1159–1160, 1994.
- [35] G. R. F. Krueger, C. Sander, A. Hoffmann, A. Barth, B. Koch, and M. Braun, "Isolation of human herpesvirus-6 (HHV-6) from patients with collagen vascular diseases," *In Vivo*, vol. 5, no. 3, pp. 217–225, 1991.
- [36] R. Alvarez-Lafuente, B. Fernández-Gutiérrez, S. de Miguel et al., "Potential relationship between herpes viruses and rheumatoid arthritis: analysis with quantitative real time polymerase chain reaction," *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 64, no. 9, pp. 1357–1359, 2005.
- [37] F. Broccolo, F. Drago, S. Paolino et al., "Reactivation of human herpesvirus 6 (HHV-6) infection in patients with connective tissue diseases," *Journal of Clinical Virology*, vol. 46, no. 1, pp. 43–46, 2009.
- [38] E. Caselli, M. C. Zatelli, R. Rizzo et al., "Virologic and immunologic evidence supporting an association between HHV-6 and Hashimoto's thyroiditis," *PLoS Pathogens*, vol. 8, no. 10, Article ID e1002951, 2012.
- [39] A. Smith, F. Santoro, G. Di Lullo, L. Dagna, A. Verani, and P. Lusso, "Selective suppression of IL-12 production by human herpesvirus 6," *Blood*, vol. 102, no. 8, pp. 2877–2884, 2003.
- [40] A. P. Smith, C. Paolucci, G. Di Lullo, S. E. Burastero, F. Santoro, and P. Lusso, "Viral replication-independent blockade of dendritic cell maturation and interleukin-12 production by human herpesvirus 6," *Journal of Virology*, vol. 79, no. 5, pp. 2807–2813, 2005.
- [41] A. Arena, M. C. Liberto, D. Iannello, A. B. Capozza, and A. Focà, "Altered cytokine production after human herpes virus type 6 infection," *New Microbiologica*, vol. 22, no. 4, pp. 293–300, 1999.
- [42] L. Flamand, J. Gosselin, M. D'Addario et al., "Human herpesvirus 6 induces interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor alpha, but not interleukin-6, in peripheral blood mononuclear cell cultures," *Journal of Virology*, vol. 65, no. 9, pp. 5105–5110, 1991.
- [43] H. Kikuta, A. Nakane, H. Lu, Y. Taguchi, T. Minagawa, and S. Matsumoto, "Interferon induction by human herpesvirus 6 in human mononuclear cells," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 162, no. 1, pp. 35–38, 1990.
- [44] M. Mayne, C. Cheadle, S. S. Soldan et al., "Gene expression profile of herpesvirus-infected T cells obtained using immunomicroarrays: induction of proinflammatory mechanisms," *Journal of Virology*, vol. 75, no. 23, pp. 11641–11650, 2001.
- [45] S. Meeuwse, C. Persoon-Deen, M. Bsibsi et al., "Modulation of the cytokine network in human adult astrocytes by human herpesvirus-6A," *Journal of Neuroimmunology*, vol. 164, no. 1–2, pp. 37–47, 2005.
- [46] L. Flamand, I. Stefanescu, and J. Menezes, "Human herpesvirus-6 enhances natural killer cell cytotoxicity via IL-15," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 97, no. 6, pp. 1373–1381, 1996.
- [47] A. Arena, M. C. Liberto, A. B. Capozza, and A. Focà, "Productive HHV-6 infection in differentiated U937 cells: role of TNF $\alpha$  in regulation of HHV-6," *New Microbiologica*, vol. 20, no. 1, pp. 13–20, 1997.
- [48] A. Arena, R. A. Merendino, L. Bonina, D. Iannello, G. Stassi, and P. Mastroeni, "Role of IL-15 on monocytic resistance to human herpesvirus 6 infection," *New Microbiologica*, vol. 23, no. 2, pp. 105–112, 2000.

- [49] I. Nordström and K. Eriksson, "HHV-6B induces IFN-lambda responses in cord plasmacytoid dendritic cells through TLR9," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 6, Article ID e38683, 2012.
- [50] J. C. Grivel, Y. Ito, G. Fagà et al., "Suppression of CCR5- but not CXCR4-tropic HIV-1 in lymphoid tissue by human herpesvirus 6," *Nature Medicine*, vol. 7, no. 11, pp. 1232–1235, 2001.
- [51] J.-C. Grivel, F. Santoro, S. Chen et al., "Pathogenic effects of human herpesvirus 6 in human lymphoid tissue ex vivo," *Journal of Virology*, vol. 77, no. 15, pp. 8280–8289, 2003.
- [52] A. Caruso, F. Favilli, A. Rotola et al., "Human herpesvirus-6 modulates RANTES production in primary human endothelial cell cultures," *Journal of Medical Virology*, vol. 70, no. 3, pp. 451–458, 2003.
- [53] A. Caruso, A. Rotola, M. Comar et al., "HHV-6 infects human aortic and heart microvascular endothelial cells, increasing their ability to secrete proinflammatory chemokines," *Journal of Medical Virology*, vol. 67, no. 4, pp. 528–533, 2002.
- [54] R. Inagi, R. Guntapong, M. Nakao et al., "Human herpesvirus 6 induces IL-8 gene expression in human hepatoma cell line, Hep G2," *Journal of Medical Virology*, vol. 49, no. 1, pp. 34–40, 1996.
- [55] D. K. Braun, G. Dominguez, and P. E. Pellett, "Human herpesvirus 6," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 10, no. 3, pp. 521–567, 1997.
- [56] K. Yao, J. R. Crawford, A. L. Komaroff, D. V. Ablashi, and S. Jacobson, "Review part 2: human herpesvirus-6 in central nervous system diseases," *Journal of Medical Virology*, vol. 82, no. 10, pp. 1669–1678, 2010.
- [57] H. Agut, "Deciphering the clinical impact of acute human herpesvirus 6 (HHV-6) infections," *Journal of Clinical Virology*, vol. 52, no. 3, pp. 164–171, 2011.
- [58] D. M. Zerr, "Human herpesvirus 6 and central nervous system disease in hematopoietic cell transplantation," *Journal of Clinical Virology*, vol. 37, supplement 1, pp. S52–S56, 2006.
- [59] K. Yamanishi, T. Okuno, K. Shiraki et al., "Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum," *The Lancet*, vol. 1, no. 8594, pp. 1065–1067, 1988.
- [60] Y. Asano, T. Yoshikawa, S. Suga et al., "Clinical features of infants with primary human herpesvirus 6 infection (exanthem subitum, roseola infantum)," *Pediatrics*, vol. 93, no. 1, pp. 104–108, 1994.
- [61] C. B. Hall, C. E. Long, K. C. Schnabel et al., "Human herpesvirus-6 infection in children—a prospective study of complications and reactivation," *The New England Journal of Medicine*, vol. 331, no. 7, pp. 432–438, 1994.
- [62] S. R. Barone, M. H. Kaplan, and L. R. Krilov, "Human herpesvirus-6 infection in children with first febrile seizures," *Journal of Pediatrics*, vol. 127, no. 1, pp. 95–97, 1995.
- [63] Y. Asano, T. Yoshikawa, Y. Kajita et al., "Fatal encephalitis/encephalopathy in primary human herpesvirus-6 infection," *Archives of Disease in Childhood*, vol. 67, no. 12, pp. 1484–1485, 1992.
- [64] T. Olli-Lähdesmäki, L. Haataja, R. Parkkola, M. Waris, N. Bleyzac, and O. Ruuskanen, "High-dose ganciclovir in HHV-6 encephalitis of an immunocompetent child," *Pediatric Neurology*, vol. 43, no. 1, pp. 53–56, 2010.
- [65] K. Yanagihara, K. Tanaka-Taya, Y. Itagaki et al., "Human herpesvirus 6 meningoencephalitis with sequelae," *Pediatric Infectious Disease Journal*, vol. 14, no. 3, pp. 240–242, 1995.
- [66] K. B. Howell, K. Tiedemann, G. Haeusler et al., "Symptomatic generalized epilepsy after HHV6 posttransplant acute limbic encephalitis in children," *Epilepsia*, vol. 53, no. 7, pp. e122–e126, 2012.
- [67] T. Yoshikawa, M. Ohashi, F. Miyake et al., "Exanthem subitum-associated encephalitis: nationwide survey in Japan," *Pediatric Neurology*, vol. 41, no. 5, pp. 353–358, 2009.
- [68] H. Matsumoto, D. Hatanaka, Y. Ogura, A. Chida, Y. Nakamura, and S. Nonoyama, "Severe human herpesvirus 6-associated encephalopathy in three children: analysis of cytokine profiles and the carnitine palmitoyltransferase 2 gene," *The Pediatric Infectious Disease Journal*, vol. 30, no. 11, pp. 999–1001, 2011.
- [69] M. Patnaik and J. B. Peter, "Intrathecal synthesis of antibodies to human herpesvirus 6 early antigen in patients with meningitis/encephalitis," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 21, no. 3, pp. 715–716, 1995.
- [70] T. Birnbaum, C. S. Padovan, B. Sporer et al., "Severe meningoencephalitis caused by human herpesvirus 6 type B in an immunocompetent woman treated with ganciclovir," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 40, no. 6, pp. 887–889, 2005.
- [71] E. Isaacson, C. A. Glaser, B. Forghani et al., "Evidence of human herpesvirus 6 infection in 4 immunocompetent patients with encephalitis," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 40, no. 6, pp. 890–893, 2005.
- [72] J. A. McCullers, F. D. Lakeman, and R. J. Whitley, "Human herpesvirus 6 is associated with focal encephalitis," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 21, no. 3, pp. 571–576, 1995.
- [73] K. Yao, S. Honarmand, A. Espinosa, N. Akhyani, C. Glaser, and S. Jacobson, "Detection of human herpesvirus-6 in cerebrospinal fluid of patients with encephalitis," *Annals of Neurology*, vol. 65, no. 3, pp. 257–267, 2009.
- [74] N. P. Tavakoli, S. Nattanmai, R. Hull et al., "Detection and typing of human herpesvirus 6 by molecular methods in specimens from patients diagnosed with encephalitis or meningitis," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 45, no. 12, pp. 3972–3978, 2007.
- [75] T. Yoshikawa, Y. Asano, M. Ihira et al., "Human herpesvirus 6 viremia in bone marrow transplant recipients: clinical features and risk factors," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 185, no. 7, pp. 847–853, 2002.
- [76] M. Ogata, "Human herpesvirus 6 in hematological malignancies," *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology*, vol. 49, no. 2, pp. 57–67, 2009.
- [77] J. Fotheringham, N. Akhyani, A. Vortmeyer et al., "Detection of active human herpesvirus-6 infection in the brain: correlation with polymerase chain reaction detection in cerebrospinal fluid," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 195, no. 3, pp. 450–454, 2007.
- [78] F. Forest, S. Duband, S. Pillet et al., "Lethal human herpesvirus-6 encephalitis after cord blood transplant," *Transplant Infectious Disease*, vol. 13, no. 6, pp. 646–649, 2011.
- [79] P. Ljungman, F. Z. Wang, D. A. Clark 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," *British Journal of Haematology*, vol. 111, no. 3, pp. 774–781, 2000.
- [80] D. M. Zerr, T. A. Gooley, L. Yeung et al., "Human herpesvirus 6 reactivation and encephalitis in allogeneic bone marrow transplant recipients," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 33, no. 6, pp. 763–771, 2001.
- [81] M. Ogata, H. Kikuchi, T. Satou et al., "Human herpesvirus 6 DNA in plasma after allogeneic stem cell transplantation: incidence and clinical significance," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 193, no. 1, pp. 68–79, 2006.
- [82] F. Wilborn, C. A. Schmidt, V. Brinkmann, K. Jendroska, H. Oettle, and W. Siegert, "A potential role for human herpesvirus

- and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype," *Nature*, vol. 421, no. 6921, pp. 388–392, 2003.
- [115] R. Alvarez-Lafuente, M. Garcia-Montojo, V. De Las Heras, M. I. Dominguez-Mozo, M. Bartolome, and R. Arroyo, "CD46 expression and HHV-6 infection in patients with multiple sclerosis," *Acta Neurologica Scandinavica*, vol. 120, no. 4, pp. 246–250, 2009.
- [116] A. L. Astier, G. Meiffren, S. Freeman, and D. A. Hafler, "Alterations in CD46-mediated Tr1 regulatory T cells in patients with multiple sclerosis," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 116, no. 12, pp. 3252–3257, 2006.
- [117] A. Vaknin-Dembinsky, G. Murugaiyan, D. A. Hafler, A. L. Astier, and H. L. Weiner, "Increased IL-23 secretion and altered chemokine production by dendritic cells upon CD46 activation in patients with multiple sclerosis," *Journal of Neuroimmunology*, vol. 195, no. 1-2, pp. 140–145, 2008.
- [118] K. Yao, J. Graham, Y. Akahata, U. Oh, and S. Jacobson, "Mechanism of neuroinflammation: enhanced cytotoxicity and IL-17 production via CD46 binding," *Journal of Hepatology*, vol. 5, no. 3, pp. 469–478, 2010.
- [119] H. Perron, C. Bernard, J. B. Bertrand et al., "Endogenous retroviral genes, herpesviruses and gender in multiple sclerosis," *Journal of the Neurological Sciences*, vol. 286, no. 1-2, pp. 65–72, 2009.
- [120] H. Perron, J. A. Garson, F. Bedin et al., "Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 14, pp. 7583–7588, 1997.
- [121] J. M. Antony, G. Van Marle, W. Opii et al., "Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination," *Nature Neuroscience*, vol. 7, no. 10, pp. 1088–1095, 2004.
- [122] A. Rolland, E. Jouvin-Marche, C. Viret, M. Faure, H. Perron, and P. N. Marche, "The envelope protein of a human endogenous retrovirus-W family activates innate immunity through CD14/TLR4 and promotes Th1-like responses," *Journal of Immunology*, vol. 176, no. 12, pp. 7636–7644, 2006.
- [123] T. Brudek, P. Lühdorf, T. Christensen, H. J. Hansen, and A. Møller-Larsen, "Activation of endogenous retrovirus reverse transcriptase in multiple sclerosis patient lymphocytes by inactivated HSV-1, HHV-6 and VZV," *Journal of Neuroimmunology*, vol. 187, no. 1-2, pp. 147–155, 2007.
- [124] A. K. Tai, J. Luka, D. Ablashi, and B. T. Huber, "HHV-6A infection induces expression of HERV-K18-encoded superantigen," *Journal of Clinical Virology*, vol. 46, no. 1, pp. 47–48, 2009.
- [125] V. L. Turcanova, B. Bundgaard, and P. Höllsberg, "Human herpesvirus-6B induces expression of the human endogenous retrovirus K18-encoded superantigen," *Journal of Clinical Virology*, vol. 46, no. 1, pp. 15–19, 2009.
- [126] C. Li, J. M. Goodrich, and X. Yang, "Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) regulates production of IL-10 and IL-12 in human herpesvirus-6 (HHV-6)-infected monocyte/macrophage lineage," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 109, no. 3, pp. 421–425, 1997.
- [127] T. Yoshikawa, Y. Asano, S. Akimoto et al., "Latent infection of human herpesvirus 6 in astrocytoma cell line and alteration of cytokine synthesis," *Journal of Medical Virology*, vol. 66, no. 4, pp. 497–505, 2002.

## **ARTICLE 4 (Revue)**

### **Animal models for human herpesvirus 6 infection**

Joséphine M. Reynaud and Branka Horvat

International Center for Infectiology Research (CIRI), INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS Lyon,  
University of Lyon 1, Lyon, France.

Manuscrit en préparation



## Abstract

Human herpesvirus (HHV)-6A and HHV-6B are two enveloped DNA viruses of  $\beta$ -herpesvirus family, infecting over 90% of the population and associated with several diseases, including *exanthema subitum* (for HHV-6B), multiple sclerosis and encephalitis, particularly in immunosuppressed patients. Animal models are highly important to better understand the pathogenesis of viral infections. Naturally developed neutralizing antibodies to HHV-6 or a related virus were found in different species of monkeys, suggesting their susceptibility to HHV-6 infection. Both HHV-6 DNA and infectious virus were detected in experimentally infected Cynomolgus and African green monkeys, although most animals remained clinically asymptomatic. Furthermore, HHV-6A infection was shown to accelerate the progression of AIDS in macaques and to lead to the development of neurological symptoms in the marmoset model. Humanized SCID mice efficiently replicated HHV-6 and were also susceptible to coinfection with HHV-6 and HIV-1. As CD46 was identified as a receptor for HHV-6, transgenic mice expressing human CD46 may present potentially interesting model for study certain aspects of HHV-6 infection and neuroinflammation.

## 1. Introduction

Human herpesvirus (HHV)-6 belongs to the Betaherpesvirinae subfamily, together with its closest homologue HHV-7 and human cytomegalovirus (HCMV). The two variants of HHV-6, HHV-6A and HHV-6B, have recently been recognized as two distinct viruses by the international committee on taxonomy of viruses, based mostly on their known genetic and epidemiological features (Braun et al., 1997). Primary infection with HHV-6B was identified as the etiological cause for roseola (*exanthema subitum*), a common febrile illness in infants (Yamanishi et al., 1988), whereas primary infection with HHV-6A was not yet clearly associated to any specific disease. Like most herpesviruses, HHV-6A and -6B are able to establish asymptomatic long-term persistence in their hosts, and can reactivate under specific conditions. Although the mechanisms of reactivation are not yet completely understood, both viruses are known to reactivate in immunosuppressed patients, causing a variety of complications such as encephalitis, hepatitis or graft rejection (Dockrell and Paya, 2001; Zerr, 2006). In addition, HHV-6A and -6B have been associated to several neurological diseases in the immunocompetent population. Indeed, numerous clinical studies have established a correlation between HHV-6A and -6B infection and the demyelinating autoimmune disease multiple sclerosis (reviewed in Reynaud and Horvat, 2013), and both viruses are thought to be involved in the development of certain cases of encephalitis, meningitis and epilepsy (Theodore et al., 2008; Yao et al., 2010b).

HHV-6 has often been isolated from patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and was suggested to play a role in the progression of this disease. Indeed, an active and wide-spread HHV-6 infection was observed in AIDS patients (Knox and Carrigan, 1994; Secchiero et al., 1995) and AIDS was described to progress rapidly after primary HHV-6 infection in children with vertically-inherited HIV (Kositanont et al., 1999). Both HHV-6 and HIV have a preferential tropism toward CD4<sup>+</sup> T cells and can establish simultaneous productive infection with synergic cytopathic effects (Lusso et al., 1989). Moreover, HHV-6 has a wider range of susceptible cell types than HIV-1 and was shown to induce the expression of the HIV-1 receptor CD4 on immune cells which do not naturally express this molecule, rendering them, thus, susceptible to HIV-1 infection (Lusso et al., 1993, 1995).

However, in the context of both AIDS and different other HHV-6-related pathologies, the consequences of coinfection and the potential mechanisms involved in the pathogenesis remain to be elucidated.

Animal models represent very useful tools for the study of viral pathogenesis, and for preclinical analyses of potential antiviral drugs. Here, we review the different animal models developed for the study of HHV-6A and/or HHV-6B infection (table 1) and discuss the data obtained. In particular, the use of animal models brought new evidence of HHV-6A capacity to induce neuropathology and allowed the study of the interactions between HHV-6 and immunodeficiency viruses, showing a role of HHV-6A in AIDS progression and providing potential explanations for the impact of HHV-6A on the course of HIV infection.

## 2. Simian models

### 2.1. Natural infection in monkeys

Shortly after the discovery of HHV-6, several groups have searched for evidence of natural infection by HHV-6 in monkeys. Initial studies first reported an absence of specific antibodies in several species of new- and old-world nonhuman primates (Lusso et al., 1990; Salahuddin et al., 1986). In contrast, another study carried out on ten different species of monkeys revealed the presence of HHV-6-reactive antibodies, suggesting a previous infection either by HHV-6 or a closely related virus (Higashi et al., 1989). Among the tested species, eight were positive in immunofluorescence assay and seroneutralization. African green monkeys, squirrel monkeys, chimpanzees and orang-utans appeared to be the most frequently infected, with 75 to 100% of prevalence. Furthermore, several groups of monkeys of the same species but from different locations exhibited similar prevalence rates, thus suggesting that the susceptibility to HHV-6 infection may be species-dependent.

More recently, a simian homologue of HHV-6 was isolated from blood samples from chimpanzees (*Pan troglodytes*) (Lacoste et al., 2005). This new member of the  $\beta$ -herpesvirus group, called PanHV6, was found to be particularly close to the Z29 strain of HHV-6B. It was detected in several different subspecies of wild-caught chimpanzees from Cameroon and Gabon, but also in animals born in captivity in the Netherlands, indicating that this virus is present in different populations of chimpanzees. Several simian homologues of other human herpesviruses, including HCMV and Epstein-Barr virus (EBV) (Davison et al., 2003; Ehlers et al., 2003) have been identified, which supports the theory that these viruses might have co-evolved with their host species. The natural susceptibility of some species of monkeys to infection with HHV-6 or a simian counterpart indicates that monkeys may represent an appropriate model for the study of HHV-6A and/or -6B pathogenesis.

### 2.2. Experimental infection in simian models

#### 2.2.1. Infection of simian cells

Analyzes performed on *in vitro*-infected peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from several species of monkeys, indicated that cells from chimpanzees and macaques (*Macaca nemestrina* and *M. mulata*) are the most susceptible to infection by HHV-6 (Lusso et al., 1990, 1994). The infection of PBMCs led to the production of viral proteins and viral particles, observed by immunofluorescence and electron microscopy. The infection seemed highly variable among the species of monkeys tested and depended on the virus used (A or B). PBMCs from rhesus macaques (*M. mulata*) were found to be susceptible to HHV-6B infection only, while PBMCs from pig-tailed macaques (*M. nemestrina*) were infected with similar efficiency by both HHV-6A and -6B.

#### 2.2.2. African green monkeys and cynomolgus macaques

The first experiments of *in vivo* HHV-6 infection in monkeys were conducted using African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*) and cynomolgus macaques (*M. fascicularis*) (Yalcin et al., 1992). Four animals from each species were inoculated with the HST strain of HHV-6B. Monkeys

received a single subcutaneous (s.c.) or intravenous (i.v.) injection of  $10^5$  half maximal tissue culture infective doses (TCID<sub>50</sub>), and were monitored for 33 days. Following virus inoculation, a specific antibody response was detected, as well as the presence of viral DNA in the PBMCs and in the spleen and lymph nodes of some animals. However, the infection remained asymptomatic in all animals, except for one African green monkey, which developed a skin rash on the trunk (table 1).

### 2.2.3. Pig-tailed macaques

Infection with HHV-6A was later described in pig-tailed macaques (*M. nemestrina*) (Lusso et al., 2007). After i.v. inoculation with HHV-6A (GS strain), clinical symptoms of mild to moderate intensity were observed, including fever, nasal discharge, splenomegaly, generalized lymphadenopathy and abdominal rash (in one animal). Moreover, in this model, systemic infection was confirmed by the detection of viral DNA in the plasma, the development of an antibody response, and the presence of viral transcripts in the lymph nodes.

Furthermore, this model has been used to analyze the coinfection with HHV-6A and simian immunodeficiency virus (SIV), a simian counterpart of HIV-1 typically used for experimental infection in macaques (Lusso et al., 2007). This approach provided first *in vivo* data showing that HHV-6A infection can accelerate AIDS progression. Indeed, although HHV-6A infection did not seem to have any effect on SIV spreading, dually-infected animals exhibited faster depletion in CD4<sup>+</sup> T cells than the singly SIV-infected ones. Interestingly, HHV-6A infection also resulted in faster decrease in CD8<sup>+</sup> T cell count, which could be due to HHV-6A-induced *de novo* expression of CD4 in these cells.

A potential mechanism explaining the enhancement of AIDS by HHV-6A was suggested following the analysis of the virus isolated from monkeys receiving either single SIV infection or HHV-6A/SIV coinfection (Biancotto et al., 2009). The *in vitro* replication of viral isolates obtained from singly infected monkeys was inhibited by coinfection with HHV-6A, and treatment with the chemokine CCL5 (regulated upon activation normal T cell expressed and secreted, RANTES) had similar effects. In contrast, all isolates from dually infected monkeys appeared to be resistant to both CCL5 treatment and HHV-6A infection, suggesting that *in vivo* co-infection with HHV-6A probably directs SIV evolution toward CCL5 resistance. Thus HHV-6A infection could create a high-CCL5 environment *in vivo*, in which CCL5-resistance would be advantageous for efficient SIV replication.

### 2.2.4. The marmoset model: evidence for HHV-6A-induced neurological disease

A recent study described a new model of infection by both HHV-6A and -6B using common marmosets (*Callithrix jacchus*), which represents so far the only model of HHV-6A infection associated with more important clinical signs (Leibovitch et al., 2013). Indeed, HHV-6A-infected monkeys which received several i.v. injections monthly developed clear neurological symptoms, including motor weakness and sensory abnormalities. Moreover, magnetic resonance imaging (MRI) analyzes revealed the presence of hyperintense lesions in the brain of one animal. This study provided first *in vivo* evidence that HHV-6A infection is able to trigger neurological disease. In humans, both HHV-6A and -6B DNA was shown to be present in the brain of healthy people, indicating that both species have similar neuroinvasive properties. In marmosets, viral DNA was also detected in the brain of HHV-6A- and -6B-infected animals, which confirmed the capacity of both viruses to reach the brain. However, while HHV-6A infection led to evident neurological symptoms, infection with HHV-6B remained asymptomatic, thus showing an important difference between HHV-6A and -6B in their ability to infect marmosets (table 1).

Interestingly, an additional group of marmosets was infected with HHV-6A through the intranasal (i.n.) route of inoculation, which resulted in radically different clinical outcome. Based on histological data, the i.n. pathway was proposed as a possible route of transmission and access to the brain for HHV-6A in humans (Harberts et al., 2011). Contrary to i.v.-injected marmosets, i.n.-injected animals did not exhibit any sign of disease. Moreover, i.n.-inoculated animals rarely developed antibody response and maintained plasma viremia, whereas i.v. injection led to the development of HHV-6-specific antibody responses and clearance of viral DNA in the plasma. These results suggested that the neurological symptoms observed with i.v. injection might be due to the immune response developed against the virus rather than to direct consequences of viral infection and spreading. This model therefore emphasizes the importance of the route of inoculation in viral pathogenesis, and provides a clear *in vivo* demonstration that HHV-6A can cause a neurological disease with MS-like symptoms. The marmoset model thus appears as an appropriate model for the analysis of HHV-6A-induced neurological disease, and confirms the correlation between HHV-6 infection and the development of multiple sclerosis.

### 3. Murine models

The possibility to use murine model to study HHV-6 infection has been attracting the scientific community since the discovery of HHV-6. However, mice were initially described to be resistant to HHV-6 infection (Lusso, 1996). Nevertheless, a few studies have described the use of *in vitro* or *in vivo* murine models for the study of HHV-6.

#### 3.1. Susceptibility of murine cells to HHV-6 infection

The susceptibility to infection by HHV-6A and HHV-6B of several human and non-human cell lines was analyzed in a few studies. Both viruses failed to replicate in the murine mammary carcinoma cell line FM3A and viral transcripts were not detected in these cells, suggesting that murine cells are not permissive to infection by HHV-6 (De Bolle et al., 2005b). However, another study showed that infection by HHV-6A and HHV-6B enables the transcription of viral genes in murine primary oligodendrocyte precursors, although viral replication was not observed (Mock et al., 2006), which suggested that the susceptibility to HHV-6 infection may, to some extent, depend on the analyzed cell type. In addition, both HHV-6A and HHV-6B could induce cell cycle arrest in these cells, similarly to what was previously observed in human oligodendrocyte precursor cells (Dietrich et al., 2004), indicating that some murine cell type could be used as a model to study certain aspects of HHV-6 infection *in vitro*.

#### 3.2. In vivo murine models for the study of HHV-6 infection

It has been reported that natural resistance of mice to herpesvirus infection, particularly against herpes simplex virus (HSV) is genetically determined and linked to MHC genes (Lopez, 1975). Balb/c mice were among the most susceptible lines and were recently used to analyze the link between HHV-6B infection and allergy (Svensson et al., 2010). Although systemic infection was not observed, inoculation of UV-inactivated virus resulted in the development of specific IgG responses and had protective effects against the development of allergy by limiting the inflammation in lungs, thus suggesting the immunosuppressive effects of HHV-6B *in vivo*.

To overcome natural resistance of mice to HHV-6 infection another approach using immunodeficient mice was developed, aiming to provide an *in vivo* environment for the study of human tissue rather than to analyze the infection in mice. For this purpose, severe combined immunodeficiency (SCID) mice were used. These mice carry a mutation which provokes profound T and B lymphopenia, allowing the engraftment of heterologous tissues (McCune, 1996). SCID mice were humanized by coimplanting human fetal thymus and liver under the murine kidney capsule,

permitting the growth of a unique thy/liv organ which histologically resembles human thymus. Mice carrying thy/liv organ support human lymphopoiesis, thus allowing the study of human lymphoid cells in an *in vivo* context, and were used for the study of other human viruses, especially for human immunodeficiency virus (HIV) (Van Duyne et al., 2009). Inoculation with HHV-6A or -6B was performed by direct injection in the implant and led to productive infection of human thymic cells by both viruses, associated to strong thymic depletion (Gobbi et al., 1999). That study demonstrated that HHV-6 infection is able to induce immunosuppression in an *in vivo* context, which may explain how HHV-6 could enhance the progression of immunodeficiency in AIDS patients. In that model, HHV-6 seemed to exhibit a particular tropism toward intra-thymic T progenitor cells (ITTPs), a rapidly dividing subset of thymic cells which gives rise to other thymocytes at later stages of maturation. This study suggested that lytic infection of ITTPs may play an important role in the HHV-6-induced thymic depletion.

Coinfection with HHV-6A or -6B and HIV-1 was next performed using the same model (Gobbi et al., 2000). Both viruses were found to be able to simultaneously infect the engrafted human tissue, yet infection with one virus did not seem to have any impact on the replication or virulence of the other.

### 3.3. Towards novel transgenic murine models

Other models of humanized mice are currently under investigation. A model of  $\text{rag2}^{-/-} \gamma\text{c}^{-/-}$  mice, deficient for T and B lymphocytes and NK cells and engrafted with human hematopoietic stem cells (Chicha et al., 2005) is being developed for the analysis of HHV-6 (Tanner et al., 8<sup>th</sup> International Conference on HHV-6&7, April 2013). The use of this model allowed numerous advances in the field of retrovirology (Van Duyne et al., 2009) and will certainly help in the understanding of HHV-6 immunopathogenesis.

HHV-6 was shown to use the human protein CD46 as a cellular receptor for viral entry (Santoro et al., 1999). This transmembrane protein is involved in the protection of host cells against complement lysis (Liszewski et al., 1991), through binding to C3b and C4b components of the complement (Figure 1), and was identified as the receptor for a variety of pathogens, including measles virus (vaccine strains), several serotypes of adenovirus and some pathogenic bacteria (Riley-Vargas et al., 2004). Moreover, it was recently found to bind the immunoregulatory molecule Jagged 1, a member of the Notch system (Le Friec et al., 2012) (Figure 1). CD46 is ubiquitously expressed in humans and is mostly conserved in other primates (Seya et al., 1998). As viral tropism is determined by the pattern of expression of virus-specific cellular receptors, these molecules are key players in viral infection. Contrary to most primate CD46 proteins, murine CD46 has a lower percentage of identity with the human protein and its expression is restricted to the testis, which may account for the resistance of mice to the infection. Therefore the generation of transgenic mice expressing the human CD46 with a ubiquitous distribution, as in humans, could provide new perspectives for the development of animal models for HHV-6 infection. We have produced several lines of CD46 transgenic mice (Horvat et al., 1996; Marie et al., 2002) and used them to analyze the pathogenesis of HHV-6 infection. HHV-6A seemed to establish long-term persistence in the brain of those mice, and to induce leukocyte infiltration (Reynaud et al., 8<sup>th</sup> International Conference on HHV-6&7, April 2013). Thus, CD46 transgenic mice may represent a potential new small animal model for the study of HHV-6A-induced neuroinflammation. Some studies have suggested that CD46 may not be the only receptor for HHV-6B entry (Mori et al., 2002, 2004), opening thus, perspectives for the development of additional transgenic models for this virus. The availability of many experimental tools for murine model should facilitate further studies of virus-host interaction and HHV-6 pathogenesis.

#### 4. Conclusions

The development of relevant animal models is critical for a better understanding of viral pathogenesis, generating new diagnostic tools and assessing anti-viral therapeutics and vaccines. Although animal models usually do not mimic all the aspects of the human disease, they do reproduce at least some of them and could thus help in better understanding of certain aspects of viral pathogenesis. The number of animal models to study HHV-6 infection is still rather limited and mainly includes nonhuman primates. Utilization of pig-tailed macaques provided evidence for the HHV-6-induced acceleration of AIDS and recently HHV-6A infection in marmosets has strongly suggested a link with neurological diseases. The latent nature of HHV-6 infection makes most of *in vivo* studies often difficult to carry out. Recent advances in the development of murine models for HHV-6 infection, with numerous and powerful tools available, should be of critical help for in-depth immunobiological and genetic studies of HHV-6 infection.

#### 5. Acknowledgements

This work was supported by INSERM and ARSEP and JR was supported by a doctoral fellowship from the French ministry of research.

#### 6. References

- Biancotto, A., Grivel, J.-C., Lisco, A., Vanpouille, C., Markham, P. D., Gallo, R. C., Margolis, L. B., and Lusso, P. (2009). Evolution of SIV toward RANTES resistance in macaques rapidly progressing to AIDS upon coinfection with HHV-6A. *Retrovirology* 6, 61.
- De Bolle, L., Van Loon, J., De Clercq, E., and Naesens, L. (2005). Quantitative analysis of human herpesvirus 6 cell tropism. *J. Med. Virol.* 75, 76–85.
- Braun, D. K., Dominguez, G., and Pellett, P. E. (1997). Human herpesvirus 6. *Clin. Microbiol. Rev.* 10, 521–567.
- Chicha, L., Tussiwand, R., Traggiai, E., Mazzucchelli, L., Bronz, L., Piffaretti, J.-C., Lanzavecchia, A., and Manz, M. G. (2005). Human adaptive immune system Rag2<sup>-/-</sup>-gamma(c)<sup>-/-</sup> mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1044, 236–243.
- Davison, A. J., Dolan, A., Akter, P., Addison, C., Dargan, D. J., Alcendor, D. J., McGeoch, D. J., and Hayward, G. S. (2003). The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J. Gen. Virol.* 84, 17–28.
- Dietrich, J., Blumberg, B. M., Roshal, M., Baker, J. V., Hurley, S. D., Mayer-Pröschel, M., and Mock, D. J. (2004). Infection with an endemic human herpesvirus disrupts critical glial precursor cell properties. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 4875–4883.
- Dockrell, D. H., and Paya, C. V. (2001). Human herpesvirus-6 and -7 in transplantation. *Rev. Med. Virol.* 11, 23–36.
- Van Duyne, R., Pedati, C., Guendel, I., Carpio, L., Kehn-Hall, K., Saifuddin, M., and Kashanchi, F. (2009). The utilization of humanized mouse models for the study of human retroviral infections. *Retrovirology* 6, 76.
- Ehlers, B., Ochs, A., Leendertz, F., Goltz, M., Boesch, C., and Mätz-Rensing, K. (2003). Novel simian homologues of Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 77, 10695–10699.
- Le Fric, G., Sheppard, D., Whiteman, P., Karsten, C. M., Shamoun, S. A.-T., Laing, A., Bugeon, L., Dallman, M. J., Melchionna, T., Chillakuri, C., et al. (2012). The CD46-Jagged1 interaction is critical for human TH1 immunity. *Nat. Immunol.* 13, 1213–1221.

- Gobbi, A., Stoddart, C. A., Locatelli, G., Santoro, F., Bare, C., Linnquist-Stepps, V., Moreno, M. E., Abbey, N. W., Herndier, B. G., Malnati, M. S., et al. (2000). Coinfection of SCID-hu Thy/Liv mice with human herpesvirus 6 and human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 74, 8726–8731.
- Gobbi, A., Stoddart, C. A., Malnati, M. S., Locatelli, G., Santoro, F., Abbey, N. W., Bare, C., Linnquist-Stepps, V., Moreno, M. B., Herndier, B. G., et al. (1999). Human herpesvirus 6 (HHV-6) causes severe thymocyte depletion in SCID-hu Thy/Liv mice. *J. Exp. Med.* 189, 1953–1960.
- Harberts, E., Yao, K., Wohler, J. E., Maric, D., Ohayon, J., Henkin, R., and Jacobson, S. (2011). Human herpesvirus-6 entry into the central nervous system through the olfactory pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 13734–13739.
- Higashi, K., Asada, H., Kurata, T., Ishikawa, K., Hayami, M., Spriatna, Y., Sutarman, and Yamanishi, K. (1989). Presence of antibody to human herpesvirus 6 in monkeys. *J. Gen. Virol.* 70 (Pt 12), 3171–3176.
- Horvat, B., Rivaller, P., Varior-Krishnan, G., Cardoso, A., Gerlier, D., and Roubourdin-Combe, C. (1996). Transgenic mice expressing human measles virus (MV) receptor CD46 provide cells exhibiting different permissivities to MV infections. *J. Virol.* 70, 6673–6681.
- Knox, K. K., and Carrigan, D. R. (1994). Disseminated active HHV-6 infections in patients with AIDS. *Lancet* 343, 577–578.
- Kositanont, U., Wasi, C., Wanprapar, N., Bowonkiratikachorn, P., Chokephaibulkit, K., Chearskul, S., Chimabutra, K., Sutthent, R., Foongladda, S., Inagi, R., et al. (1999). Primary infection of human herpesvirus 6 in children with vertical infection of human immunodeficiency virus type 1. *J. Infect. Dis.* 180, 50–55.
- Lacoste, V., Verschoor, E. J., Nerrienet, E., and Gessain, A. (2005). A novel homologue of Human herpesvirus 6 in chimpanzees. *J. Gen. Virol.* 86, 2135–2140.
- Leibovitch, E., Wohler, J. E., Cummings Macri, S. M., Motanic, K., Harberts, E., Gaitán, M. I., Maggi, P., Ellis, M., Westmoreland, S., Silva, A., et al. (2013). Novel marmoset (*Callithrix jacchus*) model of human Herpesvirus 6A and 6B infections: immunologic, virologic and radiologic characterization. *Plos Pathog.* 9, e1003138.
- Liszewski, M. K., Post, T. W., and Atkinson, J. P. (1991). Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu. Rev. Immunol.* 9, 431–455.
- Lopez, C. (1975). Genetics of natural resistance to herpesvirus infections in mice. *Nature* 258, 152–153.
- Lusso, P. (1996). Human herpesvirus 6 (HHV-6). *Antiviral Res.* 31, 1–21.
- Lusso, P., Crowley, R. W., Malnati, M. S., Di Serio, C., Ponzoni, M., Biancotto, A., Markham, P. D., and Gallo, R. C. (2007). Human herpesvirus 6A accelerates AIDS progression in macaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 5067–5072.
- Lusso, P., Ensoli, B., Markham, P. D., Ablashi, D. V., Salahuddin, S. Z., Tschachler, E., Wong-Staal, F., and Gallo, R. C. (1989). Productive dual infection of human CD4+ T lymphocytes by HIV-1 and HHV-6. *Nature* 337, 370–373.
- Lusso, P., Garzino-Demo, A., Crowley, R. W., and Malnati, M. S. (1995). Infection of gamma/delta T lymphocytes by human herpesvirus 6: transcriptional induction of CD4 and susceptibility to HIV infection. *J. Exp. Med.* 181, 1303–1310.
- Lusso, P., Malnati, M. S., Garzino-Demo, A., Crowley, R. W., Long, E. O., and Gallo, R. C. (1993). Infection of natural killer cells by human herpesvirus 6. *Nature* 362, 458–462.
- Lusso, P., Markham, P. D., DeRocco, S. E., and Gallo, R. C. (1990). In vitro susceptibility of T lymphocytes from chimpanzees (*Pan troglodytes*) to human herpesvirus 6 (HHV-6): a potential animal model to study the interaction between HHV-6 and human immunodeficiency virus type 1 in vivo. *J. Virol.* 64, 2751–2758.

Lusso, P., Secchiero, P., and Crowley, R. W. (1994). In vitro susceptibility of *Macaca nemestrina* to human herpesvirus 6: a potential animal model of coinfection with primate immunodeficiency viruses. *Aids Res. Hum. Retroviruses* 10, 181–187.

Marie, J. C., Astier, A. L., Rivaller, P., Roubourdin-Combe, C., Wild, T. F., and Horvat, B. (2002). Linking innate and acquired immunity: divergent role of CD46 cytoplasmic domains in T cell induced inflammation. *Nat. Immunol.* 3, 659–666.

McCune, J. M. (1996). Development and applications of the SCID-hu mouse model. *Semin. Immunol.* 8, 187–196.

Mock, D. J., Strathmann, F., Blumberg, B. M., and Mayer-Proschel, M. (2006). Infection of murine oligodendroglial precursor cells with Human Herpesvirus 6 (HHV-6)--establishment of a murine in vitro model. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 37 Suppl 1, S17–23.

Mori, Y., Akkapaiboon, P., Yonemoto, S., Koike, M., Takemoto, M., Sadaoka, T., Sasamoto, Y., Konishi, S., Uchiyama, Y., and Yamanishi, K. (2004). Discovery of a second form of tripartite complex containing gH-gL of human herpesvirus 6 and observations on CD46. *J. Virol.* 78, 4609–4616.

Mori, Y., Seya, T., Huang, H. L., Akkapaiboon, P., Dhepakson, P., and Yamanishi, K. (2002). Human herpesvirus 6 variant A but not variant B induces fusion from without in a variety of human cells through a human herpesvirus 6 entry receptor, CD46. *J. Virol.* 76, 6750–6761.

Reynaud, J. M., and Horvat, B. (2013). Human Herpesvirus 6 and Neuroinflammation. *Isrn Virol.* 2013, 11.

Riley-Vargas, R. C., Gill, D. B., Kemper, C., Liszewski, M. K., and Atkinson, J. P. (2004). CD46: expanding beyond complement regulation. *Trends Immunol.* 25, 496–503.

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

Santoro, F., Kennedy, P. E., Locatelli, G., Malnati, M. S., Berger, E. A., and Lusso, P. (1999). CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell* 99, 817–827.

Secchiero, P., Carrigan, D. R., Asano, Y., Benedetti, L., Crowley, R. W., Komaroff, A. L., Gallo, R. C., and Lusso, P. (1995). Detection of human herpesvirus 6 in plasma of children with primary infection and immunosuppressed patients by polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.* 171, 273–280.

Seya, T., Nomura, M., Murakami, Y., Begum, N. A., Matsumoto, M., and Nagasawa, S. (1998). CD46 (membrane cofactor protein of complement, measles virus receptor): structural and functional divergence among species (review). *Int. J. Mol. Med.* 1, 809–816.

Svensson, A., Almqvist, N., Chandy, A. G., Nordström, I., and Eriksson, K. (2010). Exposure to human herpes virus type 6 protects against asthma in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, 1033–1039.

Theodore, W. H., Epstein, L., Gaillard, W. D., Shinnar, S., Wainwright, M. S., and Jacobson, S. (2008). Human herpes virus 6B: a possible role in epilepsy? *Epilepsia* 49, 1828–1837.

Yalcin, S., Mukai, T., Kondo, K., Ami, Y., Okawa, T., Kojima, A., Kurata, T., and Yamanishi, K. (1992). Experimental infection of cynomolgus and African green monkeys with human herpesvirus 6. *J. Gen. Virol.* 73 ( Pt 7), 1673–1677.

Yamanishi, K., Okuno, T., Shiraki, K., Takahashi, M., Kondo, T., Asano, Y., and Kurata, T. (1988). Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet* 1, 1065–1067.

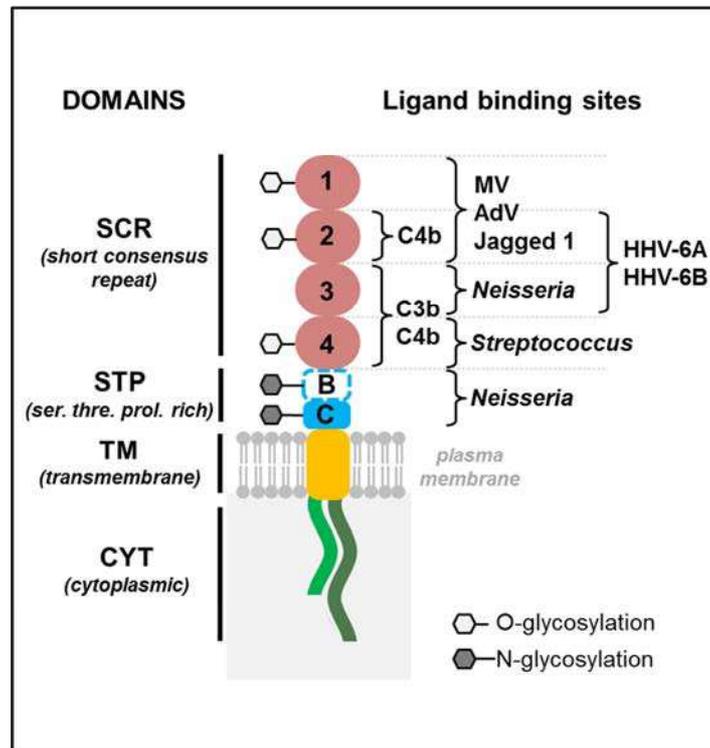
Yao, K., Crawford, J. R., Komaroff, A. L., Ablashi, D. V., and Jacobson, S. (2010). Review part 2: Human herpesvirus-6 in central nervous system diseases. *J. Med. Virol.* 82, 1669–1678.

Zerr, D. M. (2006). Human herpesvirus 6 and central nervous system disease in hematopoietic cell transplantation. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 37 Suppl 1, S52–56.

## Figure Legend

**Figure 1.** Schematic representation of human HHV-6 receptor CD46, expressed in transgenic mice. CD46 consists of extracellular part, with indicated binding site for different known CD46 ligands, transmembrane domain and one of two cytoplasmic tails: short, Cyt-1 or long, Cyt-2.

## Figures



**Figure 1.**

**Table 1. Described animal models for HHV-6 infection.**

Species	Genetic modification	Virus (strain)	Route of inoculation	Clinical signs	Virological data	Reference
African green monkey ( <i>Cercopithecus aethiops</i> )	none	HHV-6B (HST)	s.c./i.v	Skin rash (1 animal)	IgG response viral DNA (PBMC, l.n.)	Yalcin 1992
Cynomolgus macaque ( <i>Macaca fascicularis</i> )	none	HHV-6B (HST)	s.c./i.v.	none	IgG response viral DNA (PBMC, spleen)	Yalcin 1992
Pig-tailed macaque ( <i>Macaca nemestrina</i> )	none	HHV-6A (GS)	i.v.	fever, nasal discharge, splenomegaly, lymphadenopathy, abdominal rash	IgG response plasma viremia viral transcripts (l.n.)	Lusso 2007
Marmoset ( <i>Callithrix jacchus</i> )	none	HHV-6A (U1102)	i.v.*	motor weaknesses, sensorial abnormalities, facial palsy, lesions in the corpus callosum at MRI	IgG and IgM response viral DNA (brain, spleen, l.n., heart, kidney, liver)	Leibovitch 2013
	none	HHV-6B (Z29)	i.v.*	none	IgG response viral DNA (brain)	Leibovitch 2013
	none	HHV-6A (U1102)	i.n.*	none	Plasma viremia viral DNA (saliva, PBMC)	Leibovitch 2013
Mouse ( <i>Mus musculus</i> )	none	HHV-6B (Z29)	i.p.	none	IgG response	Svensson 2010
	none	HHV-6A	N/A	none	N/A	Lusso 1996
	SCID (Thy/liv)	HHV-6A (GS) HHV-6B (PL-1)	in the implant	N/A	N/A	Gobbi 1999

\* Inoculation performed with several (three or four) injections, s.c.: subcutaneous, i.v.: intravenous, i.n.: intranasal, i.p.: intraperitoneal, l.n.: lymph nodes, N/A: not available.

## ARTICLE 5

# **Type I interferon signaling protects mice from lethal henipavirus infection**

Dhondt KP, Mathieu C, Chalons M, Reynaud JM, Vallve A, Raoul H, Horvat B.

2013, Journal of Infectious Diseases



## **Abstract**

Hendra virus (HeV) and Nipah virus (NiV) are closely related, recently emerged paramyxoviruses that form Henipavirus genus and are capable of causing considerable morbidity and mortality in a number of mammalian species, including humans. However, in contrast to many other species and despite expression of functional virus entry receptors, mice are resistant to henipavirus infection. We report here the susceptibility of mice deleted for the type I interferon receptor (IFNAR-KO) to both HeV and NiV. Intraperitoneally infected mice developed fatal encephalitis, with pathology and immunohistochemical features similar to what was found in humans. Viral RNA was found in the majority of analyzed organs, and sublethally infected animals developed virus-specific neutralizing antibodies. Altogether, these results reveal IFNAR-KO mice as a new small animal model to study HeV and NiV pathogenesis, prophylaxis, and treatment and suggest the critical role of type I interferon signaling in the control of henipavirus infection.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov.gate2.inist.fr/pubmed/23089589>

<http://jid.oxfordjournals.org/content/207/1/142.long>