



**RÔLES DES PROTÉINES U54 ET PRÉCOCE
IMMÉDIATE 1 DANS L'ÉVASION IMMUNITAIRE ET
L'IMMUNOTHÉRAPIE DE L'HERPÈSVIRUS
HUMAIN 6B**

Thèse

Mathieu Iampietro

**Doctorat en microbiologie-immunologie
*Philosophiae doctor (Ph.D.)***

Québec, CANADA

© Mathieu Iampietro, 2014

Résumé

Le virus Herpès humain de type 6B (HHV-6B) est un virus qui infecte environ 95% de la population mondiale et qui est relativement bénin chez les personnes immunocompétentes mais dont les réactivations sont potentiellement graves chez les immunodéprimés. HHV-6B est l'agent étiologique de la roséole de l'enfant ou exanthème subit. Comme tout virus herpétique, HHV-6B a développé diverses stratégies lui permettant de moduler le système immunitaire à son avantage afin de persister au sein de son hôte. La caractérisation de nouveaux mécanismes d'évitement utilisés par HHV-6B ou l'identification de cibles immunodominantes permettraient de mettre en place de nouvelles stratégies afin de combattre l'infection.

Au cours de nos recherches, nous avons identifié que la protéine de tégument U54 d'HHV-6B inhibe la synthèse d'interleukine-2 (IL-2). Nous avons déterminé la voie de signalisation de la calcineurine (CaN) / NFAT comme étant le facteur antagonisé par U54 et caractérisé le mécanisme aboutissant à cette inhibition. De plus, en nous basant sur ces résultats, nous avons testé l'impact d'une abrogation de la voie CaN/NFAT par U54 sur la progression de cellules de cancer du sein. Nous avons démontré que l'expression d'U54 provoque une baisse significative de la prolifération de cellules de cancer du sein MCF-7. Ces résultats ont fait germer l'idée du ciblage de cellules de cancer du sein exprimant la protéine U54 couplé à un protocole d'immunothérapie adoptive anticancéreuse. Enfin, l'immunothérapie adoptive antivirale est également un sujet d'étude qui a été abordé. Nous avons identifié des épitopes de la protéine IE1 d'HHV-6B présentés dans le contexte de trois des allèles les plus communs dans la population caucasienne : HLA-A*02, HLA-A*03 et HLA-B*07. Ceci nous a permis de perpétuer une expansion clonale de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) capables de lyser des cellules infectées qui pourraient servir à contrôler d'éventuelles réactivations virales chez des patients immunodéprimés.

De manière générale, nos travaux permettent d'étendre les connaissances sur les mécanismes utilisés par HHV-6B pour contourner le système immunitaire de l'hôte mais également d'identifier des cibles permettant de développer un éventuel protocole d'immunothérapie adoptive.

Table des matières

Résumé	III
Tables des matières	V
Liste des figures	XI
Liste des tableaux	XIII
Liste des abréviations	XV
Avant-propos	XIX
Remerciements	XIX
1. Introduction	1
1.1 Herpèsvirus humain 6	1
1.1.1 Découverte et classification de l'Herpèsvirus humain 6	1
1.1.2 Structure et organisation du génome du HHV-6.....	2
1.1.3 Tropisme cellulaire du HHV-6	5
1.1.4 Cycle réplicatif et maintien de HHV-6	5
1.1.4.1 Attachement et pénétration du virus dans la cellule	5
1.1.4.2 Cycle lytique.....	7
1.1.4.3 Cycle latent.....	9
1.1.4.4 Intégration chromosomique.....	11
1.1.5 Pathologies associées au HHV-6	12
1.1.5.1 Epidémiologie.....	12
1.1.5.2 Etiologie.....	13
1.1.5.3 Pathologies et complications	13
1.1.5.4 HHV-6 et greffe de moelle osseuse	14
1.1.6 Traitement.....	16
1.2 HHV-6 et réponse immunitaire.....	17
1.2.1 Réponse immunitaire innée contre HHV-6.....	17
1.2.2 Réponse immunitaire adaptative contre HHV-6.....	18
1.2.2.1 Réponse anticorps.....	18
1.2.2.2 Réponse T chez les immunocompétents.....	19
1.2.2.3 Réponse T chez les patients atteints de sclérose multiple	20
1.2.2.4 Réponse T chez les patients transplantés.....	20
1.2.3 Antigènes de HHV-6 associés à la réponse immunitaire.....	21
1.2.3.1 Antigènes de HHV-6 reconnus par les cellules T.....	21
1.2.3.2 Caractérisation fonctionnelle de la réponse T CD4+ contre HHV-6.....	22
1.2.3.3 Réactions immunitaires croisées entre les épitopes de HHV-6A et HHV-6B....	23
1.2.3.4 Détection de peptides immunodominants de HHV-6 reconnus par des lymphocytes T CD4+.....	23

1.2.3.5	Caractérisation des réponses immunitaires des cellules T CD8+ contre HHV-6	23
1.3	HHV-6 et évasion immunitaire	24
1.3.1	Mécanismes d'immunomodulation par HHV-6	25
1.3.1.1	Modulation des différents types cellulaires infectés	25
1.3.1.2	Modulation médiée par l'engagement du récepteur CD46	26
1.3.1.3	Modulation médiée par l'altération de l'expression des récepteurs cellulaires	27
1.3.1.4	Modulation médiée par l'expression de chimiokines homologues ou récepteurs homologues viraux	28
1.3.1.5	Modulation médiée par l'altération de l'expression de cytokines et des chimiokines	28
1.4	Interleukine-2	29
1.4.1	Découverte	29
1.4.2	Activités et rôle physiologique de l'IL-2	30
1.4.3	Le récepteur de l'IL-2	31
1.4.4	Mécanismes généraux de l'expression du gène de l'IL-2	33
1.5	Voie de signalisation Calcineurine/NFAT	35
1.5.1	Le Ca ²⁺ et l'activité de la Calcineurine	36
1.5.2	Les protéines NFAT chez l'homme	37
1.5.3	Activation et régulation de NFAT dans les cellules T	38
1.5.4	Régulation de l'expression génique par NFAT dans les cellules T activées	40
1.5.5	Implication de la voie CaN/NFAT dans les cancers	41
1.5.5.1	Signalisation calcique dans les cancers	41
1.5.5.2	Rôle de NFAT dans la transformation et la prolifération des cellules tumorales	42
1.5.5.3	Modulation de l'invasion cellulaire par NFAT au niveau épithélial	42
1.5.5.4	Modulation de l'invasion cellulaire par NFAT au niveau endothélial	43
1.5.5.5	NFAT dans l'expression de chimiokines et l'infiltration cellulaire	44
1.6	Inhibiteurs sélectifs de la voie CaN/NFAT	44
1.6.1	CsA et FK506: les inhibiteurs classiques	45
1.6.2	Molécules dérivées de la CsA ou le FK506	46
1.6.3	Inhibiteurs agissant sur la CaN	47
1.6.4	Peptides inhibiteurs et protéines de pathogènes	47
1.6.4.1	Peptides inhibiteurs	48
1.6.4.2	Protéines de pathogènes	49
1.6.4.3	Possibles avantages en clinique	50
1.7	Immunothérapie adoptive contre HHV-6	51
1.7.1	Immunosuppression et résurgence de HHV-6 suite à une greffe de moelle osseuse	52
1.7.2	Principes de l'immunothérapie adoptive et possibles applications	53

1.7.3 Immunothérapie adoptive contre EBV ou HCMV	55
1.7.4 Ciblage de la protéine IE1 pour une immunothérapie adoptive anti-HHV-6B.....	56
1.7.5 Caractérisation de cibles immunodominantes de HHV-6B	57
1.7.6 Création d'un pool de peptides immunodominants multivirus.....	58
2. Développement	61
2.1 Objectifs.....	61
Chapitre 3.....	65
3. Inhibition of Interleukin-2 Gene Expression by Human Herpesvirus 6 U54 tegument protein	66
3.1 Abstract.....	67
3.2 Introduction.....	67
3.3 Materials and methods	69
3.3.1 Cell lines	69
3.3.2 Plasmids.....	70
3.3.3 Drugs.....	71
3.3.4 Luciferase assays	71
3.3.5 Western blot analysis	72
3.3.6 Co-ImmunoPrecipitation assays	72
3.3.7 Microscopy	73
3.3.8 RT-PCR assay.....	74
3.3.9 Fluorescence microplate assay.....	74
3.3.10 Statistical analysis.....	74
3.4 Results.....	75
3.4.1 Characterization of U54 tegument protein as inhibitor of <i>IL-2</i> gene transcription.....	75
3.4.2 U54 protein interacts with calcineurin phosphatase enzyme that regulates NFAT activity	76
3.4.3 U54 inhibits phosphatase activity of calcineurin on NFAT.....	77
3.4.4 U54 inhibits nuclear translocation of NFAT transcriptional factors.....	78
3.4.5 Involvement of U54 GISIT motif in the interaction with CaN and inhibition of 3.4.6 phosphatase activity.....	79
3.4.6 U54mut can not inhibit NFAT dephosphorylation as efficiently as U54	79
3.4.7 Inhibition of <i>IL-2</i> gene transcription by U54 tegument protein in J-Jhan T cell line	80
3.4.8 Secretion of U54 protein and penetration into bystander cells	81
3.5 Discussion	81
3.6 Acknowledgments.....	85
3.7 Legends	85
3.8 Reference list.....	91

Chapitre 4.....	109
4. Disturbance of Calcineurin/NFAT pathway by HHV-6 U54 tegument protein in MCF-7 breast cancer cell proliferation	110
4.1 Abstract	111
4.2 Legends	115
4.3 Reference list.....	117
Chapitre 5.....	123
5. Identification of HLA-A*02, -A*03 and -B*07 class I-restricted CD8+ T cell epitopes derived from human herpesvirus 6B immediate early I protein.....	124
5.1 Abstract	125
5.2 Introduction	125
5.3 Materials and methods	
5.3.1 Leukocyte isolation and cell lines	127
5.3.2 Genotyping.....	128
5.3.3 Peptides and Pepmixes.....	128
5.3.4 Flow Cytometry	129
5.3.5 Plasmids	129
5.3.6 IE1 processing assay	130
5.3.7 Western blot analysis	130
5.3.8 CTL expansion.....	131
5.3.9 Immune Epitope Database (IEDB)	131
5.3.10 RT-PCR assay	132
5.3.11 Functional studies	132
5.3.12 Statistical analysis	132
5.4 Results	133
5.4.1 Characterization of specific CD8+ T cell response against IE1B epitopes.....	133
5.4.2 Determination of IE1B processing and peptide presentation.....	133
5.4.3 Identification of immunoresponsive 15 mer peptides from IE1B protein.....	134
5.4.4 Determination of immunodominant HLA class I restricted 9 mer sequence from 15 mer peptides	136
5.4.5 Characterization of cytolytic properties of peptide stimulated T cells against HHV-6 Z29 infected autologous PBMC.....	136
5.4.6 Identification of a conserved IE1 peptide capable of generating CTL that can kill both HHV-6A and HHV-6B infected autologous targets.	137
5.5 Discussion	138
5.6 Acknowledgements	142
5.7 Legends	143
5.8 Reference list.....	147

6. Discussion générale	169
6.1 La protéine U54 de HHV-6B inhibe la l'expression du gène de l' <i>IL-2</i> et la prolifération des cellules de cancer du sein MCF-7 en perturbant la voie de signalisation CaN/NFAT.....	170
6.2 Identification de peptides immunodominants de la protéine IE1 du HHV-6B pour un protocole d'immunothérapie adoptive	173
6.3 Perspectives.....	176
6.4 Conclusion	180
7. Bibliographie	183

Liste des figures

Figure 1.1 Représentation schématique de la structure d'un virion de HHV-6. Tirée de ViralZone 2012, Swiss Institute of Bioinformatics	3
Figure 1.2 Représentation schématique du génome du HHV-6 et son organisation. Les locus IE-A et IE-B sont représentées en bleue et les régions répétées intermédiaires en rose. Les régions terminales répétées sont encadrées en noir	4
Figure 1.3 Interactions des complexes protéiques des HHV-6 avec les différents récepteurs cellulaires	7
Figure 1.4 Schéma récapitulatif du cycle lytique du HHV-6 avec les différentes étapes : attachement, entrée, réplication, maturation et sécrétion des néovirions	8
Figure 1.5 Représentation schématique des transcrits latents du HHV-6 avec les H6LTs de IE1, IE2, ORF99, ORF142 et ORF145	10
Figure 1.6 Schéma représentant les régions du génome viral et du chromosome cellulaire impliquées dans l'intégration du CIHHV-6	12
Figure 1.7 Schéma récapitulatif des cibles et des effets physiologiques de l'IL-2 sur les cellules du système immunitaire	31
Figure 1.8 Représentation schématique des IL-2R en fonction de leur expression cellulaire et de leur affinité à lier l'IL-2	32
Figure 1.9 Schéma représentant la signalisation générale de l'engagement du TCR à l'expression du gène de l'IL-2	35
Figure 1.10 Représentation schématique des molécules NFAT avec leurs séquences riches en sérines (SRR1-2), leurs séquences répétées (SP-1-3), et les sites de liaison à la CaN (PxIxIT et B).	37
Figure 1.11 Schéma représentant les mécanismes impliqués dans la rephosphorylation de NFAT et de son inactivation via la relocalisation cytoplasmique	40
Figure 1.12 Représentation schématique de l'effet inhibiteur de la CsA et du FK506 sur la signalisation de la CaN et de l'IL-2	46
Figure 1.13 Schéma récapitulatif des inhibiteurs de la voie CaN/NFAT, de leur cible et de leurs effets conduisant à l'abrogation de l'expression du gène de l'IL-2	49
Figure 1.14 Représentation schématique des étapes générales lors d'une immunothérapie adoptive décrivant l'isolation des lymphocytes T du donneur sain, l'expansion clonale des cellules T à l'aide d'APC présentant les antigènes viraux et d'un cocktail de cytokines favorisant la prolifération cellulaire et enfin la réinjection des lymphocytes T dans le receveur suite à la greffe de moelle osseuse.	54
Figure 3.1: U54 inhibits NFAT transcriptional activity 85	85
Figure 3.2: U54 inhibits ectopical NFAT1 and NFAT2 transcriptional activity	85
Figure 3.3: U54 inhibits ectopical NFAT1 and NFAT2 activity on IL-2 promoter	86
Figure 3.4: U54 interacts with CaN phosphatase enzyme	86
Figure 3.5: U54 inhibits dephosphorylation of NFAT1 protein by CaN	87
Figure 3.6: NFAT2-GFP nuclear translocation is inhibited in the presence of U54-mcherry	87

Figure 3.7: GISIT motif on U54 protein is important for interaction with CaN and inhibition of NFAT dephosphorylation.....	88
Figure 3.8: U54mut interacts with CaN but minimally compared to U54 and is not able to inhibit NFAT dephosphorylation.....	88
Figure 3.9: U54 abrogates <i>IL-2</i> gene transcription in J-Jhan T cell line	89
Figure 3.10: U54 is secreted from transfected cells	89
Supplementary figure 3.1 : NFAT1-GFP nuclear translocation is inhibited in the presence of U54-mcherry	89
Supplementary figure 3.2 : U54-mcherry favors NFAT2-GPF cytoplasmic location.....	90
Figure 4.1: U54 inhibits endogenous NFAT transcriptional activity in MCF-7 cells.....	115
Figure 4.2: U54 specifically abrogates MCF-7 breast cancer cells growth.....	115
Figure 4.3: U54 inhibits dephosphorylation of NFAT1 protein by CaN	115
Figure 5.1: Detection of HHV-6B anti-IE1 specific CD8+ T cell response.....	143
Figure 5.2: IE1B-SIIN protein is processed and peptides are efficiently presented and recognized by CTL	143
Figure 5.3: Identification of reactive 15 mer peptide pools on HLA-A*03, -A*02 and -B*07 donors	144
Figure 5.4: Identification of immunoresponsive individuals 15 mer peptides for HLA-A*03, -A*02 and -B*07 molecules	144
Figure 5.5: Identification of reactive 9 mer sequence presented by HLA-A*03, -A*02 and -B*07 molecules.....	144
Figure 5.6: IE1B specific expanded CTL efficiently kill HHV-6B-infected autologous target cells	145
Supplementary Figure 5.1: Design of AAPC stably expressing IE1B protein.....	145
Supplementary Figure 5.2: Identification of reactive 15 mer peptide on HLA-A*03 donor	145
Supplementary Figure 5.3: Identification of reactive 9 mer sequence presented by HLA-A*03, -A*02 alleles.....	146
Supplementary Figure 5.4: IE1B specific expanded CTL efficiently kill HHV-6B-infected autologous target cells.....	146

Liste des tableaux

Tableau 1.1 Caractéristiques et classification des virus de la famille Herpesviridae.....	2
Tableau 1.2 Liste et séquences des peptides immunodominants identifiés restreints pour l'allèle HLA-B*40	24

Liste des abréviations

AAV	Adénovirus associé
Ag	Antigène
ADN	Acide désoxyribonucléique
AID	Domaine auto-inhibiteur
APC	Cellule présentatrice d'antigène
AP-1	<i>Activator protein-1</i>
ARNm	Acide ribonucléique messenger
CaN	Calcineurine
Ca²⁺	Calcium
CBMC	Cellules mononucléées du sang de cordon
CCR	Récepteur à C-C chimiokine
CD	Cluster de différenciation
CIHHV-6	<i>Chromosomal-integrated HHV-6</i>
CK	<i>Casein kinase</i>
COX-2	Cyclooxygénase-2
CRAC	<i>Calcium release activated channels</i>
CREB	<i>cAMP response element binding</i>
CREM	<i>cAMP-responsive element modulator</i>
CsA	Cyclosporine A
CSF	Fluide cérébrospinal
CSF-1	<i>Colony stimulating factor-1</i>
CTL	Lymphocytes T cytotoxiques
CypA	Cyclophiline A
DAG	Diacylglycérol
DSCR	<i>Down syndrome critical region</i>
EBV	<i>Epstein-Barr virus</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ER	Réticulum endoplasmique
FK506	Tacrolimus
GDP	Guanosine diphosphate
GMCSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GSK	<i>Glycogen synthase kinase</i>
GTP	Guanosine triphosphate
GVHD	<i>Graft versus host disease</i>
HCMV	<i>Human cytomegalovirus</i>
HHV-6	<i>Human herpesvirus-6</i>
HHV-7	<i>Human herpesvirus-7</i>
HHV-8	<i>Human herpesvirus-8</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HSCT	<i>Hematopoietic stem cell transplant</i>
HSV-1	<i>Herpes simplex virus-1</i>
H6LT	Transcrits latents du HHV-6

IE	<i>Immediate-early</i>
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IKK	<i>IκB kinase</i>
IL	Interleukine
IL-2R	Récepteur de l'IL-2
IP3	Inositol triphosphate
ISG	<i>Interferon stimulated genes</i>
ISRE	<i>Interferon stimulated responsive elements</i>
kDa	kiloDalton
LCR	Liquide céphalo-rachidien
Lgd	Lymphocytes gamma-delta
LPA	Acide lysophosphatidique
LPC	Lyso-phosphatidylcholine
MBP	Protéine basique de la myéline
MCP	<i>Monocyte chemotactic protein</i>
MCIP	<i>Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein</i>
MDV	<i>Marek disease virus</i>
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
MS	<i>Multiple sclerosis</i>
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T-cells</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor Kappa B</i>
NHR	Région homologue de NFAT
NK	<i>Natural killer</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PAMPs	<i>Pathogens associated molecular pattern</i>
PBMC	Cellules mononucléées du sang périphérique
PGE2	Prostaglandine E2
PLC	Phospholipase C
PI3-K	<i>Phosphoinositide-3 kinase</i>
PK	Protéine kinase
RANTES	<i>Regulated upon activation normal T-cell expressed, and presumably secreted</i>
RHR	Région homologue de Rel
SCR	<i>Short consensus repeat</i>
SI	Système immunitaire
SPC	Sphingophosphorylcholine
SRR	<i>Serine rich region</i>
STAT	<i>Signals transducers and activators of transcription</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TGF-β	<i>Tumor growth factor beta</i>
Th	<i>T helper</i>
TIL	Lymphocyte infiltrant les tumeurs
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
TRS	Séquences télomériques répétées
Treg	Lymphocytes T régulateurs

VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VZV	<i>Varicella-zoster virus</i>
WB	Immunobuvardage

Avant-propos

Remerciements

Maintenant que la rédaction du manuscrit est terminée, j'aimerais profiter de ces quelques lignes afin d'exprimer ma gratitude envers toutes les personnes qui ont permis l'accomplissement de ce doctorat. Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche, le Dr. Louis Flamand, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et dont la patience, la disponibilité et la rigueur m'ont permis de faire avancer les différents projets et ont surtout contribué à mon développement scientifique. Au cours des différentes discussions que nous avons eu concernant mes recherches, j'ai été impressionné par sa capacité à trouver des solutions aux différents problèmes qui ont pu être rencontrés. Je mesure aujourd'hui la chance que j'ai eu de pouvoir observer et apprendre à ses côtés au cours de ces cinq dernières années.

Je tiens également à remercier le Dr. Annie Gravel dont les compétences théoriques et techniques ont été d'une aide inestimable. Grâce à elle, j'ai pu cerner et maîtriser un grand nombre de techniques et sa très grande disponibilité malgré une charge de travail importante a été énormément appréciée. Enfin, j'ai une grande pensée pour le Dr. Guillaume Morissette dont le soutien et l'appui ont été primordiaux pour la réussite de cette thèse. Guillaume a tenu un rôle majeur en étant un relais important entre Louis et moi et de par sa très grande qualité de scientifique, ses conseils précieux m'ont permis de développer un sens logique fondamental en Science. De plus, j'ai vraiment aimé toutes nos discussions en dehors du cadre scientifique sur la politique ou la culture franco-québécoise.

J'ai eu la chance d'évoluer dans une équipe de recherche où règne la bonne humeur en plus de personnes de qualités. Parmi elles, je tiens à remercier Isabelle Dubuc avec qui cela a toujours été un grand plaisir de travailler dans une atmosphère détendue et de passer de très bons moments dans le bureau et les nombreux 5 à 7 qui ont été organisés. Également Frédéric Trempe dont le sourire et la bonne humeur permanente ont égayé les journées et dont nous partageons une passion commune pour le soccer. Je voudrais aussi remercier les personnes qui ont permis mon intégration lors de mon arrivée au Québec et de me sentir bien rapidement, le Dr. Nathalie Cloutier, le Dr. Sylvain Lefort et sa compagne, le Dr. Juliette Diou, et le Dr Joanna Jaworska pour leur amitié à l'intérieur et à l'extérieur du laboratoire. Enfin, je remercie toutes les personnes que j'ai eu le plaisir

de cotoyer dans l'équipe depuis mes débuts en 2009, Guillaume Paré, Sara Artusi, le Dr. Marie-Ève Janelle et Nancy Verville.

C'est au CRRI et au CHUL que j'ai fait la connaissance de nombreuses personnes avec qui s'est développé une solide amitié et avec qui nous nous sommes soudés les coudes dans toutes les épreuves que nous avons eu à surmonter. Je voudrais donc les remercier pour tous les moments passés ensemble aussi bien au sein du laboratoire qu'en dehors avec Aurélie Corduan, Matthieu Rousseau, Benoit Laffont, Anne-Claire Duchez, Audrey Magron et Audrey Hubert ainsi que leurs conjoints respectifs.

C'est avec une certaine nostalgie que je vais dire un grand merci au tout frais Dr. Pascal Jalaguier. Pascal est et restera une personne à part dans ma vie et un très grand ami. Nous avons passé toute notre vie universitaire ensemble depuis nos premières heures étudiantes à Montpellier en 2003 jusqu'aux dernières en 2013 à Québec. J'ai beaucoup trop de choses à dire le concernant et n'aurai pas assez de place pour les exprimer et je vais donc me contenter d'un grand MERCI pour tout ce que nous avons vécu et de son soutien pendant 10 ans.

Je voudrais terminer en remerciant tout d'abord ma future femme Sharon Poulin dont l'amour et la bienveillance m'ont permis de surmonter toutes les épreuves et les moments un peu plus difficile que j'ai pu rencontrer. Je veux aussi remercier ma belle famille pour leur gentillesse et leur accueil chaleureux au sein de leur famille. J'ai aussi une pensée pour tous mes amis avec qui nous avons réussi à rester très proches malgré la distance et dont le support a été indéfectible durant ces cinq années.

Enfin, je dédie cette thèse à ma famille et tout particulièrement à mes parents Emile Iampietro et Françoise Iampietro ainsi que mon frère Sylvain Iampietro. Je ne pourrai jamais assez les remercier, ils ont toujours été présents pour moi à tous les instants et leurs sacrifices m'ont permis de me concentrer sur mes études sans devoir me soucier du reste et c'est à eux que je dois une très grande partie de la réussite de mes études.

1. Introduction

1.1 Herpèsvirus humain 6

1.1.1 Découverte et classification de l'Herpèsvirus humain 6

L'herpèsvirus humain 6 (HHV-6) appartient à la famille des *Herpesviridae* qui compte à ce jour neuf membres. Des études basées sur l'analyse génétique de la protéine de structure gH ont permis de subdiviser les herpèsvirus humains (HHV) en trois sous-familles d'*Herpesvirinae* désignées, alpha (α), beta (β) et gamma (γ) (Tableau 1). Une caractéristique propre aux virus herpétiques est leur capacité de persister au sein de leur hôte au cours de sa vie et de se réactiver au cours d'épisodes d'immunosuppression dus à un stress ou autres facteurs environnementaux. L'herpèsvirus humain 6A a été découvert et isolé en 1986 par Salahuddin *et al.* à partir de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) de patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) qui souffraient de désordres lymphoprolifératifs [1]. Les premières observations définirent un tropisme de ce virus pour les lymphocytes B qui fut nommé virus lymphotrope B humain (HBLV) [2]. C'est suite à des études menées par d'autres équipes qui ont permis de caractériser ce virus comme ayant une meilleure capacité de propagation et un tropisme pour les lymphocytes CD4⁺ qu'il a été rebaptisé HHV-6 [3,4].

HHV-6A appartient à la sous-famille des β -*herpesvirinae* qui comprend également l'herpèsvirus humain 7 (HHV-7) et le cytomégalovirus humain (HCMV) et plus particulièrement au genre Roséolovirus avec HHV-7. Cette classification a été établie en raison des très grandes similarités et homologies dans l'organisation des génomes de HHV-6, HHV-7 et HCMV. La similarité en acides aminés est de 46,6% à 84,9% avec HHV-7 et de 41% à 75,8% avec HCMV. Plusieurs travaux ont ensuite démontré que différents isolats d'HHV-6 présentaient des variations génétiques et phénotypiques [5]. Jusque très récemment, toutes ces souches étaient classées en deux groupes distincts, variant A (HHV-6A) et variant B (HHV-6B), dont l'organisation génomique est très proche. Au niveau nucléotidique, les homologies varient de 99% à 95% pour les régions les plus conservées à 75% pour les régions les plus divergentes localisées dans la région précoce immédiate [6]. Des différences biologiques majeures ont été décrites concernant la localisation des sites de clivage des endonucléases, le tropisme cellulaire *in vitro*, la régulation de la transcription, l'épissage des ARN et enfin la réactivité à certains anticorps monoclonaux spécifiques aux épitopes de différentes souches [7,8]. En 2012, ces divergences ont conduit le comité international de taxonomie des virus à classer HHV-6A et HHV-6B comme deux virus distincts [9]. Les souches

virales les plus utilisées en recherche pour HHV-6A sont les souches GS ou U1102, et pour HHV-6B, sont les souches HST ou Z29.

Sous-famille des Herpèsvirus	Membres	Pathologies associées
<i>Alpha-herpesvirinae</i>	<p>HHV-1: Virus Herpès Simplex humain 1 (HSV-1)</p> <p>HHV-2: Virus Herpès Simplex humain 2 (HSV-2)</p> <p>HHV-3: Virus Varicella-Zoster (VZV)</p>	<p>- Herpès buccal</p> <p>- Herpès génital</p> <p>- Varicelle et zona</p>
<i>Beta-herpesvirinae</i>	<p>HHV-5: Cytomégalovirus humain (HCMV)</p> <p>HHV-6A: Virus Herpès humain 6A</p> <p>HHV-6B: Virus Herpès humain 6B</p> <p>HHV-7: Virus Herpès humain 7</p>	<p>- Mononucléose et infections congénitales</p> <p>- Aucune association</p> <p>- Roséole</p> <p>- Roséole</p>
<i>Gamma-herpesvirinae</i>	<p>HHV-4: Virus Epstein-Barr (EBV)</p> <p>HHV-8: Virus Herpès humain 8 ou Virus Herpès associé au Sarcome de Kaposi (KSHV)</p>	<p>- Mononucléose, Lymphome, Hodgkin</p> <p>- Sarcome de Kaposi</p>

Tableau 1.1 Caractéristiques et classification des virus de la famille Herpesviridae

1.1.2 Structure et organisation du génome du HHV-6

Tous les membres de la famille *Herpesviridae* ont une structure virale similaire composée de quatre composantes principales: le génome viral, une capsidie icosaédrique entourant l'ADN viral, un téguement composé de protéines formant une couche interne et d'autres formant une couche externe, et enfin une enveloppe externe qui contient les glycoprotéines de surface. Une particule virale complète d'HHV-6 a un diamètre d'environ 200 nm [8,10].

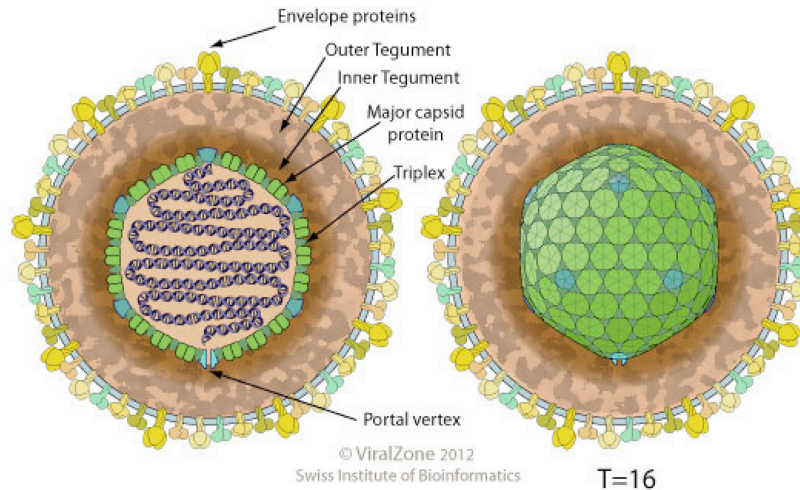


Figure 1.1 Représentation schématique de la structure d'un virion de HHV-6. Tirée de ViralZone 2012, Swiss Institute of Bioinformatics

Le génome est composé d'un double brin d'ADN d'une taille totale de 160-162 kbp constitué d'une région unique (U) de 143-145 kb flanquée de deux régions terminales directement répétées (DR_L and DR_R) de 8-9 kb chacune. La région unique possède deux loci codant pour les protéines précoces immédiates (IE) IE-A et IE-B dont le locus IE-A contient trois régions nucléotidiques répétées R1, R2 et R3 [11,12]. Les régions terminales directement répétées codent pour des gènes impliqués dans la réplication virale, l'assemblage des néovirions, et sont elles mêmes flanquées de séquences télomériques répétées (TRS), l'une dite homologue $(CCCTAA)_n$ et l'autre dite hétérogène $het(CCCTAA)_n$ qui consistent un patron de séquences télomériques irrégulières [13]. Ces dernières auraient un rôle lors de la réplication virale et dans le maintien du génome sous la forme épisomale durant la latence dans les cellules infectées mais seraient également responsables d'un mécanisme propre à HHV-6 parmi tous les herpesvirus humains permettant l'intégration du génome viral au sein du chromosome de l'hôte [13,14]. L'organisation génomique de la région unique montre des similarités et une colinéarité avec les deux autres membres de la sous-famille des *β -herpesvirinae* HCMV et HHV-7. Les deux espèces HHV-6A et HHV-6B présentent également des disparités au sein de leur génome. Il y a 119 cadres ouverts de lecture (ORF) identifiés U1-U100 et DR1-DR7 pour HHV-6B codant pour 97 gènes alors que HHV-6A possède 110 cadres ouverts de lecture et parmi ces 110 ORF, ces neuf ORF différents étant identifiés B1-B9 chez HHV-6B [12,15].

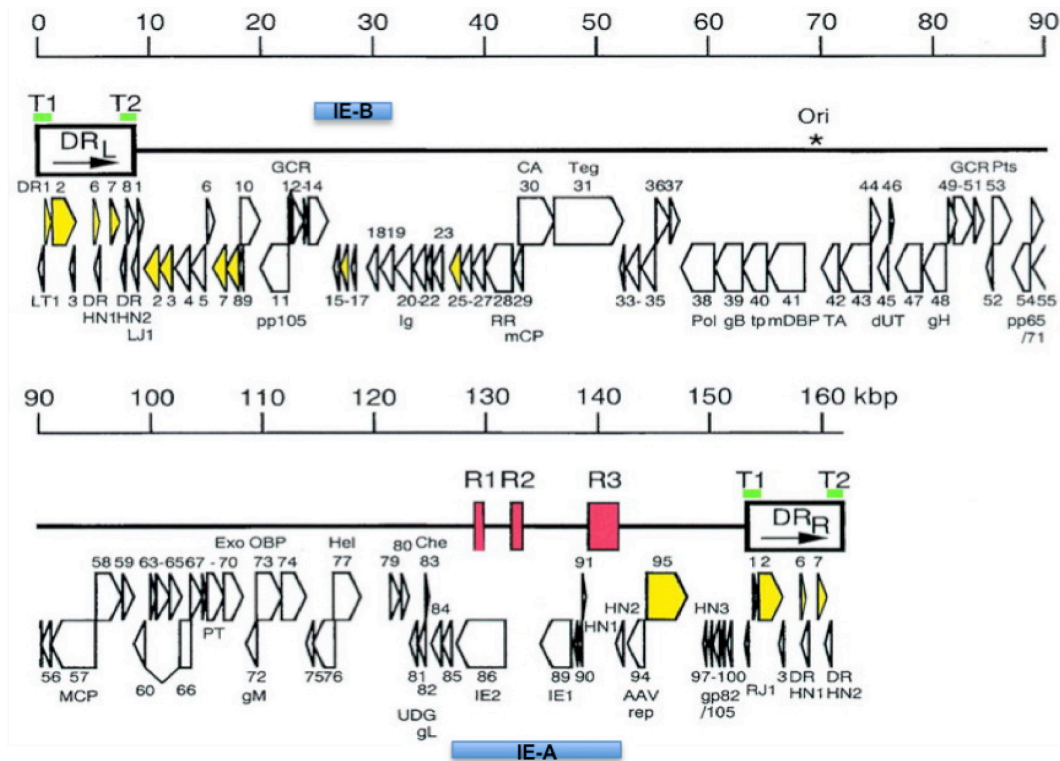


Figure 1.2 Représentation schématique du génome du HHV-6 et son organisation. Les locus IE-A et IE-B sont représentés en bleu et les régions répétées intermédiaires en rose. Les régions terminales répétées sont encadrées en noir. Adaptée de [12]

Cependant, certains gènes des HHV-6 sont conservés et partagés par tous les virus herpétiques contenu dans sept blocs. Un huitième bloc est conservé seulement entre les quatre membres de la sous-famille des *β-herpesvirinae* contenant les gènes de la famille US22 mais dont les fonctions seraient diverses. Enfin, il existe sept gènes exclusifs aux HHV-6: U1, U9, U22, U61, U78, U83 et U94. Seuls trois de ces gènes ont été caractérisés et ont été associés à différents mécanismes viraux. Le gène U22 code pour une glycoprotéine d'enveloppe et U83 pour une chimiokine virale permettant le recrutement de monocytes par chimiotactisme dans lesquels HHV-6 va établir sa latence [16]. Le troisième gène, U94, code pour une protéine décrite comme homologue à la protéine de l'adénovirus associé de type 2 (AAV-2) [13] et ayant un rôle dans l'inhibition de la réplication virale [17] en se liant à un facteur de transcription de type TATA-binding protein, avec notamment des transcrits découverts lors de la latence [18], mais surtout comme étant un acteur majeur de l'intégration chromosomique du génome de HHV-6 [19].

1.1.3 Tropisme cellulaire du HHV-6

Des études *in vitro* ont démontré des différences dans la capacité des espèces et plus particulièrement de certaines souches de HHV-6A et HHV-6B à infecter ou non certains types de cellules primaires ou lignées cellulaires [20,21]. HHV-6 possède un tropisme cellulaire ubiquitaire mais strictement primates. Les deux virus infectent préférentiellement les lymphocytes T CD4⁺ [4] et les cellules des glandes salivaires [22], qui sont les cellules dans lesquelles les virus vont établir leur cycle lytique afin de proliférer [23]. En recherche, différentes lignées cellulaires de lymphocytes T sont utilisées pour la propagation des virus. Concernant HHV-6A, la lignée cellulaire HSB-2 est utilisée pour propager la souche virale GS alors que la lignée J-JHAN est utilisée pour la souche U1102. Pour l'espèce HHV-6B, les souches HST et Z29 peuvent être propagées dans des lymphocytes T primaires ou bien dans les lignées cellulaires MOLT3 [24]. En dehors des cellules utilisées pour propager les virus, beaucoup d'études *in-vitro* ont permis d'élargir l'inventaire de cellules capable d'être infectées par HHV-6. Les différentes cellules qui ont été caractérisées sont les fibroblastes, les cellules natural killers (NK), les cellules épithéliales et endothéliales [20] mais on a également identifié un tropisme pour les cellules du système nerveux telles que les oligodendrocytes, la microglie ou encore les astrocytes [25,26]. Ces études ont également permis de démontrer la possibilité d'une co-infection entre HHV-6A et HHV-6B comme par exemple dans des tissus de poumons ou le fluide cébrospinal [27,28,29]. De manière générale, HHV-6A est plus souvent associé à un neurotropisme que HHV-6B qui lui sera plutôt lymphotrope [30]. Les cibles cellulaires *in-vivo* de HHV-6 peuvent être élargies à toutes les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC), aux cellules mononuclées de sang de cordon ombilical (CBMC), et de tissus de foie, de cerveau ou de poumon entre autres. Jusque très récemment, cette ubiquité dans la capacité de HHV-6 à infecter était associée au facteur cellulaire CD46 que l'on retrouve exprimé à la surface d'un très large éventail de cellules, mais, depuis mai 2013, un nouveau récepteur a été identifié comme permettant l'infection de l'espèce HHV6-B spécifiquement, le facteur cellulaire CD134.

1.1.4 Cycle répliatif et maintien de HHV-6

1.1.4.1 Attachement et pénétration du virus dans la cellule

Dans le cas des virus enveloppés, les glycoprotéines et/ou leurs complexes à la surface des virus sont importants pour l'entrée dans la cellule cible. Deux sites ont été caractérisés comme étant les réservoirs à partir desquels HHV-6 était capable d'engendrer son cycle répliatif, les lymphocytes T CD4⁺ activés et les glandes salivaires. Lors d'une infection à HHV-6, le virus

pénètre dans la cellule à l'aide du cofacteur cellulaire CD46 [31] ou du cofacteur cellulaire CD134 récemment identifié et spécifique à HHV-6B [32]. Peu de choses ont jusque là été caractérisées mais CD134, également appelé OX-40, est un récepteur membre de la super famille TNF et est présent à la surface des lymphocytes T activés, mais très peu exprimé à la surface des cellules gliales. HHV-6B est connu comme ayant un tropisme pour les lymphocytes T comme démontré aussi bien *in vivo* lors d'une infection aigue qu'*in vitro*. Nous savons simplement que CD134 est un récepteur fonctionnel pour l'entrée de HHV-6B dans la cellule [32].

Concernant CD46, c'est un récepteur cellulaire permissif pour l'infection de HHV-6A et HHV-6B. CD46 est une protéine membranaire de type I et est régulatrice du système du complément en inactivant les facteurs du sérum C3b et C4b et protège ainsi la dégradation de la cellule hôte par le complément [33,34]. Contrairement à la plupart des virus enveloppés qui utilisent une ou deux glycoprotéines de surface pour pénétrer à l'intérieur de la cellule, les virus herpétiques ont besoin d'au moins trois glycoprotéines conservées, gB, gH and gL. Deux complexes de glycoprotéines ont été identifiés chez HHV-6 pour l'entrée dans la cellule, gH/gL/gO et gH/gL/gQ1/gQ2. Le gène gO est conservé uniquement chez les β -herpèsvirus. Chez HCMV ou le cytomegalovirus murin (MCMV), gO forme un complexe avec gH et gL et sert à l'entrée du virus au sein des fibroblastes. De plus, la fonction chaperone de gO a été rapportée précédemment comme promouvant l'incorporation du complexe gH/gL dans le néovirion. Cependant, il y a toujours peu de choses connues concernant le complexe gH/gL/gO dans l'infection par HHV-6 [35]. Le complexe gH/gL/gO est incorporé sur le virion HHV-6 mais ne se lie pas à CD46, il se lie à la molécule CD134 et permet l'entrée du virus HHV-6B dans la cellule [32]. Le gène gQ est quant à lui unique aux Roséolovirus HHV-6 et HHV-7 [36] et le complexe gH/gL/gQ1/gQ2 de HHV-6 fonctionne comme un ligand pour CD46 qui va permettre l'entrée du virus [37]. Concernant HHV-6A, aucun élément du complexe gH/gL/gQ1/gQ2 n'a été caractérisé comme se fixant au récepteur CD46. Le composant gQ1 existe sous deux formes, gQ1-74K et gQ1-80K dans les cellules infectées par HHV-6A [38]. Alors que toutes les souches de HHV-6A se lient au CD46, seules les souches Z29 et PL-1 de HHV-6B ont été caractérisées comme se liant au CD46 alors que la souche HST n'est pas capable de s'y lier [36]. Donc, différentes espèces et mêmes différentes souches appartenant à la même espèce peuvent pénétrer la cellule en utilisant différents récepteurs. La découverte du CD134 pourrait permettre de caractériser les mécanismes d'infection de certaines souches de HHV-6B jusque là inconnus.

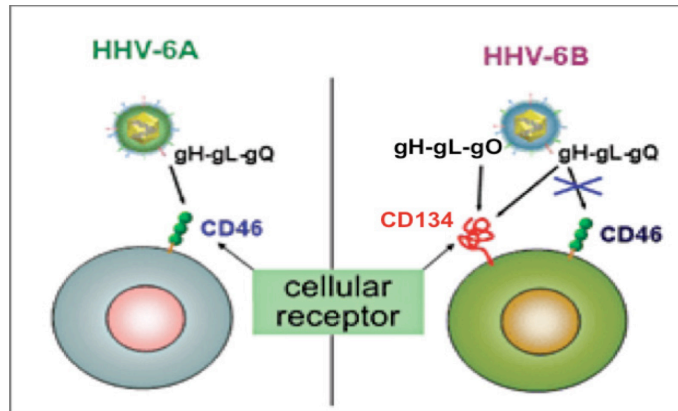


Figure 1.3 Interactions des complexes protéiques des HHV-6 avec les différents récepteurs cellulaires. Adaptée de [32]

1.1.4.2 Cycle lytique

Après les étapes communes à tous les herpesvirus humains (adsorption/fusion/pénétration), la décapsidation partielle du virus libère le génome qui migre le long du cytosquelette via les microtubules accompagné de certaines protéines jusqu'aux pores nucléaires. Les étapes de transcription débutent dès la pénétration dans le noyau dont des protéines de la nucléocapside ou du téguement peuvent être les initiatrices. HHV-6 se distingue de la majorité des virus à développement intra-nucléaire comme par exemple les adénovirus ou papovavirus par sa capacité à faire synthétiser les enzymes virales responsables de la synthèse d'ADN viral par la cellule hôte (par exemple la thymidine kinase (U69) ou l'ADN polymérase (U38)) [39]. A partir de ce moment, trois étapes se succèdent : la phase précoce immédiate (phase IE ou α), la phase précoce de synthèse d'ADN viral (phase E ou β) et la phase tardive de synthèse des protéines de structure (phase L ou γ) [40].

La phase IE intervient suite à la transcription de gènes viraux de type IE dont les transcrits codent des protéines transactivatrices responsables de la transcription des gènes précoces de la phase E suivante et de la transcription de gènes cellulaires dont les produits sont nécessaires à la réplication du génome viral. Elles interviennent aussi dans la régulation des processus de transcription sous forme de boucles de rétrorégulation. Les deux protéines majeures sont IE1 et IE2 qui vont avoir des effets dans la régulation de l'expression des gènes viraux et cellulaires avec un rôle transactivateur pour IE2 [41,42,43] alors que la protéine IE1 possède une activité transactivatrice moindre [44] et a été associée à un mécanisme d'évasion immunitaire en inhibant la réponse innée [45,46]. La phase E suit la transcription des gènes IE et exprime des facteurs de la

transcription virale ainsi que les enzymes virales impliquées dans le métabolisme des acides nucléiques (dihydrofolate réductase, thymidilate synthétase, thymidine kinase, ribonucléotide réductase, dUTPase) ou dans la réplication de l'ADN (DNA binding protein, ADN polymérase, hélicase-primase). L'essentiel de la réplication de l'ADN viral est réalisé par les enzymes virales produites mais en association avec des facteurs de réplication d'origine cellulaire [47,48,49]. Le résultat en est la production continue, "en cercle roulant", d'immenses brins d'ADN viral (concatémères) qui sont clivés par des nucléases [50,51]. Les brins d'ADN viral individualisés seront ensuite assemblés dans le noyau au cours de la phase L suivante après la pénétration dans le noyau des protéines de capsid synthétisées au cours de cette dernière phase. Enfin, durant la phase L, les protéines de structure (tardives) sont synthétisées après la synthèse de l'ADN viral [52]. De fait, le blocage de la phase E inhibe les synthèses virales de la phase L. Les protéines tardives produites subissent une maturation, par clivage ou glycosylation par exemple.

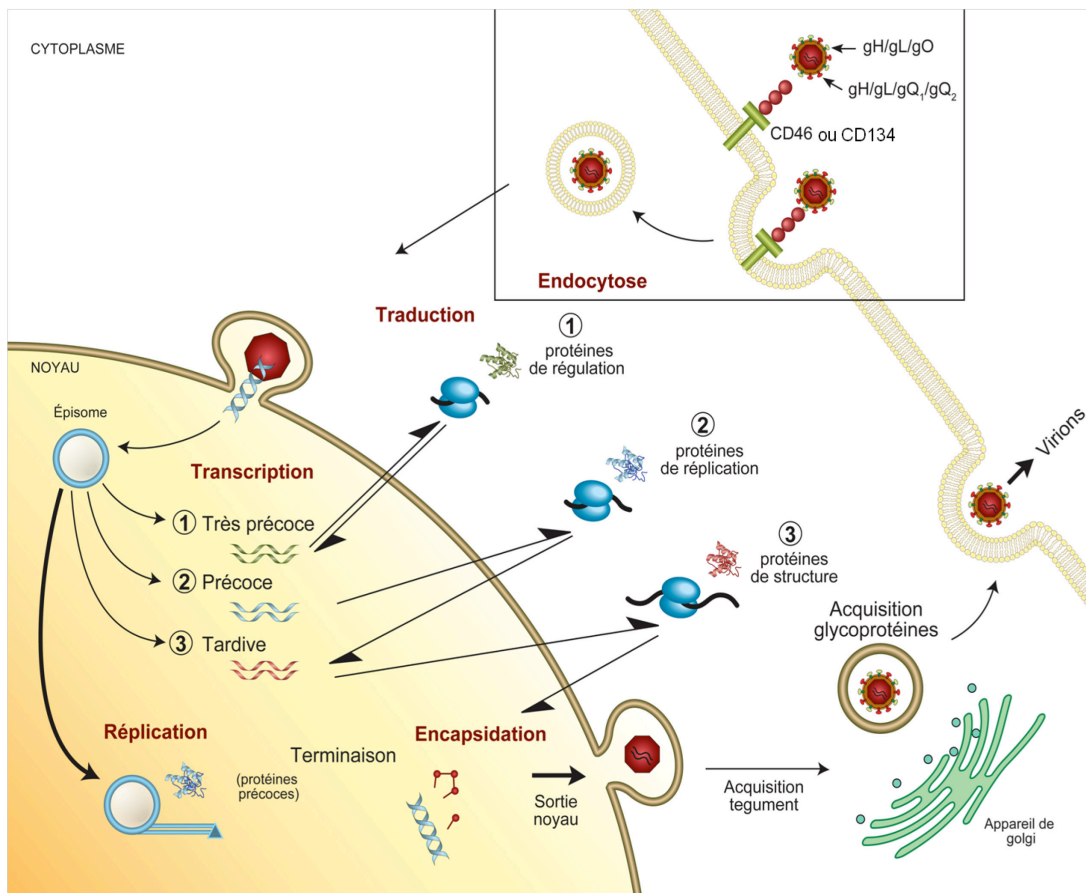


Figure 1.4 Schéma récapitulatif du cycle lytique du HHV-6 avec les différentes étapes : attachement, entrée, réplication, maturation et sécrétion des néovirions. Adaptée de Trempe et al. Virologie (2011)

La phase lytique est caractérisée par la production de particules virales soit infectieuses (pleines), soit immatures (vides) qui migrent du noyau vers la surface de la cellule en s'entourant au cours de leur migration de leurs enveloppes (tégument et enveloppe externe). Les glycoprotéines de surface sont également fixées dans l'enveloppe externe au cours de cette migration. Les virions sont généralement libérés par bourgeonnement suivant la voie exosomale [53] et l'effet cytopathogène accompagnant ce cycle aboutit à la destruction de la cellule par lyse passive ou bien apoptose.

1.1.4.3 Cycle latent

Une caractéristique commune à tous les herpèsvirus humains est de pouvoir persister au sein de l'hôte durant toute sa vie suivant la primo-infection. Cette infection latente est un des multiples mécanismes d'évasion immunitaire développés par HHV-6 et consiste en l'expression minimale de protéines virales qui ne permettra pas la genèse de néovirions [21]. Le génome viral va persister sous la forme d'un épisome qui va permettre seulement l'expression des protéines absolument nécessaires au maintien du virus. Cet état latent, de part son activité minimale, va réduire la présentation antigénique et empêcher le système immunitaire de reconnaître et détruire les cellules infectées [54]. Cependant, la latence est entrecoupée de périodes de réactivations du virus qui permettent la production de virions qui peuvent infecter de nouvelles cibles et maintenir l'infection à HHV-6 au sein de l'hôte.

Les mécanismes et l'implication de la latence dans les cellules sont pour le moment peu connus. Les cellules qui ont été identifiées comme des sites de la latence virale sont les monocytes/macrophages [55] et les cellules progénitrices de la moëlle osseuse [56]. Aucune protéine de HHV-6 n'a pu être détectée pendant la latence mais des transcrits ont par contre été caractérisés dépendant de deux sites associés à la latence dans le génome viral. Les travaux menés par Kondo *et al* ont permis de localiser deux sites de transcription de l'infection latente (LSS-I et LSS-II) à l'intérieur de la région IE-A qui vont générer deux type de transcrits originaires de chacun des deux sites et sont appelés transcrits latents de HHV-6 (H6LTs) [18]. Ces sites étant situés près des régions codantes des transcrits IE1 et IE2, à environ 9,7 kb en amont ou bien entre les exons 2 et 3, les H6LTs possèdent des cadres ouverts de lecture (ORF) communs à ceux de IE1 et IE2. Cette même équipe de recherche a découvert trois autres ORFs dans les régions 5' proximales des H6LTs, ORF99, ORF142 et ORF145, qui sont constitués respectivement de 99, 142 et 145 acides aminés. Il est à noter que HHV-6 partage ces caractéristiques avec le HCMV dont les transcrits latents sont générés de la même manière. Par contre, une autre étude menée par l'équipe du Dr. Di Luca a

démonstré l'implication de la protéine U94 et la présence de transcrits du gène *U94* pendant la latence de HHV-6 [57]. Elle a la capacité de réprimer l'expression des transcrits précoces immédiats des gènes *U16/17*, *U39*, *U42*, *U81*, *U89/90* ou *U91*. *U94* est spécifique à HHV-6 et n'a pas d'équivalent chez les autres virus herpétiques humains. Elle est l'homologue fonctionnelle de la protéine Rep du virus adéno-associé de type 2 (repAAV-2). De fait, *U94* semble être impliquée dans l'intégration du génome viral au sein du chromosome de la cellule infectée de l'hôte et permettrait au virus de persister sous une forme HHV-6 intégré au chromosome (CIHHV-6).

Malgré tout, de la latence peut découler une réactivation et un scénario plausible de ce mécanisme serait que des stimuli cellulaires favoriseraient l'expression de H6LTs, qui agiraient ensuite au niveau de l'épisome latent en déclenchant la phase précoce immédiate du cycle lytique dont les protéines IE néosynthétisées prendraient le relais pour effectuer la réplication de HHV-6 au complet.

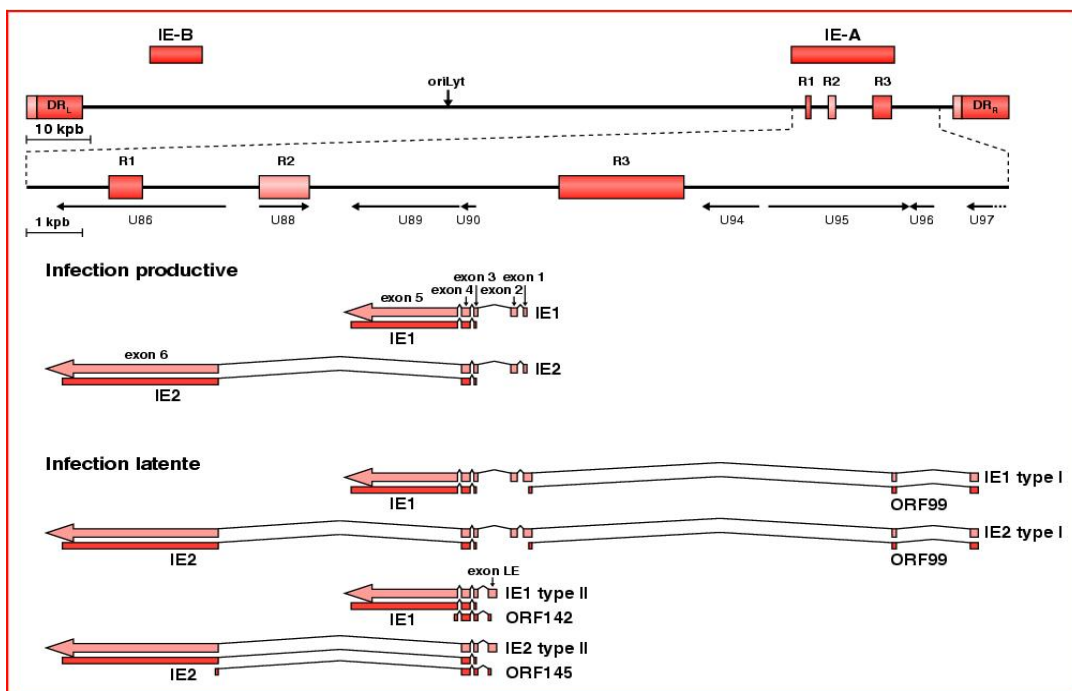


Figure 1.5 Représentation schématique des transcrits latents du HHV-6 avec les H6LTs de IE1, IE2, ORF99, ORF142 et ORF145. Tirée de [18]

1.1.4.4 Intégration chromosomique

HHV-6A et HHV-6B possèdent une caractéristique unique chez les virus herpétiques humains, soit la capacité d'intégrer leur génome au sein des chromosomes. Un virus herpétique de poulet responsable de la maladie de Marek (MDV) avait déjà été identifié comme possédant cette caractéristique, dont la conséquence est de provoquer de lymphomes chez les volailles infectées [58]. La découverte de l'intégration du HHV-6 a été faite dans les années 90 par le laboratoire du Dr. Luppi en caractérisant la présence du génome viral chez trois patients atteints de lymphome de Burkitt, de lymphome non-Hodgkinien ou de sclérose en plaques [59]. La présence de CIHHV-6 est estimée à environ 1% dans la population mondiale avec une prévalence du CIHHV-6B trois fois plus fréquentes que le CIHHV-6A [60]. Le mécanisme par lequel se produit ce phénomène serait que lors d'une primo-infection, le génome serait capable de s'intégrer dans un chromosome cellulaire humain. En cas d'intégration de cellule germinale, toutes les cellules d'un individu de la génération suivante possèderaient une copie du génome HHV-6 suite à la transmission héréditaire verticale [61]. Tout comme le MDV, HHV-6 possède des séquences télomériques homologues au sein de son génome au niveau des régions terminales directes répétées $(CCCTAA)_n$ qui lui permettent de s'intégrer aux séquences télomériques aux extrémités du chromosome $(TTAGGG)_n$ [11,13,62]. Il existe une protéine unique à HHV-6 qui a été identifiée comme étant possiblement responsable de ce mécanisme d'intégration, soit la protéine U94 codée par le gène *U94* [63]. Plusieurs caractéristiques en font le candidat idéal: c'est tout d'abord le seul gène dont on détecte des transcrits pendant la phase latente chez des individus sains [57]. Puis U94 semble également réguler la réplication virale comme démontré dans une étude où la transfection d'un vecteur codant pour U94 inhibait la réplication de HHV-6 [17]. Il existe aussi une forte homologie de séquence entre les protéines U94A et U94B avec la protéine Rep68 du AAV-2 qui est responsable de l'intégration chromosomique [63]. Enfin, une étude a démontré que U94 possède la capacité de se lier l'ADN simple brin [19]. A ce jour, il n'y a pas eu d'association claire établie entre CIHHV-6 et la transcription ou l'expression de gènes viraux à partir du génome intégré, même si cette possibilité est fortement suggérée.

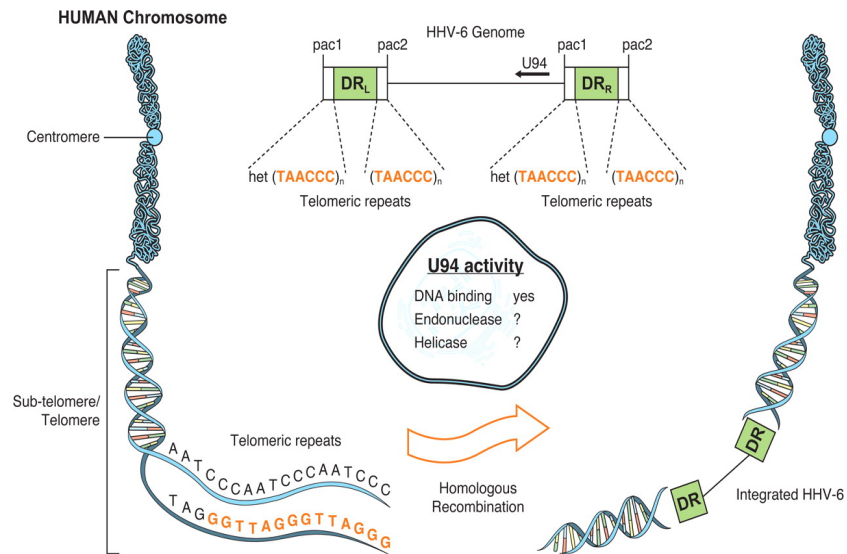


Figure 1.6 Schéma représentant les régions du génome viral et du chromosome cellulaire impliquées dans l'intégration du CIHHV-6. Tirée de [62]

1.1.5 Pathologies associées au HHV-6

1.1.5.1 Épidémiologie

HHV-6B partage les principales caractéristiques des herpesvirus humains classés *β-herpesvirinae* et est l'agent étiologique de l'exanthème subit ou roséole infantile du jeune enfant appelé également 6^{ème} maladie éruptive de l'enfance [64]. Très largement répandu dans le monde, le pic de primo-infection se situe entre 6 mois et 2 ans au moment où chute le taux d'anticorps maternels [65]. Environ 90% des enfants ont des anticorps anti-HHV-6 avant la fin de leur 2^{ème} année, surtout les enfants en collectivité [66]. Le taux de séropositivité diminue au cours de l'enfance et de l'adolescence pour remonter au cours de la vie adulte à environ 95% de la population. Les formes de récurrence sont largement asymptomatiques ou cliniquement non spécifiques, s'accompagnant d'une fièvre et d'asthénie chez l'adulte [67]. En effet, l'immunité acquise après la primo-infection fait la prévient les formes symptomatiques lors des infections secondaires.

La transmission maternofoetale en cours de grossesse et au moment de l'accouchement est rare mais possible [68]. L'allaitement ne paraît pas être un facteur de contamination. Par contre, le virus est essentiellement transmis par la salive, les sécrétions respiratoires, le don de sang, de tissus ou d'organes. HHV6 est également une infection sexuellement transmissible.

1.1.5.2 Etiologie

HHV-6B est responsable de la roséole infantile qui est une maladie bénigne et une des principales causes de fièvre chez le jeune enfant [64]. La bénignité est en fait relative car les pics fébriles peuvent atteindre 40,5°C pendant une période de 2 à 8 jours (moyenne 4 jours) avec des risques de convulsions fébriles dans 10% des cas [69]. Ces convulsions fébriles doivent être distinguées des véritables méningites à HHV-6 [70], peu fréquentes, caractérisées à la ponction lombaire par une élévation des protéines et des leucocytes et la détection du génome d'HHV-6 dans le LCR. La fièvre cède brutalement, coïncidant avec un rash caractéristique rubéoliforme (20% des cas). Les macules débutent au tronc et s'étendent aux membres et au visage puis vont confluer (elles sont moins marquées au niveau du visage que dans le cas de la rubéole). L'éruption cutanée est de courte durée, 24-48 heures comparée aux 3-5 jours pour la rubéole, et est non prurigineuse puis disparaît sans desquamation ni pigmentation. De nos jours, il est établi que l'espèce HHV-6B représente la majorité des infections chez les personnes immunocompétentes et est responsable de la roséole alors qu' HHV-6A y contribue peu malgré de récentes évidences établies dans des populations d'Afrique sub-saharienne [71]. Le nombre de maladies associées à HHV-6 n'a cessé d'augmenter ces dernières années, faisant de ce virus un pathogène émergent.

1.1.5.3 Pathologies et complications

Chez les personnes immunocompétentes, les réactivations virales sont généralement asymptomatiques car contrôlées par le système immunitaire (SI) [21], mais peuvent résulter en des complications sérieuses dans de rares cas telles que les méningo-encéphalites, l'hépatite aïgue, des insuffisances médullaires, des pneumonites, des myocardites ou encore certaines formes de cancers [72]. Les espèces virales HHV-6A et HHV-6B ont des distributions tissulaires différentes chez l'homme. Alors que HHV-6A et HHV-6B sont neurotropes, il existe des évidences suggérant une plus grande sévérité de HHV-6A concernant les cas cliniques d'atteintes neurologiques [73]. Également, bien que la très grande majorité des réactivations post-transplantation se produisent avec HHV-6B, l'ADN et l'ARN messager (ARNm) de HHV-6A sont retrouvés plus fréquemment que ceux de HHV-6B dans les maladies inflammatoires comme la sclérose multiple (MS) ou la rhombencéphalite [74,75,76]. HHV-6A a été trouvé de manière prédominante dans le système nerveux central de patient ayant une MS tout comme dans le foie chez des patients transplantés hépatiques souffrant d'hépatite syncytiale à cellules géantes [77], et enfin une infection active a été

détectée dans le sang et le LCR de patients ayant des rechutes de MS [78] . Mais HHV-6B semble être le seul responsable de l'épilepsie au niveau du lobe temporal et du statut épileptique [79].

C'est également grâce à cette ubiquité que HHV-6 a été associé à des affections chroniques du système immunitaire, incluant le syndrome d'activation macrophagique, la lymphadénite histiocytaire nécrosante, les lymphomes et maladies de Hodgkin ou encore le syndrome de Sjögren [80,81,82,83,84]. Enfin, HHV-6 est capable d'induire le cycle réplcatif d'autres virus lorsqu'il y a co-infection, notamment celui du virus Epstein-Barr (EBV) [85] et celui du VIH [86]. Différentes observations ont également démontré que chez des patients immunodéprimés, lors d'une co-infection HHV-6 et HCMV, la réactivation du HHV-6 précédait celle du HCMV, suggérant du fait de l'homologie fonctionnelle des protéines de ces deux β -herpèsvirus, que les protéines de HHV-6 néosynthétisées pouvaient activer le cycle réplcatif du HCMV [87].

Enfin, deux types de complications ont émergé ces dernières années dont le CIHHV-6 serait la cause. Tout d'abord, des erreurs dans le diagnostic de HHV-6 par la détection d'une "fausse" charge virale est à l'origine d'une prise d'antiviraux excessive et non nécessaire [88]. En général, l'ADN viral de HHV-6 n'est pas présent dans le sérum ou le plasma des personnes saines. La détection d'une haute charge virale plasmatique (environ 10^5 copies/ml), due à la lyse et la libération d'ADN cellulaire lors du prélèvement, entraîne un faux diagnostic. Tout ceci peut avoir comme conséquence une prise d'antiviraux qui n'affecte en rien la charge virale (car pas de virus à éliminer) et une toxicité associées aux drogues chez les patients. De plus, le fait que HHV-6 ne soit pas un pathogène diagnostiqué avant une transplantation ou greffe comme le VIH ou HCMV, il se peut qu'un donneur avec CIHHV-6 soit sélectionné et qu'un de ses organes ou ses cellules souches possédant le génome viral soient greffés à un receveur. Une telle greffe pourrait avoir des effets délétères pour le receveur et c'est pour cette raison qu'il serait temps de réfléchir à l'impact clinique majeur que peut avoir HHV-6 et de l'utilité de le diagnostiquer.

1.1.5.4 HHV-6 et greffe de moelle osseuse

Parmi les personnes immunodéprimées, il y a les patients qui ont subi une transplantation de cellules souches hématopoïétiques (HSCT) dont le système immunitaire a été complètement supprimé en vue de la greffe et qui vont être susceptibles à la réactivation de pathogènes opportunistes. La quasi totalité des receveurs de moelle ont été infecté par HHV-6 avant la transplantation, et suivant la greffe, le virus se réactive chez environ 50% des patients entre 2 et 4 semaines post-greffe [89,90]. HHV-6B représente la grande majorité de ces réactivations et a été

associé à beaucoup de syndromes cliniques et à une forte mortalité chez les HSCT, cependant, il n'y a pas de preuves directes pour le moment qui permettent d'affirmer qu'HHV-6B est la cause de ces pathologies [89].

Les risques de reactivation de HHV-6 sont associés à des facteurs cliniques et démographiques. Les HSCT allogéniques ont un risque accru de résurgence comparées aux greffes autologues, de même à l'intérieur de la population recevant une greffe allogénique, ceux ayant des allèles HLA dépareillés avec le donneur auront un risque accru de réactivation. La source des cellules souches hématopoïétiques va également devenir un facteur pris en compte car il a été démontré qu'un receveur subissant une greffe avec des cellules souches de cordon ombilical avait un taux de 70-90% de réactivation virale comparé au 30-50% pour les patients greffés avec des cellules souches de la moelle osseuse ou de sang périphérique [91]. Enfin l'âge et les maladies à traiter sont des risques qui ont été identifiés comme sujets potentiels favorisant la réactivation de HHV-6 après la transplantation.

Ces dernières années, des évidences se sont accumulées permettant de croire à une association causale de HHV-6 envers les cas d'encéphalite chez les HSCT [91]. Les critères de Bradford-Hill d'association, de consistance, de spécificité, de temporalité, de gradient biologique (relation dose-réponse), de plausibilité, de cohérence, d'analogie et d'évidence expérimentale fournissent une structure permettant d'évaluer les évidences épidémiologiques comme possible cause de pathologie. Beaucoup de critères tels que la consistance de l'association, les multiples rapports de cas et différentes études d'observations rapportées permettent de lier HHV-6 à l'encéphalite chez les HSCT. En fait, HHV-6 a été observé comme étant la cause la plus commune d'encéphalite [92]. De plus, il est établi qu'au vu du fait que l'infection à HHV-6 s'établit durant l'enfance, le virus est présent chez le patient bien avant l'encéphalite. Également, des études ont prouvé la plausibilité de cette association du fait qu'HHV-6 peut infecter des cellules du système nerveux central et ainsi être présent pour instaurer la pathologie [26]. La cohérence de cette association est légitimée du fait que cette association causale n'entre pas en conflit avec tout ce qui est connu concernant HHV-6 ou l'encéphalite. Enfin, une analogie existe avec d'autres herpèsvirus humains connus pour causer l'encéphalite. Le seul critère qui à ce jour ne permet pas d'affirmer de manière certaine cette association est le manque d'évidence expérimentale démontrant qu'un traitement antiviral approprié puisse améliorer ou prévenir cette pathologie. Parmi tous les cas d'encéphalites reportés à ce jour et dont le virus associé a été typé, il apparaît qu'HHV-6B est le plus souvent associé [93]. De plus, la plupart des encéphalites sont observées chez des HSCT allogéniques ayant des allèles HLA différents ou dépareillés.

Des études cliniques ont démontré l'impact de la réactivation de HHV-6 sur la suppression de la moelle osseuse chez les HSCT [94,95]. Des rapports de cas ont suggéré que les effets suppresseurs de HHV-6 pourraient causer une insuffisance dans la prise de greffe. Il a également été prouvé que HHV-6 peut infecter de manière latente les cellules progénitrices de la moelle osseuse et empêcher leur développement post-greffe [96]. D'autres manifestations cliniques importantes ont été associées à la réactivation de HHV-6, telles que la maladie du greffon contre l'hôte aïgue (aGVHD) [97,98], la réactivation du HCMV [99], la pneumonite [100] et les maladies gastro-intestinales [101,102]. Cependant, l'association du virus à ces pathologies ne sont pas clairement démontrées et nécessitent des investigations. Concernant la aGVHD, des études semblent démontrer l'implication de HHV-6 comme ayant des effets délétères sur le système immunitaire de l'hôte en inhibant la réponse antivirale et en activant les cellules T alloréactives induisant une réponse pro-inflammatoire exacerbée conduisant à des aGVHD de grade II-IV (de Pagter et al).

1.1.6 Traitement

Aucun agent antiviral ni aucun vaccin spécifique à HHV-6 n'ont été mis au point jusqu'à présent. Seuls des composés utilisés contre les infections à HCMV se sont également montrés efficaces contre HHV-6 *in-vitro* et *in-vivo* [21,103]. Le ganciclovir, un nucléoside analogue de la guanine, le cidofovir, un nucleoside acyclique phosphonate analogue de la cytosine, et le foscarnet, un analogue pyrophosphate, inhibent l'action de la polymérase virale et ainsi la réplication du virus. Ces différents composés utilisés en clinique pour des thérapies anti-HHV-6 ont démontré des effets et une efficacité similaire sur HHV-6A et HHV-6B [104]. Cependant, ces différentes drogues antivirales ont des effets secondaires délétères provoquant des troubles hématologiques importants, de la néphrotoxicité ainsi que différentes complications. C'est pour ces raisons que chacun de ces antiviraux est utilisé dans des pathologies associées à une réactivation de HHV-6 bien précise et à des doses non toxiques, sachant que le Cidofovir est généralement utilisé en dernier recours suite à une résistance aux deux autres drogues. Des études récentes ont démontré l'efficacité du Cidofovir et du Foscarnet dans le traitement et la réduction des niveaux d'ADN viral dans le LCR de patients souffrant d'encéphalite [105]. De nouvelles recherches doivent être menées afin d'améliorer les protocoles cliniques permettant l'utilisation de ces antiviraux ou bien pour découvrir de nouveaux composés, tel que l'Artésunate, ayant moins d'effets secondaires tout en diminuant la charge virale [106,107].

1.2 HHV-6 et réponse immunitaire

HHV-6A et HHV-6B sont des virus lymphotropes des lymphocytes T et neurotropes qui ont été caractérisés comme ayant des propriétés immunomodulatrices médiées par des effets directs dans les cellules infectées ou indirects sur les cellules avoisinantes ou non infectées. La réponse des cellules T contre HHV-6 a été très difficile à mesurer *ex vivo* suivant l'isolation des PBMC et la plupart des études qui ont permis d'analyser cette réponse ont été réalisées par expansion de cellules T spécifiques *in vitro*. Des recherches ont caractérisé les réponses polyfonctionnelles T CD4+ et CD8+. Il a été observé que les protéines structurales du virion sont des protéines majeures pour la reconnaissance par le système immunitaire comme pour les autres virus à ADN. Ces dernières années, des études ont permis d'identifier des épitopes spécifiques permettant une reconnaissance par des lymphocytes T CD4+ ou CD8+ contre HHV-6.

1.2.1 Réponse immunitaire innée contre HHV-6

Les virus herpétiques provoquent une réponse immunitaire innée qui va contrôler la réplication virale avant la mise en place de la réponse immunitaire adaptative [108]. Cette réponse immunitaire innée est déclenchée par les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) qui reconnaissent une signature moléculaire microbienne et va induire une première ligne de défense. Suivant la fixation du ligand sur son récepteur, un signal intracellulaire va être libéré et activer l'expression et la sécrétion de cytokines comme les interférons de type I (IFN-I).

L'expression et la signalisation des récepteurs Toll-like (TLR) permettant la reconnaissance des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) microbiens et induisant la réponse interféron ont été investigués sur les lymphocytes T CD4+ et les cellules dendritiques. Dans des lymphocytes T CD4+ infectés par HHV-6A, il a été démontré que le TLR-9 était surexprimé et induisait des signaux de transduction et apoptotiques [109]. La signalisation des TLRs aboutit à l'expression des premières défenses antivirales de la cellule, les interférons (IFN). Les IFN-I incluent les interférons α (IFN- α) (13 sous-types chez les humains) et β (IFN- β) dont l'activité est d'inhiber la réplication virale. Il a été prouvé que HHV-6A et HHV-6B étaient capables de limiter cette réponse en agissant sur la signalisation ou l'effet de ces cytokines [110].

Les cellules NK jouent aussi un rôle majeur dans la réponse immunitaire innée en contrôlant la progression tumorale ou les infections microbiennes. Les patients déficients en réponse NK sont hautement susceptibles aux infections herpétiques dont les HHV-6 [111]. Les

cellules NK répondent rapidement suite à l'infection et leur activité est grandement augmentée par les cytokines pro-inflammatoires. Les IFN-I et l'interleukine-12 (IL-12) appuient les fonctions effectrices des NK alors que l'IL-15 va augmenter leur expansion. Les enfants subissant une infection à HHV-6 ont un pic de réponse NK durant la phase aigue qui va décliner jusqu'à ce que la réponse immunitaire adaptative prenne le relais [112,113]. Ces découvertes suggèrent que les cellules NK sont un des éléments du contrôle de la prolifération de HHV-6 lors d'une infection primaire [113]. Une étude *in vitro* a montré que la cytotoxicité induite par les cellules NK contre les PBMC infectées par HHV-6 était médiée par l'IL-15 qui était produite au préalable par les monocytes et les cellules NK [114]. L'IL-15 stimule également la synthèse d'un interféron de type II (IFN-II), l'IFN- γ , par les lymphocytes CD4+ et les cellules NK [115]. L'IFN- γ va surtout agir en parallèle des IFN-I en favorisant l'expansion et l'activation des lymphocytes T CD4+ ou CD8+. Peu de choses sont connues sur les mécanismes par lesquels les cellules NK éliminent les cellules infectées par HHV-6. Il a été suggéré que les cellules infectées pourraient exprimer à leur surface des ligands des récepteurs des cellules NK et ainsi activer leur activité cytotoxique [116].

1.2.2 Réponse immunitaire adaptative contre HHV-6

La réponse immunitaire adaptative contre les virus herpétiques est très importante dans le contrôle de la réplication virale lors de l'infection primaire ou lors des réactivations. La caractérisation de ces réponses chez l'EBV et le HCMV ont permis la mise au point d'immunothérapies [117,118]. Par contre, la réponse immunitaire adaptative spécifique à HHV-6 est très peu connue, ce qui explique le fait qu'il n'y ait encore aucune immunothérapie utilisée dans des protocoles cliniques. La caractérisation de la réponse T spécifique à HHV-6 est compliquée du fait de son tropisme pour les cellules T CD4+ [4] et des effets cytopathiques perpétrés suite à l'infection [119,120,121]. De plus, le fait que la quasi-totalité de la population est infectée par HHV-6 [21], l'accès à des individus non infectés qui pourraient nous donner des informations sur le niveau basal des réponses immunes reste très difficile.

1.2.2.1 Réponse humorale

L'infection primaire à HHV-6 induit une production d'anticorps IgM dont le pic est atteint environ trois semaines post-infection avant de laisser place à la production d'anticorps IgG qui vont agir durant toute la vie de l'hôte [8]. Ces études sur la réponse humorale anti-HHV-6 ont été menées grâce à des tests d'immunofluorescence (IFA) ainsi que par immunobuvardage (WB) [122]. Malgré tout, il est toujours difficile de nos jours de pouvoir différencier la réponse humorale spécifique à

HHV-6A de celle dirigée contre HHV-6B. L'antigène (Ag) majeur pour la réponse anticorps est la protéine majeure du tégument U11, faisant de cette cible un marqueur sérologique efficace pour une infection à HHV-6 [123]. Les différentes études menées sur la réponse anticorps ont permis d'identifier des déterminants antigéniques très proches entre les HHV-6 et HHV-7, ce qui rend encore plus compliquée la discrimination entre les différentes espèces virales. Cependant, des travaux très récents semblent avoir permis la mise au point d'une méthode par WB permettant de discriminer la réponse anticorps spécifique aux protéines virales U11, U47, gH et gB de chacune des espèces en utilisant des sérums de patients infectés sur des protéines recombinantes [124,125].

1.2.2.2 Réponse T chez les sujets immunocompétents

Les données sur les réponses des cellules T sont limitées concernant HHV-6 car ce sont des virus restreints aux primates [126]. Il n'existe à ce jour pas de modèle animal permettant une bonne infection et lorsque le virus est capable de pénétrer dans des cellules de rongeurs, il n'est pas capable de se répliquer [31,127]. Chez l'homme, il y a une réponse immunitaire qui a lieu lors de la primo-infection chez les enfants ou bien lors d'infections secondaires suivant des épisodes de réactivations chez des adultes. La très grande majorité des études effectuées sur la réponse T ont été menées sur des donneurs immunocompétents avec des taux d'ADN viral très bas et des fréquences de lymphocytes T anti-HHV-6 très faibles.

Des études ont été effectuées chez des enfants infectés par HHV-6. La réponse T spécifique à HHV-6B s'établit chez la plupart des enfants dans les deux semaines suivant les premiers symptômes (fièvre) [113]. Cependant, cette réponse anti-HHV-6B semble se produire tardivement comparée à celles des autres herpesvirus humains. Les raisons de ce délai ne sont pas claires, mais ne semblent pas être dues à une disfonction des cellules T induite par HHV-6B. Les réponses immunitaires mémoires observées chez les adultes semblent s'établir entre la deuxième et la douzième année de la vie [128]. Des analyses par cytométrie en flux (FACS) sur des PBMC ont montré des fréquences similaires des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ spécifique à HHV-6 chez les adultes sains et les enfants post-infection [128,129].

Concernant les adultes sains, différentes recherches ont démontré une prolifération robuste des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques à HHV-6A et HHV-6B [129,130,131]. Cette prolifération touche principalement les cellules mémoires effectrices. Contrairement à la réponse T spécifique contre HCMV qui peut atteindre jusqu'à 4% de la population totale des PBMC [132], la réponse T aux différents Ag de HHV-6 est faible. La fréquence de cellules T CD4⁺ relarguant de

l'IFN- γ en réponses aux antigènes HHV-6 a été évaluée à environ 0,1% [133]. Des études de criblage utilisant des mélanges de peptides chevauchants couvrant des protéines de HHV-6 homologues de cinq Ag immunodominants de HCMV ont montré des populations de cellules T IFN- γ + spécifique inférieures à 0,1% [134].

1.2.2.3 Réponse T chez les patients atteints de sclérose multiple

La sclérose multiple (MS) est une maladie autoimmune du système nerveux. Différentes études indiquent clairement qu'HHV-6 comme un des éléments associés à cette pathologie [135]. Une réponse inflammatoire contre HHV-6 ou bien du mimétisme moléculaire sont les deux scénarios privilégiés pour le rôle de HHV-6 dans l'établissement de la maladie.

Il a été rapporté que chez les patients souffrant de MS, la réponse immunitaire la plus forte l'a été contre HHV-6A par rapport à HHV-6B [73,136]. Ces observations confirment également le fait que HHV-6A est plus neurotrope que HHV-6B [21] et que les réponses contre HHV-6A chez les patients MS sont plus fortes que contre HHV-6B chez les personnes immunocompétentes [73]. Chez les patients MS, le profil de cytokines était caractéristique d'une forte réponse inflammatoire avec de hauts taux d'IFN- γ et de bas niveaux d'IL-4 et d'IL-10, deux cytokines inhibant la réponse inflammatoire notamment en inhibant la prolifération cellulaire ou la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, alors que chez des donneurs sains, cette réponse montrait de forts taux d'IL-10 et de faibles niveaux d'IFN- γ [130]. De plus, Wang et al ont rapporté que HHV-6 induisait l'arrêt de la prolifération des cellules T médiée par une augmentation de l'IL-10 alors que de faibles taux d'IL-10 sont retrouvés dans la réponse T chez les patients souffrant MS [130,137,138].

Un deuxième mécanisme associé à HHV-6 a été identifié via du mimétisme moléculaire par la protéine U24 qui mimerait un résidu peptidique (PRTPPPS) de la protéine basique de la myéline (MBP) de l'hôte [139]. Une étude a évalué la réponse des cellules T contre U24 et MBP et plus de 50% des clones de cellules T étaient capables de reconnaître les deux peptides de U24 et MBP. De plus, les patients MS avaient une fréquence des clones de cellules T reconnaissant ces épitopes supérieure aux patients n'ayant pas de MS.

1.2.2.4 Réponse T chez les patients transplantés

Une réponse robuste et une prolifération des lymphocytes T CD4+ et CD8+ sont observées chez des patients HSCT environ trois mois après la prise de greffe [134,140]. Le rôle protecteur des cellules T anti-HHV-6 a été caractérisé par l'observation d'une virémie HHV-6 persistente chez des

patients n'ayant pas une réponse proliférative forte [136]. Cependant, la réponse proliférative contre HHV-6 chez des patients HSCT subissant une réactivation virale a été associée à des syndrômes sévères de GVHD [90]. La fréquence des cellules T spécifiques à HHV-6 a été caractérisée comme est similaire chez les patients HSCT ne subissant aucun symptôme post-greffe et des patients sains avec 0,05%, cependant cette fréquence peut être 3,5 fois plus élevée pour la population de cellules T CD8+ cytotoxique chez les patients avec GVHD [141]. Des réactivations ont été rapportées chez des patients transplantés du foie et associées à des complications post-greffe et une suppression de la réponse T anti-HHV-6 [142,143]. Les réponses immunitaires au HCMV se reconstituent dans les semaines suivant la transplantation alors que pour HHV-6, il y a un délai qui ne permet un retour à une immunité normale seulement un an post-transplantation suggérant une suppression prolongée contre HHV-6.

1.2.3 Antigènes de HHV-6 associés à la réponse immunitaire

1.2.3.1 Antigènes de HHV-6 reconnus par les cellules T

Trois études ont rapportées une description fine et une identification d'antigènes de HHV-6 reconnus par des clones de lymphocytes T présents dans des échantillons de sangs prélevés chez des donneurs sains [133,134,144]. Afin d'identifier ces Ag, des peptides viraux synthétiques ont été utilisés pour stimuler les cellules et ces dernières ont ensuite été testées pour leur capacité à synthétiser de l'IFN- γ .

Nastke et al ont utilisé un programme algorithmique de prédiction d'épitopes pour sélectionner des peptides d'une taille de 9-mer ayant une très forte affinité pour se fixer à complexe majeur d'histocompatibilité (HLA) de classe II (HLA-II) DR1, plus particulièrement l'allèle DRB1 *0101. Du fait de la grande homologie entre les différents allèles HLA-II, les peptides capables de se fixer à HLA-DR1 pourraient également se fixer à d'autres molécules HLA-II. Le dépistage s'est fait grâce à une banque de peptides provenant de protéines traduites du génome de HHV-6B ainsi qu'une autre banque de peptides provenant de six protéines de virions qui ont été établies comme abondantes dans des cellules infectées par des analyses protéomiques. Onze peptides ont été trouvés comme activant une réponse T CD4 dans les PBMC de différents donneurs sains. Seuls deux de ces peptides faisaient partie de la banque de peptide provenant du génome complet alors que les neuf autres appartenaient à la banque de peptides des protéines de virions: cinq rapportés à la protéine de capsid U57, deux aux protéines du tégument U11 et U14, et deux aux glycoprotéines U38 et U48.

Ces résultats ont confirmé des études antérieures qui avaient déterminé que les protéines de capsid et de tégument comme activatrice de la réponse immunitaire T [136,145].

Gerdemann et al ont focalisé leurs recherches sur cinq protéines de HHV-6 homologues à des Ag immunodominants identifiés chez HCMV: la protéine de virion myristylée U71, la protéine transactivatrice U90 et les protéines de tégument U11, U14 et U54.

Finalement, une étude menée par Martin et al a évalué et identifié la réponse immunitaire des cellules T CD8+ spécifique à un allèle HLA-I, HLA-A*0201, prédit par un programme algorithmique de prédiction comme théoriquement forte pour les protéines U90, U11 et U54. Effectivement, les cellules T CD8+ étaient capables de réagir fortement contre des lymphocytes T CD4+ infectés par HHV-6B en produisant des cytokines antivirales et d'éliminer les cellules infectées.

1.2.3.2 Caractérisation fonctionnelle de la réponse T CD4+ contre HHV-6

Cette étude pour la réponse immune des cellules T dans les PBMC est compliquée du fait de la faible fréquence des clones de cellules T spécifiques aux antigènes. C'est pour cette raison que ce type de recherches sont menées *in vitro* par expansion des lymphocytes T qui reconnaîtront un épitope. Nastke et al ont montré qu'une expansion *in vitro* sur des préparations contenant HHV-6A ou HHV-6B produisaient des lymphocytes T CD4+ spécifiques à l'antigène qui représentaient 25% de la population totale à la fin du protocole. De plus, ces études menées suite à l'expansion des cellules T CD4+ contre les 11 épitopes candidats corroboraient les résultats trouvés au préalable avec les PBMC totales. L'expansion de ces différents clones de lymphocytes T CD4+ démontrait aussi que les épitopes reconnus étaient générés suite au processing de la protéine dans la cellule infectée. Par la suite, il a été déterminé que ces clones T CD4+ en plus de sécréter de l'IFN- γ , avaient un potentiel cytotoxique suggéré par l'expression du marqueur de potentiel cytotoxique CD107a/b à la surface des cellules. Ce résultat confirmait celui d'une étude antérieure démontrant la cytolyse perpétrée par des lymphocytes T CD4+ anti-HHV-6 qui relarguaient de l'IFN- γ [133]. Gerdemann et al ont également mis en lumière une expansion clonale de cellules T CD4+ qui proliféraient chez tous les donneurs contre U90, U14, U54 et U11 et dans environ 60% des donneurs contre U71. Une forte corrélation avait été établie entre l'expression d'IFN- γ et la cytotoxicité dans cette étude [134].

1.2.3.3 Réactions immunitaires croisées entre les épitopes de HHV-6A et HHV-6B

Bien que HHV-6A et HHV-6B soient des virus qui partagent 90% d'homologies [15], ils diffèrent dans beaucoup d'aspects comme leur biologie et les conséquences suivant la primo-infection ou la réactivation. Cependant, de par leur grande homologie, moins de 10% des clones de lymphocytes T CD4+ sont spécifique à une seule des deux espèces pour un même épitope [146]. Des études sur des réponses prolifératives de cellules T CD4+ menées contre des antigènes de capsid ont révélées des clones cellulaires spécifiques à une espèce virale [136] alors qu'une autre a rapporté une réaction croisée toujours contre 5 antigènes de capsid [133].

1.2.3.4 Détection de peptides immunodominants de HHV-6 reconnus par des lymphocytes T CD4+

Des analyses *ex vivo* pour étudier la réponse T CD4+ dirigée contre des peptides bien précis est simple mais limitée pour HHV-6 du fait de la fréquence faible que l'on retrouve dans les PBMC de donneurs de sang sains (0,02% des PBMC totales) [133]. Cependant, cette fréquence est augmentée chez les patients transplantés, ce qui permettra une meilleure lecture par une technique de marquage utilisant des tétramères présentant des complexes HLA/peptides spécifiques à HHV-6, une amélioration de l'identification de clones T qui s'y fixeront de manière spécifique [134,147]. Malgré tout, même l'utilisation de tétramères a montré un faible signal dans les PBMC, c'est donc pour cette raison que l'enrichissement des cellules positivement marquées par les tétramères ont permis de véritablement établir une association entre des clones de lymphocytes T CD4+ et certains épitopes [147]. De plus, cette méthode est malgré tout limitée du fait des haplotypes utilisés souvent limités aux allèles HLA communs dans la population caucasienne et des différences individuelles qui peuvent exister entre les individus.

1.2.3.5 Caractérisation des réponses immunitaires des cellules T CD8+ contre HHV-6

Bien que la stimulation *in vitro* de PBMC avec les virus HHV-6A ou HHV-6B induisent l'expansion virale des lymphocytes T CD4+ et CD8+, les premières études n'avaient caractérisé que la réponse T CD4+ spécifique à HHV-6. Tout comme la réponse T CD4+, la fréquence des cellules T CD8+ est extrêmement faible dans la population de PBMC totale (inférieure à 0,1%) [134,144]. Ce n'est que très récemment que plusieurs équipes ont commencé à s'intéresser et à identifier la réponse T CD8+. Ces premières recherches ont abouti très récemment au début de l'année 2013 à l'identification des premiers épitopes immunodominants spécifiques à HHV-6B par des clones de cellules T CD8+. Effectivement, Gerdemann et al ont réussi à caractériser trois

épitopes spécifiques pour une réponse T CD8+ anti-HHV-6, deux pour U90 et un pour U14, restreints pour l'allèle HLA-B*40. De plus, cette étude a permis de démontrer que les épitopes restreints pour l'allèle HLA-B*40 activent des cellules polyfonctionnelles capables de produire de l'IFN- γ , du facteur nécrotique de tumeur alpha (TNF- α), du granzyme-B et qu'elles possèdent une capacité cytotoxique contre des cellules infectées par HHV-6B [134]. Cependant, aucun des clones T CD8+ capables de lyser des cellules infectées par HHV-6B n'a eu la capacité d'éliminer des cellules infectées par HHV-6A, ceci pouvant s'expliquer soit par des différences inter-espèces ou bien par des mécanismes immunomodulateurs différents entre les deux espèces virales.

HHV6B antigen	Peptide sequence	HLA restriction
U90	VEESIKEIL (39-47)	B40(60)
	FESLLFPEL (57-65)	B40(60)
U14	TEMMDARL (602-610)	B40(60)

Tableau 1.2 Liste et séquences des peptides immunodominants identifiés restreints pour l'allèle HLA-B*40. Tirée de [134]

1.3 HHV-6 et évation immunitaire

HHV-6A et HHV-6B possèdent un tropisme cellulaire principal pour les cellules immunitaires, en particulier les lymphocytes T CD4+ qui jouent un rôle central dans la réponse aux Ag microbiens [4]. L'infection productive des cellules T CD4+ va perpétrer des effets cytopathiques qui vont conduire à la destruction de la cellule. Cependant, HHV-6 peut également causer des altérations phénotypiques et fonctionnelles lorsqu'il rentre dans une phase de latence ou bien indirectement après avoir provoqué un profil de cytokines environnant aberrant. Ces données expérimentales ont été validées par des rapports cliniques chez des patients où une immunosuppression a été observée en présence seulement de HHV-6 sans autre co-infection. Les interactions entre HHV-6 et le système immunitaire ont été bien caractérisées dans des études *in-vitro* et *ex-vivo* alors que les études *in-vivo* sont toujours très limitées dû au manque de modèle animal favorable à l'infection par HHV-6. Plusieurs études ont permis de caractériser les différents mécanismes d'actions d'HHV-6 permettant de moduler le système immunitaire à son avantage selon

les types cellulaires infectés. Enfin, comme tous les virus herpétiques, HHV-6A et HHV-6B ont développé un mécanisme de latence permettant d'échapper au système immunitaire via une forme épisomale exprimant de manière minimale les protéines virales ou bien sous la forme intégrée CIHHV-6, qui va jusqu'à rester cachée dans la cellule de l'hôte sans aucune expression protéique avant une possible stimulation via des facteurs cellulaires.

1.3.1 Mécanismes d'immunomodulation par HHV-6

La modulation de la réponse immunitaire de l'hôte infecté est un mécanisme récurrent et important développé par les virus afin de créer un environnement favorable à leur persistance ou prolifération. Les virus herpétiques et plus particulièrement HHV-6 sont des pathogènes qui possèdent un large éventail de processus qui va leur permettre de persister au sein de leur hôte durant toute la vie de ce dernier.

1.3.1.1 Modulation des différents types cellulaires infectés

De par leur tropisme ubiquitaire, HHV-6A et HHV-6B vont infecter plusieurs types cellulaires impliqués dans différents mécanismes de défense de l'hôte et vont moduler leurs actions afin de tirer un avantage favorisant ainsi leur persistance. Ils vont agir à la fois sur la réponse humorale et sur la réponse cellulaire adaptative. Il a été démontré *in vitro* que malgré que les deux espèces de HHV-6 infectent différents types cellulaires, ils ne vont établir leur cycle productif que dans les lymphocytes T CD4+ activés. Ces cellules T CD4+ sont les principales cibles des deux virus HHV-6A et HHV-6B qui ont des effets cytopathiques similaires à ceux du VIH, qui suggérerait que HHV-6 pourrait être une cause directe d'immunosuppression [3,4]. Bien que les deux espèces virales infectent les lymphocytes CD4+, il y a des différences notoires dans leur tropisme comme par exemple HHV-6A qui est capable de se répliquer dans des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (LTC) [86,148], les cellules NK [116] et des lymphocytes gamma-delta (Lgd) [149]. Du fait que ces différents types cellulaires sont impliqués dans les défenses antivirales, HHV-6A va déréguler les mécanismes pour contrer l'immunité de l'hôte.

Un rôle controversé des cellules phagocytaires agissant comme réservoir viral suite à l'infection de HHV-6A et HHV-6B a été suggéré [55,150,151]. Une étude a conclu qu'il y avait une absence d'expression des ARN messagers (ARNm) des protéines U16/17, U60/61 et U89/90 et n'a pas observé d'effets cytopathiques dans les monocytes/macrophages, suggérant que HHV-6

établissait une infection latente dans ces cellules [152]. Des transcrits de HHV-6 associés à la latence originare du locus IE-A (IE1/IE2) ont été identifiés dans des macrophages *in-vitro* et *in-vivo* [18]. Il y a également les cellules dendritiques qui ont été identifiées comme étant propice à une infection à HHV-6 même si il existe une controverse sur la capacité des virus à se répliquer [153,154].

Alors que les cellules T peuvent être infectées par HHV-6 sans aucune condition particulière, les lymphocytes B semblent être permissifs à une infection si ils ont été infectés par EBV au préalable [155]. Ceci suggère qu'une infection des cellules B par EBV activerait l'expression de récepteurs à la surface cellulaire permettant ainsi l'adhésion et l'infection de ces cellules par HHV-6. Malgré tout, une étude avait relevé le fait qu'une infection non productive de HHV-6 en l'absence d'EBV avait été observée dans des cellules de lymphome de Burkitt [156]. Les cellules progénitrices de la moelle osseuse CD34+ sont également susceptibles à l'infection par HHV-6. Ces cellules peuvent abriter un virus latent qui peut ensuite se retrouver à l'intérieur de cellules différenciées, incluant les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques [96,157]. Malgré tout, les cellules progénitrices infectées subissent une inhibition de leur maturation et de leur prolifération [158]. Ces observations sont compatibles avec ce qui a été caractérisé chez des patients ayant subi des greffes de moelle osseuse avec des cellules progénitrices CD34+ infectées par HHV-6 qui ont abouti à des défaillances graves post-greffe [94].

1.3.1.2 Modulation médiée par l'engagement du récepteur CD46

CD46 a été identifié en 1999 comme le principal récepteur pour HHV-6A et HHV-6B [31]. Des études menées par la suite ont permis d'identifier la région de la liaison de HHV-6 au CD46 sur deux domaines avec des séquences répétées SCR-2 et SCR-3 [159]. Pour finir, la glycoprotéine virale associée à cette liaison a été caractérisée comme étant gH [160]. Il existe tout de même une controverse sur la capacité de HHV-6B à se lier au CD46 car certaines souches de cette espèce n'en sont pas capables [161]. Il semblerait que ce soit le récepteur CD134 qui remplisse ce rôle [32]. C'est cette différence qui expliquerait par exemple le fait que HHV-6B ne soit pas capable d'infecter la lignée cellulaire HSB-2 permissive à HHV-6A [5]. CD46 est exprimé à la surface de toutes les cellules humaines nucléées qui ont pour l'instant été étudiées, expliquant en partie l'ubiquité du tropisme de HHV-6 et certaines pathologies associées [162]. Également, CD46 est la cible d'un autre virus, le virus de la rougeole, notamment pour les souches vaccinales [163]. De par sa

signalisation, le CD46 forme un pont entre l'immunité innée et adaptative dont HHV-6 va se servir afin de détourner les effets.

Par exemple, au niveau des macrophages, en engageant CD46 lors de sa fixation, HHV-6 va supprimer l'expression de l'IL-12 qui est une cytokine essentielle pour la génération de lymphocytes T helpers de type 1 (Th1) qui, à leur tour, produisent de l'IL-12 et de l'IFN- γ nécessaires à la prolifération des cellules T CD8⁺ cytotoxiques [152]. Cette inhibition de l'expression de l'IL-12 supprime indirectement d'autres mécanismes, en réduisant l'expression CMH-I, du HLA-DR, de CD40 et de CD80 au niveau des cellules dendritiques mais également en supprimant le potentiel prolifératif des cellules T allogéniques [154]. HHV-6 va également inhiber l'activation du complément suite à l'activation de la signalisation du CD46 qui joue un rôle essentiel dans la prévention de l'activation spontanée de C3b et C4b [33]. Enfin, l'engagement de CD46 pourrait déréguler la signalisation du récepteur CD3 spécifique aux lymphocytes T. Lors d'une co-stimulation de CD3 et CD46, il a été observé que cela induisait la différenciation des cellules T CD4⁺ en une population spécifique Tr1 productrice de la cytokine anti-inflammatoire IL-10, qui est sécrétée très rapidement suivant l'infection par HHV-6, permettant ainsi au virus de mettre en place un environnement propice [164].

1.3.1.3 Modulation médiée par l'altération de l'expression des récepteurs cellulaires

HHV-6A et HHV-6B altèrent l'expression de récepteurs de surface cellulaires primordiaux pour la réponse immunitaire. En plus de perdre le CD46 à la surface des cellules T CD4⁺, il a également été documenté la perte du complexe récepteur des cellules T (TCR)/ CD3 qui joue un rôle majeur dans la reconnaissance d'antigènes microbiens présents à la surface de cellules infectées et l'activation des lymphocytes T devant détruire la cellule infectée ou induire l'activation de la réponse immune [148]. Une autre altération phénotypique touchant les lymphocytes T infectés est l'activation du promoteur responsable de l'expression de CD4 [43]. Une forte proportion de cellules coexprimant CD8 et CD4 ont mis ce mécanisme en lumière, ceci jouant un rôle notamment dans le cas de co-infection HHV-6 et VIH en rendant permissive des cellules à l'infection par le VIH [86]. Des observations similaires ont été faites sur les cellules NK et les Lgd [149,165]. Egalement, HHV-6 a été associé à la diminution de la transcription du récepteur Lectin-like DC-SIGN dans les cellules dendritiques immatures infectées [166]. Une réduction de l'expression de DC-SIGN affecte le pouvoir des cellules dendritiques d'initier et de soutenir des réponses immunitaires spécifiques. L'infection par HHV-6 des cellules dendritiques provoque notamment une diminution du pouvoir de présentation antigénique et de stimulation des cellules T allogéniques. Une autre étude menée par

Janelle et al a démontré que l'infection des monocytes primaires humains mène d'une part à l'inhibition de l'apoptose, et d'une autre part à la réduction de la présence à la surface des cellules de trois molécules importantes pour l'activation fonctionnelle de la présentation antigénique, CD14, CD64 (FcγRI) et HLA-DR [167].

1.3.1.4 Modulation médiée par l'expression de chimiokines homologues ou récepteurs homologues viraux

Un autre mécanisme par lequel HHV-6 module le système immunitaire de l'hôte est l'expression de chimiokines et de récepteurs de chimiokines homologues viraux. Les virus HHV-6A et HHV-6B expriment deux chimiokines virales, U22 et U83, ainsi que deux récepteurs de chimiokines U12 et U51 [168,169,170,171]. La protéine U83B exprimée par HHV-6B va agir en tant qu'agoniste de CCL2, qui va alors exercer son effet chimio-attracteur pour les monocytes et ainsi permettre aux virus d'infecter ces cellules pour y établir la latence virale [172]. La protéine U83A exprimée par HHV-6A va quant à elle agir comme un agoniste de plusieurs récepteurs de chimiokines comme CCR1, CCR4, CCR5, CCR6 et CCR8, qui sont exprimés à la surface des monocytes/macrophages, des cellules dendritiques et des cellules T [16]. Les protéines U12 et U51 codent pour deux récepteurs couplés aux protéines G homologues: U12 est exprimée durant la phase tardive de l'infection par HHV-6 et va être un récepteur fonctionnel pour associé à CCR1, CCR3 et CCR5 qui peut être activé par RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β et MCP-1. Dans les cellules épithéliales, U51 va provoquer une diminution de la transcription de RANTES et donc diminuer la prolifération et l'activation des cellules T [171]. D'autres rôles ont été suggérés pour U51 qui peut agir comme régulateur de la réplication virale *in vitro*, où il a été observé qu'une inhibition de l'expression du gène *U51* était associée à une réplication virale très réduite, mais pouvait favoriser la fusion des membranes cellulaires et la transmission du virus via un transfert cellule-cellule [173].

1.3.1.5 Modulation médiée par l'altération de l'expression de cytokines et des chimiokines

Ces mécanismes représentent un grand pas dans l'immunomodulation du système immunitaire de l'hôte par HHV-6. Des travaux menés par Jaworska et al ont démontré que le virus pouvait s'attaquer aux premières défenses de l'immunité innée en inhibant l'expression du gène de l'*IFN- β* ainsi que les gènes stimulés par l'IFN (ISG) par HHV6-B et plus particulièrement la protéine IE1B alors que HHV-6A a des effets limités [45,46]. Les mécanismes d'actions de IE1B ont été décrits dans les deux cas avec l'inhibition de la translocation nucléaire du facteur régulateur de l'interféron-3 (IRF3) empêchant ainsi la fixation au promoteur du gène de l'*IFN- β* et la

séquestration nucléaire de STAT2 qui ne permettra pas de former le complexe ISGF3 et donc d'activer le promoteur des éléments de réponse stimulés par l'IFN (ISRE) et l'expression des ISG.

Les mesures de la sécrétion de cytokines et chimiokines *ex-vivo* à partir de tissus lymphoïdes et de cultures des cellules endothéliales primaires humaines infectées par HHV-6 ont montré une augmentation de la production de RANTES [174,175]. Également, deux études ont conclu à deux résultats opposés quant à la production de l'IL-10, Arena et al ont observé que HHV-6 induisait un changement du profil cytokinique de Th1 à Th2 en diminuant la production de cytokine pro-inflammatoires IL-12 et IFN- γ tout en augmentant celle de l'IL-10 qui a une action anti-inflammatoire [176]. Mayne et al ont eux montré que l'infection de lignées cellulaires T provoquait la diminution de l'expression de l'IL-10, du récepteur à l'IL-10 (IL-10R) et de l'IL-14 [177]. Mais il a également été rapporté que HHV-6 pouvait activer la production de cytokines inflammatoires telles que l'IFN- α , le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-8 et l'IL-15 [114,178,179,180]. Ce mécanisme pourrait permettre la prolifération cellulaire et ainsi proposer plus de cibles pour l'infection de néovirus.

Finalement, Flamand et al ont étudié l'impact de HHV-6 sur la production de l'IL-2 qui est un élément central dans réponse immunitaire protectrice et qui va réguler une multitude de mécanismes. Cette étude a permis de démontrer que lors d'une infection des cellules T par HHV-6, il y avait une diminution des niveaux d'IL-2 synthétisés et relargués. De plus, les résultats ont été confirmés par une étude fonctionnelle de l'IL-2 démontrant une diminution de la prolifération des cellules T après infection par HHV-6. Une caractéristique de cette étude a permis de mettre en lumière la possible implication des protéines virales de structure dans ce rôle d'inhibition de la production de l'IL-2 lorsque les résultats obtenus se sont répétés en infectant des cellules T avec des souches virales irradiées aux UV ne pouvant pas induire de cycle productif [119].

1.4 Interleukine-2

1.4.1 Découverte

L'interleukine-2 a été découverte en 1976 par Doris Morgan et collaborateurs comme un activateur de la prolifération des lymphocytes T dérivés de la moelle osseuse, et a été une des premières cytokines à être caractérisée au niveau moléculaire [181]. Des expériences ont ensuite montré que c'était un facteur soluble dont l'effet diminuait dans le temps, démontrant aussi l'existence de récepteurs spécifiques médiant l'internalisation de l'IL-2. Parce que l'IL-2 exerce des effets pleiotropiques sur un grand nombre de cellules cibles, beaucoup d'activités exercées ont été décrites et nommées avant l'isolation et le possible clonage du gène. Le gène de l'IL-2 a été cloné

en 1983 et sa structure cristalline a été caractérisée en 1992 [182,183,184,185]. L'IL-2 est une glycoprotéine monomérique sécrétée ayant un poids moléculaire de 15 kilodaltons (kDa).

1.4.2 Activités et rôle physiologique de l'IL-2

L'IL-2 est une molécule cruciale pour le maintien de l'homéostasie immunitaire et va exercer ses effets sur de nombreux types cellulaires dont les lymphocytes T. En effet, une des conséquences les plus rapides de l'activation des cellules T par l'engagement du TCR est la néosynthèse d'IL-2. Ce phénomène est suivi par l'expression du récepteur IL-2R spécifique à haute affinité qui va permettre une expansion rapide et sélective des cellules T activées par l'Ag [186]. Une des fonctions majeures de l'IL-2 est de promouvoir la prolifération des cellules T CD4+ et T CD8+ cytotoxiques [187]. Cette expansion va se faire via des signaux de prolifération à travers les facteurs proto-oncogènes c-myc et c-fos en combinaison avec des signaux anti-apoptotiques par les membres de la famille Bcl-2 [188]. Il a été également démontré que l'IL-2 exerce des effets sur le métabolisme et la glycolyse nécessaires à la survie des cellules T [189,190]. L'IL-2 va aussi avoir un rôle dans l'induction de la réponse cytotoxique des cellules Th1 en favorisant la synthèse de granzyme B et de perforine mais aussi en promouvant la réponse Th2 [191,192]. Paradoxalement, des études sur des souris knock-out (KO) pour l'IL-2 ont révélé que l'IL-2 joue un rôle prépondérant dans la diminution de la réponse immunitaire afin de prévenir l'autoimmunité [193,194,195,196]. Ces effets inhibiteurs de l'IL-2 créent une boucle négative d'autorégulation mise en place par plusieurs mécanismes.

Tout d'abord, la production d'IL-2 est transitoire et va ralentir puis diminuer en absence de stimulation antigénique pour aboutir à la mort de la cellule dû à l'absence de cytokine dans son microenvironnement. Deuxièmement, l'IL-2 initie une signalisation pro-apoptotique par l'activation de l'expression de FasL sur les cellules T activées [197,198]. De par le fait que les cellules T expriment aussi Fas/CD95, ces événements vont aboutir à la mort de la cellule T activée [199]. Des souris IL-2 -/- montrent un phénotype d'autoimmunité similaire à celui des souris Fas -/- et FasL -/-. L'IL-2 a également été identifiée comme jouant un rôle durant le développement thymique pour prévenir l'autoimmunité en favorisant le développement de cellules T CD4+ CD25+ régulatrices (Treg) qui vont avoir des effets anti-inflammatoires après activation [200,201,202]. En plus des effets sur les cellules T, l'IL-2 est aussi un facteur de croissance pour les cellules NK avec une autre cytokine de la famille de l'IL-2, l'IL-15 [203,204]. Cet effet de l'IL-2 sur les cellules NK va favoriser la production des cytokines TNF- α , IFN- γ et GM-CSF. De plus, l'IL-2 va agir en synergie avec l'IL-12 afin de favoriser l'activité cytotoxique des cellules NK [205].

Des fonctions pour l'IL-2 ont aussi été associées aux lymphocytes B en les activant et en promouvant la sécrétion des anticorps [206]. Au niveau des cellules B exprimant des IgM, l'IL-2 va augmenter l'expression des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines (Ig) en association avec l'IL-5, et favoriser l'oligomérisation des pentamères d'IgM [207,208].

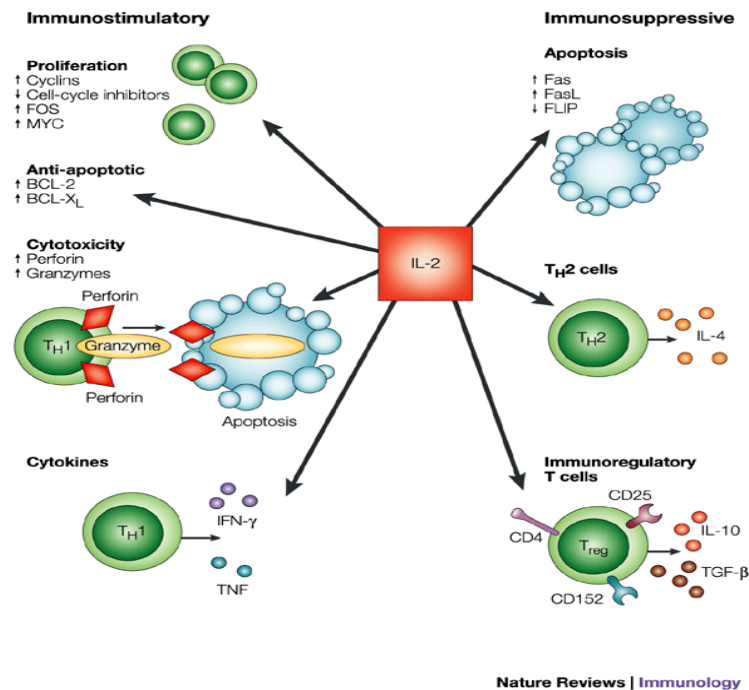


Figure 1.7 Schéma récapitulatif des cibles et des effets physiologiques de l'IL-2 sur les cellules du système immunitaire. Tirée de [209]

1.4.3 Le récepteur de l'IL-2

L'IL-2R est un complexe multipartite dont les caractéristiques fonctionnelles ont été étudiées intensément. Les premières études ont révélé l'existence de trois classes de complexes de liaison pour trois classes d'affinités pour le ligand : faible, intermédiaire et haute [210]. On a également identifié les trois sous-unités qui le composent. L'IL2-R α (ou CD25 C ou Tac) qui constitue le récepteur à faible affinité pour l'IL-2 similaire au complexe IL-15R α [211]. Alors que sous-unité IL-2R α augmente l'affinité de l'IL-2R à peu près 100 fois, il ne contribue d'aucune manière à la transduction du signal. A l'inverse, les sous-unités IL-2R β (p75) et IL-2R γ (gc ou p65) sont nécessaires et suffisantes pour induire la signalisation associée à l'IL-2R [211,212]. Seules, chacune deux sous-unités β et γ ne lient pas l'IL-2 de manière détectable, mais le complexe IL-

IL-2Rβ/γ s'établit comme le complexe IL-2R médiant l'affinité intermédiaire et le spectre complet de l'activité de l'IL-2 si elle est en quantité suffisante[211].

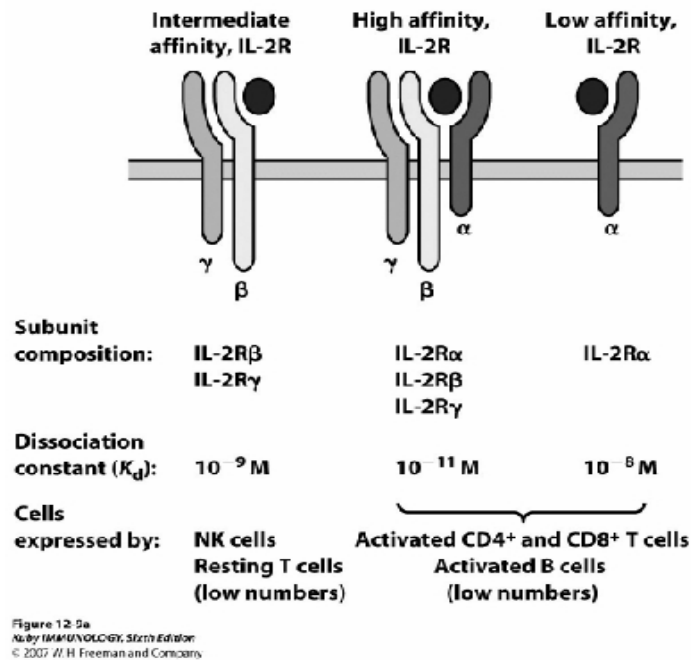


Figure 1.8 Représentatif schématique des IL-2R en fonction de leur expression cellulaire et de leur affinité à lier l'IL-2. Tirée de Kuby IMMUNOLOGY, Sixth edition

Une caractéristique frappante de l'IL-2R est qu'il partage certaines de ses sous-unités avec d'autres récepteurs de cytokines, notamment les récepteurs de cytokines appartenant à la famille de l'IL-2 [213]. Alors que l'IL-2Rα est utilisé uniquement par l'IL-2R, l'IL-2Rβ forme une partie essentielle du récepteur trimérique de l'IL-15 [213]. De plus, la sous unité IL-2Rγ est également partie intégrante des récepteurs de l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9, l'IL-15 et de l'IL-21 [213]. Des mutations au niveau du gène humain *IL-2Rγ* peuvent causer des syndromes d'immunodéficience dus à une perte de l'activité des récepteurs pour les cytokines, en particulier pour l'IL-7 et l'IL-15 [214,215]. Il est important de souligner qu'étant donné que l'IL-15R utilise les deux sous-unités IL-2Rβ et IL-2Rγ, l'IL-15 va activer de très similaires ou mêmes identiques voies de signalisation que l'IL-2 dans ses cellules cibles [204,216,217]. Enfin, malgré le partage des sous-unités de l'IL-2R, les autres récepteurs, des études utilisant des KO pour chacun des récepteurs ont mis en lumière des fonctions uniques à chacune des cytokines de la famille de l'IL-2 [211].

1.4.4 Mécanismes généraux de l'expression du gène de l'IL-2

Le déclenchement primaire de la synthèse d'IL-2 *de novo*, à la fois dans les thymocytes et dans les cellules T CD4⁺ et CD8⁺, est provoqué par une interaction directe d'un antigène présent dans la poche peptidique du CMH à la surface d'une APC avec le complexe TCR/CD3 de la cellule T [218]. Un stimulus secondaire est délivré par des signaux de costimulations qui engagent les molécules B7.1/B7.2 présentes à la surface des APCs après leur liaison au CD28 présent à la surface des lymphocytes T. Ce signal secondaire est essentiel pour l'induction d'IL-2, lorsqu'il n'y a pas de signaux de costimulation, l'engagement du TCR ne permet pas une réponse productive des cellules T provoquant un état d'anergie [219]. Cependant, l'intensité et la durée de l'interaction du TCR est importante pour induire l'expression d'IL-2, une étude ayant démontré que plus l'intensité de la liaison du TCR est maximisée, moins les signaux de costimulation sont requis [220]. A l'inverse, une forte costimulation peut compenser un engagement faible du TCR et engendrer une production d'IL-2 [220].

Également, des recherches sur la cinétique d'activation et l'expression génique des cellules T ont démontré qu'en plus d'une induction provoquée par des Ag, la voie de signalisation TCR/CD28 pouvait être activée par des mitogènes (PHA) et des agents pharmacologiques tels que des phorbol esters (TPA), des ionophores calciques (ionomycine) ou des lectines (concanavaleine-A) et favoriser la production d'IL-2 indépendamment de l'engagement du TCR [221,222]. En plus, il y a également des anticorps spécifiques reconnaissant le TCR, le CD3 ou le CD28 qui peuvent mimer l'activation des cellules T [223,224].

Tous ces outils sont utilisés en recherche médicale afin d'étudier la transcription du gène de l'IL-2 en fonction des différentes voies de signalisations qui peuvent être induites. Au niveau transcriptionnel, le cosignal dépendant du CD28 va favoriser l'accumulation nucléaire d'un bon nombre de facteurs de transcription impliqués dans la synthèse et l'allongement de la demi-vie de l'ARNm codant pour l'IL-2 [219,225,226,227]. En général, CD28 est répertorié comme amplifiant la réponse du TCR, mais il a également été démontré que CD28 peut délivrer un signal unique à la cellule indépendant du TCR [228]. CD28 a été caractérisé comme élément majeur de costimulation, mais il existe d'autres molécules à la surface cellulaire induisant des signaux de costimulation tels que CD4, ICAM-1, CD2, CD43, CD69, IL-1, CD5 et CD9 [227,229,230]. Par exemple, la stimulation combinée du CD28 et du CD2 induit une grande expression nucléaire de NF- κ B qui va favoriser l'expression de l'IL-2 et de IL-2R α [231].

Suite à l'engagement du complexe TCR/molécules de costimulation à la surface des cellules

T, des signaux sous-jacents vont favoriser une cascade de signalisation aboutissant à l'expression de l'IL-2 dans le noyau. Cette cascade est engagée par des protéines tyrosine kinases (ZAP-70, SYK, SRC et TEC) qui sont recrutées au niveau des récepteurs transmembranaires (CD3, CD4 et CD28) qui vont phosphoryler les protéines adaptatrices (LAT, SLP-76 et Grb2), les facteurs d'échanges GTP/GDP (Vav, Sos) et PLC γ 1 [232]. Suivant ces mécanismes, des molécules de signalisations intermédiaires, telles que les petites GTPases Ras et Rac, et les messagers secondaires, tels que le diacylglycerol (DAG) et l'inositol triphosphate (IP3), activent les protéines kinases majeures: MEKK1, PKC, IKK et PKA qui vont activer les voies de signalisations qui mèneront à l'induction des facteurs de transcription [233]. Les voies de signalisations des MAPK et Jun kinase (JNK) aboutissent à l'activation de complexes AP-1 formés par cJun et c-Fos et activent le relargage du calcium (Ca²⁺).

L'augmentation du niveau de Ca²⁺ intracellulaire va favoriser l'activation de la calcineurine (CaN) et de la PKC. La CaN va à son tour activer la voie dépendante des facteurs de transcription des cellules T activées (NFAT) alors que la PKC va activer la voie des IKK en ciblant les complexes I κ B et relarguer des dimères NF- κ B actifs [232,234,235]. Au final, les trois classes majeures de facteurs de transcription, AP-1, NFAT et NF- κ B, médiées par les voies de signalisations dépendantes du TCR/CD28, vont transloquer dans le noyau, s'attacher à l'ADN à des éléments spécifiques du promoteur proximal du gène de l'IL-2 et vont induire sa transcription [236]. Une étude préalable menée par Flamand et al a démontré que HHV-6 est capable d'inhiber la synthèse d'IL-2 dans des lymphocytes T CD4⁺ infectés par le virus et dont l'action de répression pourrait se faire sur cette voie CaN/NFAT [119].

Le mécanisme qui aboutit à l'inhibition de la transcription du gène de l'IL-2 n'est pour le moment pas bien caractérisé mais représente un aspect critique dans le contrôle de l'expression transitoire de l'IL-2. Les facteurs Zfx1 α et CREM se lient au promoteur minimal de l'IL-2 et inhibent la transcription du gène mais le mécanisme d'action n'est pas connu [237,238,239,240]. Le facteur T-bet a été identifié comme impliqué dans la répression de la production d'IL-2 en interagissant avec Rel-A au niveau de la région proximale du promoteur IL-2 [241]. Une boucle d'autorégulation a été décrite dans laquelle l'IL-2 inhibe sa propre production par un rétrocontrôle négatif. Cette boucle dépend de l'activation du facteur STAT5 et de la protéine répressive de la maturation des lymphocytes B dépendantes de l'IL-2-1 (Blimp1) [242,243]. Suite à l'activation d'une cellule T naïve par la reconnaissance d'un Ag, l'IL-2 est produite avec l'IL-2R qui va alors permettre la fixation de l'IL-2 sécrétée à la surface cellulaire.

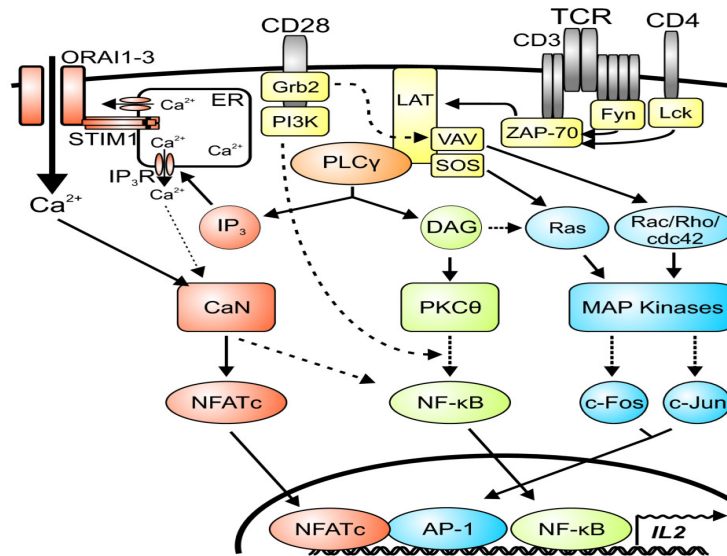


Figure 1.9 Schéma représentant la signalisation générale de l'engagement du TCR à l'expression du gène de l'IL-2. [244]

Cette fixation de l'IL-2 va mener à l'activation de STAT5 et l'induction de Blimp-1 qui vont agir en réprimant la transcription du gène de l'IL-2. De plus, l'impact de Blimp-1 en tant que répresseur a été démontré dans une étude qui a prouvé que dans des cellules déficientes en Blimp-1, l'IL-2 était surexprimée et pouvait jusqu'à provoquer une inflammation sévère [242,243]. Cela démontre que l'IL-2 pourrait être un facteur impliqué dans l'autoimmunité lorsque son expression est dérégulée.

1.5 Voie de signalisation Calcineurine/NFAT

La fonction primordiale pour l'activation des protéines NFAT est leur régulation par le Ca^{2+} et la CaN sérine phosphatase Ca^{2+} /Calmoduline dépendante. Les protéines NFAT sont phosphorylées et résident dans le cytoplasme dans les cellules inactivées. Suite à un stimulus, elles sont déphosphorylées par la CaN, transloquent dans le noyau et vont devenir transcriptionnellement actives pour induire l'expression des gènes. L'activité de NFAT est ensuite modulée par des facteurs additionnels induits par d'autres voies de signalisation en affectant directement les

protéines ou bien leurs partenaires nucléaires. Nos travaux semblent indiquer que HHV-6 peut interagir avec cette voie et inhiber son action.

1.5.1 Le Ca^{2+} et l'activité de la Calcineurine

L'activité Ca^{2+} dépendante des NFAT se fait par des récepteurs couplés à des facteurs d'entrée du Ca^{2+} à la surface cellulaire. L'importance de ce processus a été identifiée à partir de patients souffrant d'une forme héréditaire rare d'immunodéficience combinée dans lesquels les lymphocytes T avaient des déficiences de synthèse de cytokines ainsi que des incapacités sélectives à activer NFAT alors que celles de NF- κ B et AP-1 restaient normales [245,246,247]. Cette inactivation de NFAT résidait dans la réduction des niveaux de Ca^{2+} intracellulaire. La CaN va ensuite activer NFAT en déphosphorylant le domaine de régulation de NFAT, une région conservée de 300 aa située en N-ter du site de liaison à l'ADN. Ce domaine est codé dans un seul exon pour les quatre protéines NFAT Ca^{2+} dépendantes [248]. Ce domaine est hautement phosphorylé dans les cellules inactivées sur les résidus sérine dispersés sur quatre séquences riches en motifs sérines : SRR-1, SRR-2, séquences répétées SPxx, et les motifs KTS [249,250]. La CaN déphosphoryle trois des quatre types de motifs, favorisant ainsi l'accumulation intranucléaire et augmentant l'affinité des NFAT pour ses sites de liaisons à l'ADN [249,251]. Ce n'est pas encore formellement connu si la déphosphorylation de NFAT est ordonnée, mais des études de spectrométrie de masse suggèrent que la région SRR-1, qui est immédiatement adjacente au site de liaison à la CaN sur NFAT (PxIxIT, voir plus loin) est préférentiellement déphosphorylé à basse activité pour la CaN [249]. Également, des mutants de substitution de NFAT (P, I ou T remplacé par A) sont moins susceptibles à la déphosphorylation que le NFAT sauvage [252,253].

Pour une déphosphorylation efficace de NFAT, il faut un amarrage entre la CaN et NFAT [253,254,255]. Le site majeur de liaison à la CaN se situe à la partie N-ter du domaine de régulation de NFAT sur une séquence consensus PxIxIT (SPRIEIT pour NFAT1). Chaque protéine NFAT possède une séquence PxIxIT ayant une faible affinité pour la calcineurine ($K_d = 10\text{-}30 \mu\text{M}$) nécessaire au maintien de la sensibilité des signaux environnementaux et prévient d'une activation constitutive de NFAT dans les cellules inactivées [249,250]. La surface d'interaction NFAT-CaN est plus étendue que le simple motif PxIxIT car un second site avec une séquence d'interaction a été identifié LxVP [256]. Cette séquence est modérément conservée entre les différentes protéines NFAT.

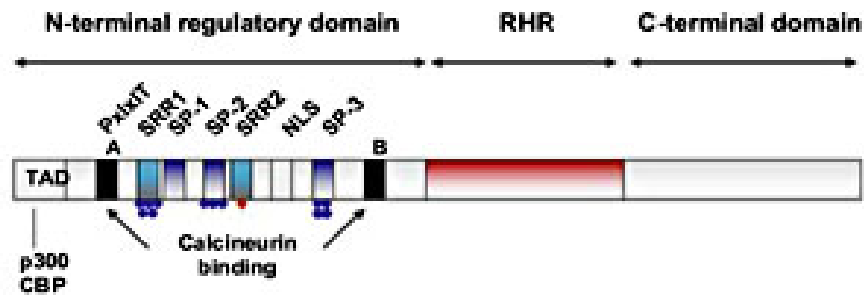


Figure 1.10 Représentation schématique des molécules NFAT avec leurs séquences riches en sérines (SRR1-2), leurs séquences répétées (SP-1-3), et les sites de liaison à la CaN (PxIxIT et B). Tirée de [257]

Dans des expériences de surexpression, CaN semble être présente dans les noyaux des cellules activées afin de maintenir la forme déphosphorylée de NFAT et sa localisation intranucléaire [258]. Quand l'entrée de Ca^{2+} est inhibée ou diminue et que par conséquent l'activité de CaN diminue, NFAT est rephosphorylée par les kinases et va quitter le noyau pour retourner dans le cytoplasme [236,259]. La signalisation Ca^{2+} /CaN peut être modulée de différentes manières. Dans les cellules T, TGF- β inhibe l'activité de la kinase Tec et l'influx du Ca^{2+} qui en dépend [260]. L'activité de CaN peut être contrôlée indépendamment du Ca^{2+} intracellulaire en modulant l'expression des inhibiteurs endogènes de la CaN DSCR/MCIP [261].

Au final, ce processus possède un rétrocontrôle négatif : CaN/NFAT va induire l'expression des inhibiteurs DSCR1/MCIP1 qui va permettre d'inhiber l'activité de la CaN et de rétablir des niveaux de NFAT phosphorylés inactivés basaux [261]. Il existe également des molécules pharmacologiques ou biologiques de différents organismes qui peuvent également abroger cette activité CaN/NFAT.

1.5.2 Les protéines NFAT chez l'homme

Chez l'homme, la famille NFAT comprend cinq protéines différentes: NFAT1 (NFATc2 ou NFATp), NFAT2 (NFATc1 ou NFATc), NFAT3 (NFATc4), NFAT4 (NFATc3 ou NFATx) et NFAT5 (TonEBP ou OREBP) [262]. Comme leur nom l'indique, ce sont des facteurs qui ont tout d'abord été caractérisés dans les cellules du système immunitaire, mais il est aujourd'hui établi que tous ces isoformes sont exprimés de manière ubiquitaire et dans énormément de types cellulaires.

De plus, chaque isoforme possède des variants épissés aux terminaisons N-Ter et C-ter [263,264,265]. Les isoformes NFAT1-4 dépendants du Ca^{2+} partagent tous deux domaines conservés: la région homologue Rel (RHR) de par sa similarité structurale au domaine de liaison que possèdent les facteurs de transcription de la famille Rel (NF- κ B) [266], ainsi que la région homologue des NFAT moins conservée (NHR). La protéine NFAT5 a une structure différente et un seul domaine RHR et ne possède pas de site de liaison à la CaN et n'est donc pas dépendante du Ca^{2+} [267]. Le domaine NHR contient la région transactivatrice des NFAT qui se lie aux éléments du promoteur et initie la transcription des gènes. Ce domaine NHR contient également de nombreux résidus sérine qui sont phosphorylés par diverses protéines kinases dans les cellules inactivées. L'état de phosphorylation de NFAT va moduler les différents transports du cytoplasme vers le noyau et vice-versa et donc réguler l'activité transcriptionnelle dans la cellule.

Les facteurs de transcription NFAT interagissent avec l'ADN de manière versatile. En effet, les protéines NFAT peuvent se lier à l'ADN comme des homo- ou hétérodimères et de manière commune, le domaine de liaison à l'ADN de NFAT pouvant coopérer avec des domaines de liaison à l'ADN d'autres facteurs de transcription pour mettre en place une liaison de très haute affinité [268]. L'exemple le plus commun et le mieux documenté est l'association du facteur de transcription AP-1, qui forme une structure quaternaire complexe avec NFAT et qui est le partenaire majeur requis par NFAT pour l'activation des cellules T [266,269]. Cependant, en plus de AP-1, NFAT coopère avec une quantité d'autres facteurs de transcription impliqués dans différents mécanismes de régulation incluant la différenciation cellulaire des ostéoclastes, le développement de la valve cardiaque ou encore différentes sortes de cancer.

1.5.3 Activation et régulation de NFAT dans les cellules T

L'activation de NFAT par la signalisation du calcium représente un des mécanismes les mieux caractérisés dont l'initiation se fait par un récepteur de surface, surtout dans les cellules du système immunitaire. Ce mécanisme est en fait limité par les taux de Ca^{2+} intracellulaire qui vont être initiés suite à l'activation du récepteur à la surface de la cellule et qui vont stimuler l'activation de la phospholipase C (PLC) [262]. Ce relargage de Ca^{2+} dans le cytoplasme de la cellule s'effectue au niveau du réticulum endoplasmique (ER) suite à l'effet de la PLC sur les IP3R puis va se poursuivre au niveau de la membrane plasmique par l'ouverture des canaux ioniques calciques (CRAC). En effet, le relargage de Ca^{2+} est géré par la molécule d'interaction stromale 1 du ER (STIM1) [270,271], ce qui va aboutir à un changement conformationnel de la protéine Orai1 [272,273] qui agit au niveau des canaux CRAC qui vont alors ouvrir les canaux et favoriser l'influx

calcique [274]. Le Ca^{2+} va alors se fixer à la calmoduline qui va à son tour activer la CaN phosphatase sérine/thréonine. La CaN va à son tour devenir le facteur limitant dans l'activation de NFAT.

Dans son état basal inactivé, NFAT est localisé au niveau du cytoplasme dans un état hyperphosphorylé. Il y a environ 20 sites de phosphorylation distincts qui ont été identifiés chez NFAT1, dont 18 situés dans la région régulatrice [249]. Ces sites sont retrouvés au niveau de séquences riches en sérine, les régions riches en sérines 1 et 2 (SRR-1 et SRR-2) et les motifs SPxx SP-1, SP-2 et SP-3 [262]. La déphosphorylation des motifs SP sur NFAT par la CaN vont exposer une séquence de localisation nucléaire et masquer la séquence d'export nucléaire, ce qui va aboutir à la translocation nucléaire médiée par une importine [275]. La CaN à l'intérieur du noyau va maintenir NFAT dans un état déphosphorylé et favoriser l'activité transcriptionnelle. L'export nucléaire de NFAT signifie la fin de l'activité transcriptionnelle. Les protéines NFAT vont alors être exportées du noyau vers le cytoplasme par l'action de plusieurs mécanismes incluant l'inhibition de l'activité de la CaN qui va promouvoir l'export. Ceci va alors favoriser l'action des kinases nucléaires qui vont rephosphoryler NFAT et provoquer sa relocalisation nucléaire via une exportine [275].

De nombreuses enzymes sérine/thréonine kinases ont été identifiées comme régulatrices de l'activité de NFAT, notamment pour maintenir la forme cytoplasmique de NFAT ou bien favoriser son export nucléaire. Les kinases favorisant l'export nucléaire comprennent la kinase synthase du glycogène (GSK-3) qui phosphoryle les motifs SP-2 et SP-3 des protéines NFAT1 et NFAT2, évènement qui requiert au préalable une phosphorylation de NFAT par la protéine kinase A (PKA) [276,277]. L'activité de GSK-3 est modulée par la phosphoinositide-3 kinase (PI3-K) et la signalisation Akt, qui sont entre autres également impliqués dans différents cancers [278]. La caséine kinase-1 (CK-1) fonctionne aussi bien dans la maintenance cytoplasmique de NFAT que lors de son export nucléaire en phosphorylant la région SRR-1 [252,279]. La voie des MAPK va agir en phosphorylant les régions SRR de NFAT2 et NFAT1 [280,281]. Plus récemment, une nouvelle classe de kinases agissant sur l'export et la maintenance de NFAT a été découverte. Il s'agit des kinases DYRK qui ont été caractérisées par utilisation de siRNA chez la drosophile et qui ont permis d'observer une modification de la localisation subcellulaire de NFAT [282]. Les kinases DYRK-1 et DYRK-2 phosphorylent NFAT sur le motif SP-3 et précèdent les phosphorylations des sites SP-2 et SRR-1 par CK-1 et GSK-3 [282,283]. La kinase DYRK-1 agit comme une kinase exportatrice alors que DYRK-2 va maintenir NFAT afin de le maintenir dans le cytoplasme.

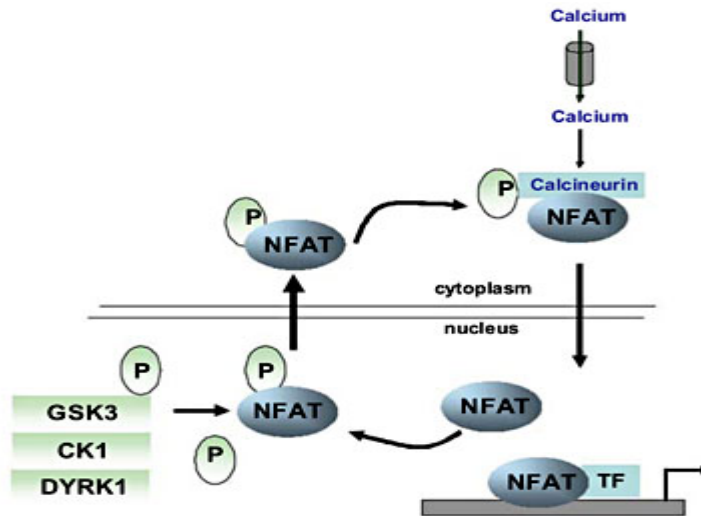


Figure 1.11 Schéma représentant les mécanismes impliqués dans la rephosphorylation de NFAT et de son inactivation via la relocalisation cytoplasmique. Tirée de [257]

Enfin, en plus de la phosphorylation, des modifications post-traductionnelles semblent également être responsables de la régulation et la fonction des membres de la famille NFAT. La sumoylation de NFAT1 et NFAT2 permet deux mécanismes distincts dans le trafic cytoplasme-noyau résultant dans la rétention des facteurs de transcription dans le noyau [284,285].

1.5.4 Régulation de l'expression génique par NFAT dans les cellules T activées

L'étude des fonctions des protéines NFAT dans le système immunitaire a le grand avantage que bons nombres de leurs cibles sont connues. Beaucoup de gènes ont été identifiés par des analyses individuelles à partir de cellules T, de cellules B, de cellules NK et de mastocytes activés via leurs récepteurs Fc [286,287]. D'autres ont été découverts dans des études utilisant des cellules dont un ou plusieurs membres des protéines NFAT étaient manquants. Les cellules T matures expriment deux protéines NFAT, NFAT1 et NFAT2, les cellules qui n'expriment aucune de ces deux protéines ne sont pas capable de synthétiser de cytokines suivant leur stimulation [288], prouvant par la même occasion que les protéines NFAT sont essentielles pour l'activité transcriptionnelle des gènes codant pour les cytokines. Enfin, d'autres gènes ont été caractérisés par analyses de puces à ADN qui ont permis de décrire le profil transcriptionnel des cellules T à partir d'individus sains ou de patients déficients pour l'entrée ou le relargage du Ca²⁺ dans la cellule. Ces recherches ont démontré que l'expression d'un grand nombre de gènes était dépendante de la

signalisation Ca^{2+} /CaN/NFAT [247]. Les protéines NFAT pourraient réprimer la transcription génique en recrutant des corépresseurs ou en agissant par synergie avec des répresseurs de la transcription de l'ADN. Il a d'ailleurs été suggéré que la transcription du gène *CDK4* peut être inhibée par le recrutement d'histone désacétylase [289].

Le profilage transcriptionnel des cellules T stimulées et différenciées a révélé deux classes de gènes cibles de NFAT, une contrôlée par NFAT associé à AP-1 et l'autre par NFAT sans AP-1 [290]. Ce complexe NFAT/AP-1 est formé suivant le relargage de Ca^{2+} et l'action des kinases PKC/MAP avant de réguler un large spectre de gènes suivant l'activation de la cellule pendant la réponse immunitaire. Au contraire, la signalisation Ca^{2+} sans l'effet de la signalisation PKC/MAP kinases va aboutir à l'activation de NFAT mais pas de AP-1, ne favorisant ainsi la transcription que d'un nombre réduit de gènes qui encodent des régulateurs négatifs de la réponse immunitaire [291]. De fait, les protéines NFAT vont ainsi permettre aussi bien la transcription de gènes favorisant la réponse immunitaire que la transcription de gènes codant pour la répression de l'immunité en fonction des partenaires associés. D'autres mécanismes ont été décrits et associés à différentes pathologies, notamment les cancers.

1.5.5 Implication de la voie CaN/NFAT dans les cancers

L'expression ubiquitaire des protéines NFAT dans les différents tissus de mammifères a été observée récemment, mettant en lumière l'implication de ces facteurs de transcription dans les cancers humains. Les différents isoformes de NFAT sont fonctionnels dans les cellules tumorales et dans les multiples compartiments du microenvironnement des tumeurs (fibroblastes, cellules endothéliales, cellules immunitaires infiltrantes). De multiples fonctions ont été associées à NFAT tels que la croissance cellulaire, la survie cellulaire, l'invasion et l'angiogénèse. Ces découvertes ont ouvert de nouvelles voies thérapeutiques pour les cancers.

1.5.5.1 Signalisation calcique dans les cancers

L'activation de NFAT dans les cancers va également être affectée par la signalisation calcique. La signalisation calcique agit sur la prolifération et la migration invasive des cellules tumorales. Au niveau des cellules immunitaires qui infiltrent l'environnement tumoral, la signalisation calcique contrôle la polarité des cellules et le remodelage du cytosquelette [292]. Une réduction de l'activité de Orai-1 et STIM-1 au niveau des canaux calciques CRAC dans le cancer du sein a démontré une diminution de la migration cellulaire *in vitro* et une réduction des métastases

chez les souris [293]. Le Ca^{2+} influence également la mort cellulaire par apoptose, nécrose ou autophagie. L'inhibition de la libération calcique affecte l'intégrité de la mitochondrie, ce qui va aboutir à la surcharge de calcium dans la mitochondrie et provoquer l'apoptose. Au contraire, les changements dans le flux calcique peuvent promouvoir la survie des cellules cancéreuses, par lesquels la phosphorylation des IP3R par la voie PI3K/Akt va résulter par la diminution du relarguage de calcium [294]. L'effet de NFAT dépendant du Ca^{2+} dans les différentes réponses cellulaires est également étudié au niveau tumoral.

1.5.5.2 Rôle de NFAT dans la transformation et la prolifération des cellules tumorales

Les premières études concernant l'implication de NFAT dans la prolifération cellulaire ont été effectuées à partir de fibroblastes et la surexpression de NFAT2 provoquait la transformation des cellules et la formation de colonies [295]. Ceci a également été démontré pour le cancer du pancréas, dans lequel de hauts niveaux de NFAT2 ont été observés [296]. Plus récemment, des rôles distincts pour NFAT1 et NFAT2 ont été révélés dans la tumorigénèse où NFAT1 agirait comme un suppresseur de tumeur alors que NFAT2 la favoriserait comme oncogène [297]. Dans des fibroblastes et des souris NFAT1^{-/-}, la surexpression de NFAT1 a induit l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose alors que NFAT2 augmente la prolifération et la transformation cellulaire [297]. Les protéines NFAT sont également impliquées dans l'induction et la progression de tumeurs hématologiques. Des formes actives de NFAT2 ont été caractérisées dans des cas de lymphome de Burkitt et des lymphomes agressifs touchant les cellules T [298,299]. Ces observations ont été appuyées par l'utilisation de d'inhibiteurs pharmacologiques de la voie NFAT/CaN qui ont démontré une diminution de la croissance et l'apoptose cellulaire chez des modèles leucémiques de souris [300].

1.5.5.3 Modulation de l'invasion cellulaire par NFAT au niveau épithélial

Des études récentes ont pointé un rôle important de NFAT pour moduler l'invasion et la migration cellulaire, notamment dans le du cancer du sein. L'expression de NFAT1 sous forme active provoque la migration et l'invasion de cellules tumorales de cancer du sein à travers du Matrigel *in vitro* [301]. Une grande fréquence de patients atteints de cancer du sein possèdent une mutation au niveau du gène codant pour la sous-unité catalytique de PI3-K [278]. En aval de PI3-K, la sérine/thréonine kinase Akt1 atténue l'activité de NFAT par un mécanisme qui dépend de l'ubiquitination de NFAT [302]. Ceci aboutit à la diminution de l'invasion de cellules tumorales de

cancer du sein suite à l'ubiquitination et la dégradation de NFAT qui ne peut plus favoriser le carcinome.

Le mécanisme par lequel NFAT joue le rôle de facteur de transcription pro-invasif de tumeurs s'effectue par l'induction de gènes spécifiques favorisant ce mécanisme. Les protéines NFAT induisent la transcription du gène de la *cyclooxygénase-2 (COX-2)* au niveau des cellules épithéliales de sein connu pour promouvoir l'invasion par migration [303]. La COX-2 catalyse la synthèse de prostaglandines notamment la prostaglandine E2 (PGE2). Les cellules de cancer du sein, lorsque traitées par des inhibiteurs de COX, ont une capacité amoindrie à l'invasion alors que l'inverse se produit lorsque traitées avec du PGE2 exogène [303]. Les protéines NFAT induisent également le gène de l'*autotaxine* au niveau des cellules épithéliales des seins. L'autotaxine est une protéine sécrétée qui va convertir le lyso-phosphatidylcholine (LPC) en acide lysophosphatidique (LPA). Le LPA est un mitogène pour le carcinome du sein [304]. L'autotaxine a été démontrée comme surexprimée dépendamment de NFAT au niveau des métastases mammaires [305]. Il a été prouvé qu'en utilisant des analogues de LPA qui vont jouer le rôle d'antagonistes pour l'autotaxine ou le récepteur du LPA (LPA), il y avait une réduction de la migration des cellules de cancer du sein. Egalement, des facteurs sécrétés qui sont relargués dans les tumeurs et le microenvironnement tumoral sont soupçonnés d'agir de manière paracrine, notamment la COX-2 et le PGE2, qui ont une grande influence sur la croissance des cellules endothéliales favorisant ainsi l'angiogénèse et donc la progression du cancer.

1.5.5.4 Modulation de l'invasion cellulaire par NFAT au niveau endothélial

Le rôle de la signalisation CaN/NFAT dans l'angiogénèse et le développement d'une vasculature a été caractérisé dans des souris NFAT3/4 KO [306]. L'angiogénèse est connue pour impliquer l'organisation des cellules endothéliales et le recrutement des cellules de muscles lisses vasculaires, impliquant donc la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire. La prolifération de cellules endothéliales pour l'angiogénèse nécessite l'effet du facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF) [307]. Comme la plupart des mitogènes, le VEGF stimule l'activation de PLC par stimulation via un récepteur qui va aboutir au relarguage de Ca^{2+} intracellulaire, l'activation de la CaN et la translocation nucléaire de NFAT [308]. Ceci aboutit à la transactivation de gènes essentiels pour l'angiogénèse tels que *COX-2* qui résultera en la synthèse de PGE2. La protéine COX-2 est une enzyme clé dans la dissémination des tumeurs, particulièrement dans le cancer du sein [309]. La fonction de NFAT dans l'angiogénèse tumorale a été caractérisée dans des modèles animaux dont l'activation de NFAT était dérégulée. Les cellules

endothéliales comprennent les vaisseaux lymphatiques qui sont responsables pour ramener les fluides interstitiels dans la circulation sanguine. Dans les tumeurs de seins, de poumons ou gastrointestinaux, les cellules migrent à travers les vaisseaux lymphatiques. Ce n'est pas encore clair si les tumeurs solides favorisent la lymphangiogénèse ou utilisent les vaisseaux pré-existant pour former des métastases. Dans ce contexte, NFAT2 a été caractérisé comme modulant la lymphangiogénèse, particulièrement la formation de valve suivant la formation des cellules endothéliales lymphatiques [310]. Dans ce mécanisme, la protéine NFAT2 agit en aval du VEGF en interagissant avec des facteurs promouvant des facteurs lymphangiogéniques [311,312].

1.5.5.5 NFAT dans l'expression de chimiokines et l'infiltration cellulaire

NFAT induit la transcription des chimiokines dans les cellules du système immunitaire [274]. Les chimiokines pro-inflammatoires agissent comme chimio-attractant pour les leucocytes, et favorisent la migration et le recrutement de monocytes et de neutrophiles au niveau de tissus atteints [313,314]. Des chimiokines comme CXCL12 et CCL21 et leurs récepteurs respectifs CXCR4 et CCR7 se retrouvent surexprimés sur les cellules de cancer du sein ce qui leur permet de migrer à travers les cellules épithéliales [315,316]. La signalisation de NFAT dans le microenvironnement tumoral a un impact significatif sur la signalisation des chimiokines. Des modèles murins de leucémie et de lymphome ont révélé une hyperactivation de NFAT par une action paracrine des chimiokines présentes dans le microenvironnement tumoral. Également, des macrophages infiltrant le microenvironnement tumoral sont directement associés avec les cellules tumorales et participent à la boucle de signalisation paracrine entre les cellules tumorales qui expriment le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) et les macrophages qui sécrètent l'EGF et le facteur stimulant les tumeurs-1 (CSF-1) [317]. Tout ceci aboutit dans la promotion de la migration des cellules tumorales.

1.6 Inhibiteurs sélectifs de la voie CaN/NFAT

La voie CaN/NFAT est un carrefour important dans bon nombre de processus cellulaires. Au fur et à mesure que cette voie a été étudiée et que des mécanismes se sont révélés dépendants de cette signalisation, beaucoup de molécules synthétiques ou biologiques ont été utilisées pour supprimer la synthèse de protéines impliquées dans des pathologies. Par exemple, la cyclosporine A (CsA) et le tacrolimus (FK506) ont révolutionné les transplantations en tant

qu'immunosuppresseurs pour diminuer les réactions immunitaires contre le greffon. Mais plus récemment, ces mêmes molécules ont démontré des effets bénéfiques lors de traitement dans des cancers ou autres pathologies dans lesquelles la voie CaN/NFAT est impliquée. Également, de nouvelles molécules ou protéines ont été découvertes pouvant agir à différents stades de cette voie de signalisation.

1.6.1 CsA et FK506: les inhibiteurs classiques

La CsA et le FK506 sont très largement utilisés comme immunosuppresseurs en transplantation ou en dermatologie clinique [318,319]. Les propriétés immunosuppressives de la CsA ont été découvertes en 1976 dans des modèles animaux [320]. En 1987, le FK506 a été décrit comme une solution alternative à la CsA [321]. En 1991, Liu et al. ont identifié la CaN comme cible commune de ces deux composés [322]. Ils ont démontré que les molécules actives étaient complexées aux immunophilines, montrant par la même occasion que la CsA et le FK506 ne sont pas immunosuppresseurs par eux mêmes. Les immunophilines appartiennent à la classe des isomérases peptidyl-prolyl *cis-trans* (PPIases) qui sont impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires [323,324]. La liaison de la CsA et du FK506 à la cyclophiline A (CypA) et à la protéine de liaison de la FK506 (FKBP12) respectivement inhibent leur activité PPIase. Les complexes CsA-PPIase ou FK506-PPIase sont des inhibiteurs non compétitifs de la CaN. Malgré tout, ils limitent grandement l'accès du substrat protéique au centre actif de la CaN [325], puis ils inhibent la déphosphorylation des cibles physiologiques de la CaN [326,327,328]. Cependant, l'action spécifique de la CsA ou du FK506 n'affectent en rien l'activité d'autres Ser/Thr phosphatases cellulaires.

Malgré le fait que la CsA et le FK506 partagent un mode d'action similaire, ils appartiennent à des classes chimiques différentes. Le CsA est un undecapeptide cyclique fongique [329] alors que le FK506 appartient à la classe chimique des macrolides [330,331].

L'application de CsA et FK506 inhibe l'activation, la prolifération et la différenciation des cellules T dépendantes de l'engagement du TCR. Les deux composés inhibent l'activation de NFAT et de p65/NF- κ B [332,333] malgré que la transcription des gènes dépendants de NF- κ B ne soit pas complètement bloquée car cette voie peut être activée indépendamment de la CaN [334]. D'autres processus cellulaires impliquant l'activité transcriptionnelle de CREB [335] ou la dégradation proteosomale des protéines [336,337] sont modulés par la CsA ou le FK506. L'utilisation de ces drogues en transplantation permet d'éviter les réactions inflammatoires délétères provoquées par les

cellules T mémoires alloréactives [338,339]. Cependant, leur utilisation est limitée car il faut tout de même éviter une réactivation de pathogènes latents due à une immunité du receveur trop faible, mais également par le fait qu'une néphrotoxicité ou une neurotoxicité peuvent se manifester à trop forte dose ou bien pendant un usage prolongé [340].

Afin d'essayer de contourner ces problèmes, de nouveaux facteurs plus spécifiques ou moins nocifs ont été caractérisés.

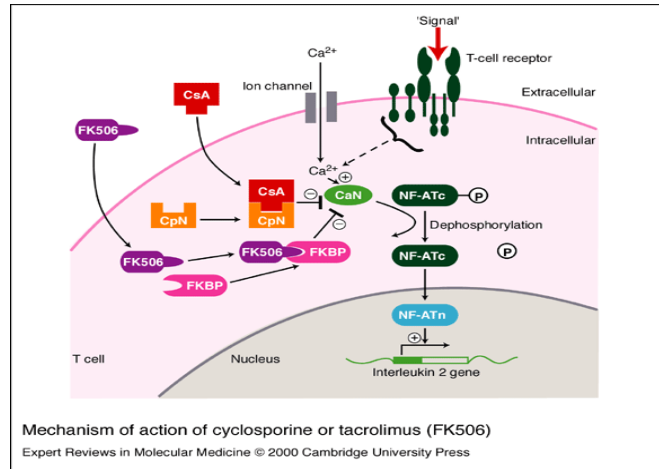


Figure 1.12 Représentation schématique de l'effet inhibiteur de la CsA et du FK506 sur la signalisation de la CaN et de l'IL-2. Tirée de [341].

1.6.2 Molécules dérivées de la CsA ou du FK506

Il a été relevé que les résidus 2-9 de la CsA sont responsables de la liaison avec la CypA, alors que les résidus 4-7 sont impliqués dans la liaison à la CaN. Des modifications sur la CsA au niveau des résidus en position 3, 6 ou 8 ont permis d'obtenir des dérivées de la CsA qui se lient spécifiquement à la CypA mais qui n'inhibent pas l'activité de la CaN [342,343,344]. D'autres dérivés substitués en position 3 inhibent l'activité de la CaN sans former de complexe avec la cyclophiline au préalable [345]. Des modifications effectuées en position 1 ont changé l'affinité de dérivés tels que la Voclosporine, envers la CypA [346,347]. En effet, ce dérivé possède une affinité à la CypA supérieure à celle de la CsA, et a donc le potentiel d'être administré en clinique à des concentrations plus faibles et au final être moins toxique.

Le FK506 possède également des dérivés qui ont le même mode d'action. Parmi ceux-ci, on retrouve le FK520 (Ascomycine) et le Pimecrolimus [348]. D'autres sont monospécifiques pour la

liaison au FKBP12 tel que le FK506BD [349]. Par exemple, le FK520 est un dérivé du FK506 contenant un groupement éthyle en position 21 et qui est surtout utilisé comme immunosuppresseur chez les rongeurs ou bien *in vitro*. Le Pimecrolimus est utilisé en clinique pour le traitement de maladies inflammatoires de la peau. C'est un composé plus lipophile que le FK506 et donc plus affiné pour la peau, qui a moins d'effets systémiques et n'induit pas d'atrophie de la peau contrairement au composé de base. Aussi, un dérivé naturel du FK506 appelé Rapamycine (Sirolimus) partage le domaine de liaison au FKBP mais diffère au niveau du domaine effecteur [350]. Le complexe Rapamycine/FKBP12 ne se lie pas à la CaN, mais exerce ses effets immunosuppresseurs et antiprolifératifs via l'inhibition de la voie mTor/Akt [322]. Cette voie intervient dans la signalisation de l'IL-2R en inhibant l'effet de l'IL-2, pas sa synthèse. La Rapamycine est utilisée en clinique dans les traitements prolongés de transplantation après l'usage préalable de CsA et de FK506. La Rapamycine supprime également les néoplasies malignes post-transplantation dûe à ses propriétés anti-prolifératives [351].

1.6.3 Inhibiteurs agissant sur la CaN

Le centre catalytique de la CaN (PP2B) peut être partagé par d'autres protéines Ser/Thr phosphatases au niveau de la structure et de la conformation. C'est pour cette raison qu'ont été développés des composés spécifiques à la CaN qui vont agir comme des inhibiteurs non compétitifs, comme le CsA et le FK506, mais qui contrairement à ces molécules, n'auront pas besoin de protéine partenaire pour exercer leurs effets. Par exemple, parmi une liste exhaustive, nous trouvons le Dipyridamole qui est une drogue utilisée en clinique dans le traitement d'attaques cardiaques et qui affecte l'interaction de la CaN avec NFAT [352]. Il y a également la Dibefurine, qui inhibe l'activité enzymatique de la CaN [353] tout comme les barbituriques tel que le Phénobarbital [354]. Tout ceci conduit à une inhibition de la déphosphorylation de NFAT.

1.6.4 Peptides inhibiteurs et protéines de pathogènes

Le domaine d'interaction entre la CaN et NFAT est en général le point d'origine pour le développement de peptides inhibiteurs. Ces peptides vont cibler la liaison de la CaN avec ces différents substrats. De par leur mode d'action unique, ces peptides ou protéines peuvent s'avérer plus spécifiques et sélectifs que la CsA ou le FK506. Cependant, ces peptides ont une faible perméabilité pour les membranes et leur utilisation est compliquée.

1.6.4.1 Peptides inhibiteurs

Les fragments AID, dérivés du domaine autoinhibiteur de la sous-unité A de la CaN, ont été les premiers peptides examinés. Ces peptides contenant les résidus 424-521 (AID₄₂₄₋₅₂₁) inhibent l'activité phosphatase en bloquant l'accès de la protéine substrat au centre catalytique de la CaN [355]. Le peptide AID₄₅₇₋₄₈₂ a été caractérisé comme étant le motif inhibiteur [356]. Cependant, d'autres peptides du domaine autoinhibiteur sont présents dans la région 420-457. Par conséquent, des peptides auxquels on a rajouté une extension contenant les régions AID₄₂₀₋₅₁₁ et AID₃₂₈₋₅₁₁ se sont révélés trois à quatre fois plus aptes à inhiber la déphosphorylation que le peptide AID₄₅₇₋₄₈₂ [357]. Enfin, le peptide 11R-AID₄₅₇₋₄₈₂, auquel ont été rajoutés onze résidus arginine s'est révélé perméable à certains types cellulaires. Par exemple, il inhibe l'apoptose de neurones excitateurs [358] ou bien l'activation du zymogène induite par la caeruleine dans les cellules acineuses pancréatiques [359].

Le motif PxIxIT est le motif de liaison à la CaN présent sur les protéines NFAT1-4 [360]. Des peptides dérivés ou des protéines contenant ce motif inhibe l'interaction CaN/NFAT et la déphosphorylation sous-jacente des NFAT. L'oligopeptide d'une taille de 16 mer VIVIT possède une activité inhibitrice 25 fois supérieure à celle au peptide original 16 mer SPRIEIT de la protéine NFAT1 [253]. Il a également été démontré que le peptide VIVIT n'interfère pas avec l'activation du facteur de transcription NF-κB. Par conséquent, le peptide VIVIT est plus sélectif que les molécules CsA ou FK506 qui eux inhibent l'action des deux facteurs de transcription. Le peptide 11R-VIVIT a été décrit comme perméable dans certains types cellulaires mais d'autres travaux contredisent ce mécanisme [361]. Il y a également un peptide dérivé de la protéine d'ancrage à la CaN AKAP79 contenant le motif PIAIT (AKAP79₃₃₀₋₃₅₇) qui est capable de se lier à la CaN purifiée et a en plus la capacité d'inhiber l'activité phosphatase de l'enzyme [362]. Un autre peptide provenant de la protéine endogène inhibitrice CABIN1 contient un motif PEITVT capable de se lier à la CaN et d'empêcher la déphosphorylation de NFAT et son activité transcriptionnelle [363]. Enfin, il y a la protéine endogène modulatrice de l'activité de la CaN RCAN1 qui a été identifiée [364]. Au départ, il a été suggéré que le motif PKIIQT (RCAN1₁₈₁₋₁₈₆) était le peptide responsable de l'inhibition de la liaison à la CaN, mais des études ont démontré qu'un peptide chevauchant ce motif n'avait aucun effet et n'entraînait pas en compétition avec le peptide VIVIT. Des études plus récentes ont montré que le fragment RCAN1₁₄₃₋₁₆₃ pouvait se lier à la CaN avec une haute affinité, entraînant en compétition avec le peptide VIVIT et inhibant la translocation nucléaire de NFAT1 [365]. Il a également été démontré plus tard que son « véritable » peptide PxIxIT était le motif PSVVVH que l'on retrouvait sur les différentes formes épissées de RCAN. Par conséquent, le peptide PSVVVH (RCAN1₁₄₉₋₁₆₆)

est en compétition avec les régions régulatrices de NFAT1 et de CABIN1 pour se lier à la CaN [366].

Il existe également les peptides dérivés du motif conservé LxVP présent sur NFAT et qui permet l'interaction avec la CaN activée. L'affinité de ces motifs diffère en fonction des différentes isoformes de NFAT [367]. Le peptide LxVPc1, chevauchant les 15 aa de la région 371-385 de la protéine NFAT2 humaine, empêche la liaison de la CaN à NFAT1 et NFAT2. Le motif LxVPc1 se lie plus efficacement à la CaN que les motifs PxIxIT des protéines NFAT1-4. La surexpression du peptide GFP-LxVPc1 inhibe la déphosphorylation et la translocation nucléaire de NFAT1 suite à un traitement avec un ionophore dans des cellules HeLa et cause une inhibition de l'expression de l'IL-2 dans des cellules T Jurkat [256,325].

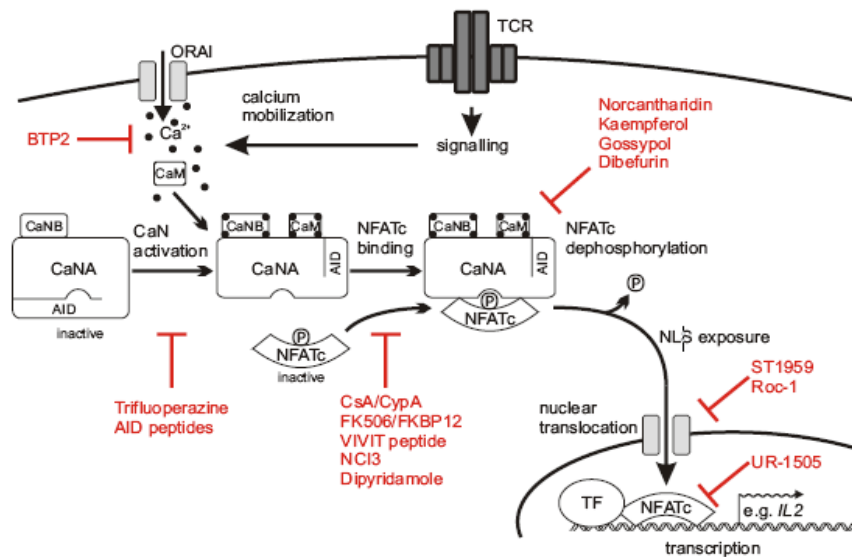


Figure 1.13 Schéma récapitulatif des inhibiteurs de la voie CaN/NFAT , de leur cible et de leurs effets conduisant à l'abrogation de l'expression du gène de l'IL-2. Tirée de [244]

1.6.4.2 Protéines de pathogènes

La CaN représente un point critique dans la signalisation du TCR et contrôle l'activation de la cellule T via la déphosphorylation de NFAT. Différents pathogènes ont ciblé ce mécanisme afin de prendre le dessus sur la réponse cellulaire visant à les éliminer. Des virus et bactéries ont été identifiés et leurs facteurs inhibant la voie CaN/NFAT ont été caractérisés.

Par exemple, la bactérie *Helicobacter pylori* exprime une protéine (VacA) capable d'inhiber la translocation nucléaire de NFAT. VacA bloque également l'augmentation du niveau de Ca^{2+} intracellulaire suivant une induction par l'ionomycine mais aussi l'activation de la voie MKK3/6-p38 MAPK. Ces données suggèrent de multiples modes d'action pour VacA, tous n'étant pas dépendants de l'action de la CaN [368]. Cependant, VacA inhibe la sécrétion d'IL-2 dans des cellules Jurkat ou des lymphocytes primaires CD4+ [369,370]. La protéine VacA est importée à l'intérieur des cellules T via les récepteurs CD18 et LFA-1 [371]. De fait, l'expression de ces récepteurs varie selon les types cellulaires résultant en une magnitude différente de l'effet de VacA.

Un autre pathogène possède un mécanisme de contrôle de la réponse cellulaire similaire à *H.pylori* : il s'agit du virus de la fièvre porcine africaine. Ce virus exprime la protéine A238L qui possède différents modes d'action. Tout d'abord, elle se lie à CaN et inhibe son activité phosphatase et la signalisation dépendante de la CaN [372]. Deuxièmement, elle supprime l'acétylation et l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription NFAT1, NF- κ B et c-jun suite à l'inhibition de la transactivation de CREB/p300 dans les cellules T activées [373]. Enfin, A238L inhibe l'activation de JNK [374]. La surexpression d'A238L réduit l'activité phosphatase de CaN et diminue l'expression de gènes rapporteurs dans des lignées cellulaires de reins porcins RS-2 transfectés [372]. On spéculé que protéine A238L inhibe la déphosphorylation de certains résidus de NFAT cruciaux pour l'activité transactivatrice du facteur de transcription mais n'aurait pas d'effet sur les résidus requis pour la translocation nucléaire ou la fixation à l'ADN [375]. Le fragment responsable de ces effets a été identifié quand il a été reporté que A238L₁₅₇₋₂₃₈ possède un motif PxIxIT (PKIITG) capable de se lier à la CaN avec une haute affinité. Un oligopeptide d'une taille de 14 mer A238L₂₀₀₋₂₁₃ se lie à la CaN plus rapidement que le peptide naturel SPRIEIT de la protéine NFAT2 porcine [376].

1.6.4.3 Possibles avantages en clinique

L'utilisation de protéines de pathogènes dans des protocoles cliniques pourrait apporter plusieurs avantages et aider à soigner ou ralentir la progression de certaines maladies. Tout d'abord, par leurs caractéristiques d'inhibition de la voie CaN/NFAT dans des maladies pro-inflammatoires ou invasives telles que les cancers, l'expression de ces protéines pourrait ralentir les effets néfastes des pathologies. Mais surtout, ces dernières années ont été développées des immunothérapies consistant à éliminer spécifiquement des cellules présentant certains épitopes spécifiques de manière HLA-dépendante. Ce genre de thérapies est aujourd'hui utilisé de manière routinière dans

le domaine de la transplantation et différentes données en recherche médicale donnent des résultats très prometteurs au niveau des cancers tels que les lymphomes [377] ou bien des tumeurs solides [378]. De par le fait que Flamand et al. ont démontré qu'un virus HHV-6 inactivé incapable de se répliquer est capable d'inhiber la synthèse d'IL-2 dans des lymphocytes T CD4+ primaires. Cela suggère qu'une protéine structurale puisse perpétrer cet effet et pourrait donc possiblement devenir une cible de choix pour une immunothérapie [119]. En effet, en ciblant spécifiquement des cellules cancéreuses pour exprimer une protéine virale de HHV-6 immunodominante agissant sur la voie CaN/NFAT, nous pourrions obtenir un double avantage en ralentissant la progression tumorale et également en permettant un ciblage précis des cellules cancéreuses en vue d'une immunothérapie adoptive permettant à des cellules T cytotoxiques spécifiques à l'épitope viral de détruire les cellules les présentant à leur surface.

1.7 Immunothérapie adoptive contre HHV-6

Les traitements spécifiques à base immunologique sont en plein essor. Par analogie avec les stratégies immunologiques à but préventif, on distingue l'immunothérapie active, passive ou adoptive. L'immunothérapie active consiste à stimuler ou à moduler une réponse immunitaire spécifique chez un individu ayant déjà été en contact avec l'antigène concerné. L'immunothérapie passive, qui consiste à administrer une source d'anticorps spécifiques, est avant tout utilisée comme traitement substitutif en cas de déficits en immunoglobulines. L'immunothérapie adoptive consiste à administrer une source de lymphocytes T spécifiques à un ou des antigènes donnés, le plus souvent après expansion de ces cellules *in vitro*. Etant donné le rôle essentiel joué par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (ou HLA chez l'homme) dans la reconnaissance antigénique par les lymphocytes T, un tel transfert doit être autologue ou compatible à 100%, c'est-à-dire les deux individus doivent posséder les mêmes allèles HLA pour posséder une même source de lymphocytes T spécifiques. Suivant une transplantation de cellules souches hématopoïétiques, la phase de reconstitution du système immunitaire représente la phase vulnérable à cause des infections virales latentes. Les réactivations de virus tels que le HCMV [379], l'EBV [380] ou le HSV-1 [381] sont fréquentes et mènent dans de nombreux cas à des maladies symptomatiques graves. Par exemple, plus de 80% des receveurs séropositifs au HCMV développent des réactivations virales, 50% avec une virémie et 40% développent des pathologies actives comme une pneumonie, une hépatite ou encore une rétinite [379,382,383]. Les drogues antivirales disponibles sont le Ganciclovir, le Foscarnet ou le Cidofovir mais leurs coûts sont élevés et ils causent

potentiellement des effets secondaires délétères. C'est pour cela que de nouvelles techniques d'immunothérapie adoptive plus fiables permettant une reconstitution du système immunitaire plus rapide ont été développées et améliorées au fur et à mesure des décennies. Cette procédure pourrait être étendue à un autre virus herpétique humain, HHV-6, dont les réactivations sont de plus en plus associées aux pathologies émergentes suivant la greffe chez les HSCT.

1.7.1 Immunosuppression et résurgence de HHV-6 suite à une greffe de moelle osseuse

Une greffe de moelle osseuse est une option thérapeutique utilisée afin de traiter des personnes atteintes de maladies hématologiques ou du système immunitaire. Les types de maladies communes nécessitant une greffe sont les leucémies, les lymphomes, des anémies aplasiques ou encore des troubles d'immunodéficience. La moelle osseuse est un tissu mou, spongieux trouvé à l'intérieur des os qui permet le développement et le stockage de la plupart des cellules sanguines de l'organisme. Les cellules souches primitives présentes dans la moelle osseuse sont des cellules pluripotentes qui seront nécessaire dans une greffe de moelle osseuse et permettront une prolifération ou bien une différenciation cellulaire afin de renouveler le système immunitaire.

Lors d'une greffe de moelle osseuse, le receveur va généralement subir un traitement immunosuppresseur afin de ne plus posséder de système immunitaire favorisant ainsi la prise de greffe. Tout ceci démarre par le conditionnement (généralement myéloablatif) à base de traitements radiothérapeutiques et/ou chimiothérapeutiques qui vont détruire les cellules cancéreuses mais également les cellules de la moelle osseuse et du système immunitaire, rendant le patient vulnérable à toute infection. La transplantation de la moelle osseuse va s'effectuer en général un ou deux jours suivant la radiothérapie et/ou la chimiothérapie. Suivant l'intervention, le receveur va avoir une médication visant à prévenir une réaction contre les cellules transplantées, surtout dans le cas d'une greffe allogénique entre deux individus ne possédant pas une association de 100% au niveau des allèles HLA. La prise de greffe est associée à la production nouvelle de cellules sanguines. La période allant de 2 à 4 semaines suivant la greffe est la plus critique car c'est le moment où le corps se retrouve sans défense contre les pathogènes dus aux traitements myéloablatifs. C'est en général durant cette période environ 3 semaines post-greffe que HHV-6, un virus opportuniste dormant, sort de sa latence afin de se répliquer et d'infecter un grand nombre de cellules chez le receveur et d'engendrer de lourdes pathologies telles que l'encéphalite, l'hépatite, les GVHD ou encore le rejet de greffe [90,98]. Une réactivation à HHV-6 est déclarée lorsque le taux plasmatique viral du patient atteint 1000 copies d'ADN viral / ml suivant la greffe.

Les lymphocytes T jouent un rôle primordial dans le contrôle des réactivations virales. Malgré le fait que le nombre de cellules T augmente rapidement suivant la greffe, la fréquence élevée de réactivations virales dues à HHV-6, environ dans 50% des cas, dénote l'absence ou le manque d'une forte réponse immunitaire ciblée contre le virus. Au cours des dernières années, la reconstitution d'une réponse T cytotoxique spécifique aux HCMV et EBV ont permis de protéger les HSCT des réactivations virales et d'améliorer les prises de greffes [118,384,385]. Ce genre de traitement est appelé immunothérapie adoptive et il semble aujourd'hui essentiel d'étendre cette procédure aux virus HHV-6 dont l'association aux pathologies post-greffe ne cesse d'augmenter.

1.7.2 Principes de l'immunothérapie adoptive et possibles applications

Le but d'une immunothérapie adoptive est de compléter le pool de lymphocytes T d'un individu avec une source externe de lymphocytes T d'une spécificité donnée et capables d'exercer une activité protectrice anti-virale ou anti-tumorale. Le receveur subissant une greffe de moelle osseuse doit trouver un donneur sain dont la compatibilité du système HLA est totale. Un lymphocyte T est monospécifique (clonal), c'est-à-dire qu'il reconnaît un seul antigène sous la forme d'un peptide particulier restreint à une molécule HLA (complexe peptide/HLA). La fréquence des lymphocytes T d'une spécificité donnée au sein d'une population de lymphocytes T est inférieure à 1 sur 100 000 chez un individu non immunisé. Cette fréquence peut augmenter jusqu'à 1000 fois lors de la réponse immunitaire déclenchée par une infection virale aiguë. On comprend dès lors la nécessité de réaliser *ex vivo* une sélection suivie d'une amplification des lymphocytes T ayant la spécificité voulue à partir de la source initiale de lymphocytes T. Pour cela, on isole les lymphocytes T du donneur sain, que l'on sait préalablement exposé par le pathogène visé, que l'on met ensuite en contact avec des peptides immunodominants viraux exprimés et présentés par des cellules présentatrices d'antigène (APC), et que les clones de cellules T spécifiques seront capables de reconnaître. Grâce à l'utilisation d'un cocktail de cytokines favorisant la croissance ou la différenciation des cellules, comme l'IL-2 et l'IL-7 [117,386], on peut obtenir une multiplication considérable de lymphocytes T activés *in vitro*, permettant, dans des conditions de culture adéquates, l'obtention de populations clonales de lymphocytes T pouvant être réinjectées au receveur tôt suivant la transplantation.

Un autre obstacle à surmonter a trait au devenir des lymphocytes T transférés. Il est évident que, pour être efficaces, ces lymphocytes T doivent, d'une part, persister suffisamment longtemps chez le receveur et, d'autre part, être à même de parvenir à l'endroit où se trouvent les cellules (infectées ou tumorales) à éliminer. Par exemple, au sein des lymphocytes T, les sous-populations

CD4+ et CD8+, même si elles coexistent partout dans l'organisme, occupent chacune un volume de distribution indépendant. Chez une souris ne possédant pas de lymphocytes T CD8+ à la suite d'une manipulation génétique, le nombre de lymphocytes T CD4+ n'est pas plus élevé que celui d'une souris normale, et vice-versa. Cependant, des protocoles cliniques d'immunothérapie adoptive très bien caractérisés contre les virus EBV et HCMV sont utilisés chez des patients subissant des greffes de moelle osseuse ou des transplantations d'organes solides avec des résultats très positifs [118,384]. En effet, on a observé une amélioration de la prise de greffe, une plus longue survie du greffon ou une diminution du rejet de greffe. De plus, l'apparition de pathologies sévères telles que les hépatites ou les pneumopathies associées aux réactivations virales ont été diminuées.

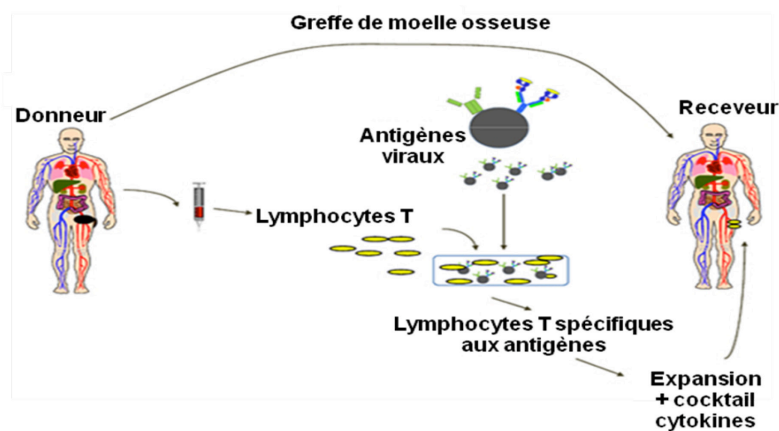


Figure 1. 14 Représentation schématique des étapes générales lors d'une immunothérapie adoptive décrivant l'isolation des lymphocytes T du donneur sain, l'expansion clonale des cellules T à l'aide d'APC présentant les antigènes viraux et d'un cocktail de cytokines favorisant la prolifération cellulaire et enfin la réinjection des lymphocytes T dans le receveur suite à la greffe de moelle osseuse.

Les progrès réalisés en immunologie appliquée au cancer permettent d'envisager l'utilisation d'une immunothérapie adoptive chez certains patients cancéreux. D'ailleurs, des tentatives dans ce sens ont déjà eu lieu chez des patients atteints de mélanome métastatique ou d'autres types de cancer. La stratégie appliquée pour traiter des tumeurs solides est la même que celle utilisée pour une greffe de moelle osseuse. La source autologue de lymphocytes T à partir d'une biopsie utilisée dans ces cas d'immunothérapie adoptive a été une suspension cellulaire obtenue à partir de lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL) du patient ayant déjà reconnu les antigènes tumoraux capables de sécréter de l'IFN- γ ou du facteur nécrotique des tumeurs (TNF) et cultivés *in vitro*, en présence d'IL-2 [387]. Une fois les clones de TIL en nombre suffisant ils peuvent être réinjectés au patient. Entre temps, la caractérisation moléculaire d'antigènes tumoraux reconnus spécifiquement

par les lymphocytes T CD8+ et T CD4+ provenant de patients cancéreux a stimulé la mise au point de diverses stratégies d'immunothérapie active comme des vaccins visant à renforcer la réponse immunitaire anticancéreuse [388].

De nouvelles stratégies visant à éliminer spécifiquement les cellules tumorales pourraient également voir le jour. En effet, des traitements utilisant la virothérapie ou l'immunothérapie adoptive ont déjà été testés sur différents types de cancers. Un traitement combiné utilisant ces deux stratégies pourrait s'avérer très efficace. Dans un premier temps, tout comme en virothérapie, nous pourrions nous servir d'un virus comme d'un vecteur infectant préférentiellement les cellules tumorales et qui libèrerait une séquence génomique codant pour une protéine du non-soi immunogène. Ensuite par une immunothérapie adoptive, nous pourrions expandre des clones de CTL dirigées spécifiquement contre les épitopes de la protéine du non-soi et qui lyseraient spécifiquement les cellules tumorales sans agir sur les cellules saines du patient.

1.7.3 Immunothérapie adoptive contre EBV ou HCMV

Comme expliqué précédemment, chez les personnes immunodéprimées telles que les receveurs de HSCT, les transplantés d'organes solides, les patients atteints du VIH, les réactivations virales de l'EBV et du HCMV sont associés à une forte morbidité voire mortalité due à un manque d'immunité cellulaire contre les antigènes viraux. Du fait que les traitements antiviraux n'étaient pas suffisamment efficaces pour freiner les effets délétères microbiens, il a fallu trouver une alternative. Ayant été parmi les premiers virus à être diagnostiqués en vue d'une transplantation, des protocoles de transferts adoptifs de cellules T ont pu être mis au point assez tôt contre ces pathogènes.

Concernant l'EBV, les premiers travaux consistant à identifier les cibles permettant une forte réponse de cellules T à partir de donneurs sains ont démontré une dominance de réactivité contre les protéines EBNA1, -2, -3, ou LMP2 [389,390,391]. Ces travaux ont par la suite favorisé l'identification d'épitopes immunodominants restreints à certains allèles HLA et abouti à la mise en place de protocoles d'immunothérapie adoptive anti-EBV. Un exemple, parmi de très nombreux protocoles tentés afin de prévenir des maladies lymphoproliférative post-transplantation (PTLD), une expansion *ex vivo* de cellules T spécifiques à la protéine EBNA1 suivi de leur transfert adoptif ont mené à un contrôle de la réactivation virale et s'est révélé comme une procédure simple, rapide et efficace contre EBV. Des protocoles similaires s'appliquent à la prévention ou au traitement de

plusieurs maladies causées par une réactivation d'EBV telles que des lymphomes de Hodgkin ou encore des carcinomes nasopharyngés [392].

Environ 80% des individus sains démontrent des évidences d'une exposition ancienne au HCMV et une immunité spécifique humorale et cellulaire. L'analyse de la réponse immunitaire des cellules T a indiqué une hiérarchie dans la réponse aux protéines virales, certaines favorisant une forte réponse, d'autres non. Dans le cas du HCMV, les deux protéines majeures dans la réponse immunitaire des cellules T CD8⁺ sont IE1 (UL123) et pp65 (UL83) [393]. De fait, pp65 est une protéine du tégument produite durant la phase tardive du cycle lytique, mais lors de l'infection primaire, elle semble être l'élément majeur contre lequel est dirigée la réponse immune. A l'inverse, la protéine IE1 semble dominer la réponse immunitaire lors des réactivations virales du fait que c'est la première protéine synthétisée lors du cycle viral. Il existe là aussi de très nombreux exemples de traitement grâce à une immunothérapie adoptive ayant abouti à une amélioration chez un receveur de greffe. Par exemple, Bunde et al ont démontré qu'une protection contre HCMV était corrélée avec de hauts niveaux de cellules T productrices d'IFN- γ anti-IE1 chez des patients transplantés du coeur et des poumons [394]. Nickel et al. ont ensuite confirmé ces résultats en établissant la relation qui existait entre une forte réponse T mémoire anti-IE1 du HCMV et une diminution du rejet de greffe et une amélioration des fonctions de la greffe au sein de patients transplantés rénaux [384]. Également, Lucas et al ont démontré qu'une immunité cellulaire T cytotoxique anti-pp65 et anti-IE1 du HCMV prévient et traite une éventuelle réactivation virale chez des patients greffés de moelle osseuse ayant subi un transfert adoptif [395].

1.7.4 Ciblage de la protéine IE1 pour une immunothérapie adoptive anti-HHV-6B

La protéine précoce immédiate IE1 des virus HHV-6 a fait l'objet de nombreuses études qui ont permis de caractériser bons nombres de mécanismes dans lesquels elle est impliquée. Elle permet de créer un environnement cellulaire favorable à la réplication virale et contrôle la réactivation depuis l'état de latence. Également, Jaworska et al ont caractérisé les propriétés inhibitrices de cette protéine dans l'expression du gène de l'*IFN- β* et son action sur la cascade IFN et les gènes stimulés par l'IFN (ISG) [45,46]. C'est la première protéine synthétisée dans le cycle réplicatif des HHV-6 et elle est retrouvée sous deux formes, une à 150 kDa et l'autre à 170 kDa suivant une modification post-traductionnelle par SUMOylation [44]. Les protéines IE1 des HHV-6, tout comme IE1-HCMV, sont exprimées dans le noyau des cellules infectées. On est capables de détecter de l'ARNm codant pour IE1 dès 2h post-infection (p.i) et la protéine est détectable dès 4h

p.i. La SUMOylation joue un rôle en stabilisant IE1. Cependant, IE1 est la protéine qui partage le moins de similitude entre les HHV-6A et HHV-6B (environ 65% de similarité au niveau des acides aminés) et la protéine IE1-HHV-6A ne possède que 941 aa contre 1078 aa pour IE1-HHV-6B.

L'idée d'utiliser la protéine IE1-HHV-6B comme cible pour l'immunothérapie fut inspirée de la protéine IE1-HCMV. En effet, les deux protéines ont été caractérisées comme pouvant avoir les mêmes localisations sub-cellulaire, telles que de se retrouver au niveau des corps nucléaires, ou encore d'antagoniser la réponse IFN- β . De fait, si IE1-HCMV possède des propriétés immunogènes, il se peut qu' IE1-HHV-6B partage cette propriété également. De plus, des travaux menés par Nickel et al. ont démontré que la présence d'une immunité anti IE1-HCMV forte par des cellules T est corrélée avec une amélioration de la prise de greffe et une diminution d'une alloréactivité du greffon contre l'hôte chez des patients transplantés rénaux [384]. Étendre ce genre de protocoles à HHV-6B pourrait permettre d'endiguer les réactivations du virus post-greffe et les pathologies graves qui y sont associées.

1.7.5 Caractérisation de cibles immunodominantes de HHV-6B

L'idée d'identifier des cibles immunodominantes contre HHV-6B permettant l'expansion clonale de lymphocytes T anti-HHV-6B en vue d'une immunothérapie adoptive a été largement influencée par des recherches préalables menées sur le HCMV. Effectivement, au cours des vingt dernières années, des protocoles d'immunothérapie adoptive anti-HCMV ont été développés et améliorés. De par l'analogie du HHV-6B avec le HCMV, des études récentes ont permis l'identification d'épitopes immunodominants du HHV-6B qui pourraient permettre la mise en place de protocoles cliniques dans un futur très proche.

Les deux protéines du HCMV couramment utilisées pour l'expansion de lymphocytes T sont la protéine IE1-HCMV (UL123) et la protéine de tégument phosphoprotéine 65 (pp65 ou UL83) qui sont respectivement les homologues de séquences et fonctionnelles des protéines IE1 et U54 de HHV-6B. En effet, les deux protéines IE1 sont capables d'antagoniser la réponse immunitaire innée des IFN-I et d'agir au niveau des corps nucléaires, alors que les protéines de téguments pp65 et U54 ont des activités transactivatrices capables d'induire le cycle viral. Suivant ces observations, il est devenu légitime de rechercher des peptides immunodominants de HHV-6B à partir des protéines homologues du HCMV. De nos jours, concernant la réponse anti-HCMV, beaucoup de peptides restreints à différents allèles HLA ont été découverts et sont utilisés pour l'expansion clonale de cellules T afin de prévenir les réactivations virales.

En 1998, Kern et al ont mis au point une technique permettant, à partir de la séquence d'acides aminés complète d'une protéine, d'identifier les peptides reconnus par des clones de cellules T [396]. Cela consiste à concevoir des peptides chevauchants qui vont recouvrir la séquence protéique au complet, d'établir des pools avec ces peptides et de tester tous ces différents mélanges sur des PBMC ou cellules T. Suivant la stimulation des cellules avec les pools de peptides, la réponse IFN- γ des cellules T CD4+ ou T CD8+ est évaluée par cytométrie en flux. Au final, sont identifiés comme peptides immunodominants ceux qui sont capables d'induire une réponse IFN- γ en étant présents dans 2 pools différents et que l'on peut croiser par l'étude dite « en 2 dimensions ». Tout de même, il est important de confirmer que ces clones T stimulés et qui auront été sélectionnés pour l'expansion *ex vivo* possèdent bien une activité cytotoxique contre des cellules infectées par le pathogène que l'on veut éliminer ou contenir. Depuis, ce protocole a été utilisé pour identifier des épitopes de nombreux pathogènes et a pu permettre les premières caractérisations concernant HHV-6B, notamment par Gerdemann et al. qui ont été capables d'identifier des peptides 9 mer immunodominants de la protéine IE1 restreints aux allèles HLA-B*40 [134]. De plus, d'autres travaux ont permis de mettre en évidence des réponses immunitaires T CD4+ et T CD8+ spécifiques à plusieurs protéines du HHV-6B telles que IE1, U54, U11, U14 et U71 [134,144]. Il est donc primordial de continuer ce type de recherche, et notamment d'identifier des épitopes restreints pour les allèles HLA les plus communs dans la population afin d'élargir au maximum le nombre d'individus qui seraient candidats à un protocole d'immunothérapie adoptive anti HHV-6B.

1.7.6 Création d'un pool de peptides immunodominants multivirus

Il est maintenant clair que chez les personnes immunodéprimées, toute une batterie de virus sont capables de se réactiver et d'être associés à l'établissement de pathologies très graves pouvant aboutir à la mort du patient. Il est également admis que ces pathogènes, lorsqu'ils réactivent, provoquent des pathologies communes. C'est pour cette raison que des protocoles visant à expandre des clones de CTL spécifiques à plusieurs virus en même temps ont été développés afin de les réinjecter au patient. Ces protocoles permettent un gain de temps et de faisabilité en favorisant la multiplication de beaucoup de clones T à partir d'une seule culture. Par exemple, Leen et al. ont réussi à mettre en place un protocole permettant la génération de CTL en utilisant des APC artificielles restreintes pour un HLA donné capables de présenter des peptides immunodominants du HCMV, de l'EBV et de plusieurs sérotypes d'AAV-2 à partir d'une seule culture cellulaire [386,397]. Au total, onze lignées cellulaires T cytotoxiques spécifiques à de multiples virus ont été réinjectés aux patients immunodéprimés comme prophylaxie. Les résultats obtenus ont démontré

une efficacité des cellules T capable de reconnaître un antigène *in vivo* de s'expandre et d'agir contre la cellule infectée alors que les autres populations spécifiques à d'autres virus restaient « discrètes ». Ainsi, tous les patients chez qui une activité virale avait été mesurée provoquée par le HCMV, EBV ou l'AAV-2 ont eu une réduction rapide du titre viral et une résolution des symptômes en fonction de l'expansion clonale suivant la réinjection. Ce genre de protocoles dérivés d'une monoculture de CTL multispécifiques semblent sûrs, fiables et efficaces et seraient une alternative de premier choix dans la prévention et le traitement des réactivations virales par transfert adoptif.

De par son impact de plus en plus important en médecine, il est primordial que HHV-6B soit enfin considéré comme un pathogène potentiellement très dangereux chez les patients immunodéprimés et que des protocoles d'immunothérapie adoptive soient mis au point à partir de clones de CTL anti-HHV-6B et d'étendre les pools de peptides multivirus à ce pathogène.

2. Développement

Notre laboratoire s'est spécialisé depuis plusieurs années dans la caractérisation des mécanismes d'évasion immunitaire des virus herpétiques HHV-6 et HHV-8 permettant l'identification de protéines virales abrogeant la voie des IFN-I. Les herpesvirus humains sont parmi les pathogènes possédant le plus bel arsenal protéique leur permettant de coloniser leur hôte tout au long de leur vie. Malgré tout, les mécanismes utilisés par HHV-6 ne sont pas forcément bien caractérisés. Par exemple, on sait que le virus peut abroger la présentation antigénique en dérégulant l'expression à la surface des cellules de HLA-I. Il peut également synthétiser une chimiokine virale (U83) qui va moduler le recrutement des cellules au lieu de l'infection, ou encore la protéine U24, qui va inhiber l'expression du CD3 à la surface cellulaire et donc inhiber l'activation des cellules T. Il y a près de 20 ans, le Dr. Louis Flamand a rapporté la suppression de la synthèse de l'IL-2 dans des lymphocytes T CD4+ infectés par HHV-6 permettant de mettre à jour un mécanisme d'évasion immunitaire très important par HHV-6 qui est capable d'abroger une cytokine clé dans l'immunité adaptative cellulaire. Dans nos travaux, nous avons identifié la protéine U54 comme responsable de cette suppression ainsi que le mécanisme d'action permettant d'empêcher les cellules infectées de se défendre. Nous avons par la suite testé l'impact de cette protéine dans le cancer du sein, dont la progression est dépendante du mécanisme inhibé par U54. De plus, U54 a été caractérisé comme une protéine immunogène pouvant servir de cible pour l'expansion clonale de CTL pouvant être réinjectées dans un patient dans un traitement d'immunothérapie adoptive. Ce type de traitement existe déjà pour traiter un autre virus de la sous-famille des β -herpesvirus qui est le HCMV, et une des protéines cibles permettant l'expansion clonale cellulaire est la protéine IE1, homologue de la protéine IE1 de HHV-6. C'est donc à partir de ce postulat que nous avons entrepris l'identification de peptides immunodominants de cette protéine IE1 pour pouvoir établir les bases d'un traitement par transfert adoptif de CTL anti-HHV-6 chez les HSCT.

2.1 Objectifs

Les différents travaux présentés dans ce manuscrit décrivent les rôles de deux protéines virales ayant un rôle dans l'évasion immunitaire ou le ciblage de peptides immunogènes pour d'éventuels traitements: U54 et IE1. Tout d'abord, nous avons voulu identifier la protéine de structure impliquée dans l'inhibition de la synthèse d'IL-2 et ainsi décrire le mécanisme de l'observation faite 20 ans auparavant à partir d'un virus HHV-6 sauvage. Au sein du laboratoire, nous possédions quatre vecteurs d'expression codant pour des protéines de tégument du virus U11,

U30, U31 et U54 et nous avons voulu vérifier si une de ces quatre était capable d'abroger cette expression du gène de l'*IL-2*. Après avoir identifiée une des protéines candidates, nous avons voulu caractériser le mécanisme qui aboutit à l'abrogation de la transcription génique. La protéine U54 était jusqu'à présent caractérisée comme un transactivateur permettant d'induire le cycle réplcatif du virus. En démontrant qu'elle peut antagoniser la voie CaN/NFAT, nous avons décidé de voir si U54 pouvait également agir dans des cellules de cancer du sein dont la progression est dépendante de cette voie de signalisation. De plus, U54 ayant été caractérisée comme immunogène dans plusieurs études, et, étant l'homologue de la protéine pp65 du HCMV, nous avons émis l'hypothèse qu'U54 pourrait donner un double avantage contre le cancer du sein en faveur d'une thérapie par transfert adoptif de CTL. Enfin, nous avons travaillé sur la protéine IE1 et identifié des épitopes immunodominants pouvant servir de base à un éventuel traitement d'immunothérapie anti-HHV-6 pour contrôler ou combattre une réactivation virale chez des greffés ou transplantés d'organes solides. Cette dernière partie de nos travaux a été motivée par le fait que la protéine IE1-HCMV était l'homologue de la protéine IE1-HHV-6B, donc qu'elles peuvent partager les mêmes caractéristiques. Mais surtout, dans une étude antérieure, il avait été prouvé qu'une forte immunité anti-IE1-HCMV chez des transplantés rénaux avait abouti à une meilleure prise de greffe, à une meilleure fonction de la greffe et à un contrôle du HCMV.

En résumé, voici nos différents principaux objectifs:

Objectif 1: Identifier la protéine responsable de l'inhibition de l'expression du gène de l'*IL-2* et le mécanisme responsable.

Objectif 2: Tester l'effet de la protéine U54 sur la prolifération cellulaire du cancer du sein sur la lignée MCF-7.

Objectif 3: Identifier des épitopes immunodominants de la protéine IE1 restreints aux allèles HLA-A*02, HLA-A*03 et HLA-B*07.

2.1.1 U54 abroge la transcription du gène de l'*IL-2* en dérégulant la voie CaN/NFAT

Cette étude décrit l'identification de la protéine U54 du HHV-6B comme étant inhibitrice de l'induction du gène de l'*IL-2*. U54 peut inhiber de manière spécifique l'activité transcriptionnelle des facteurs NFAT1 et NFAT2 dans des cellules stimulées pour l'induction de la transcription dépendant de NFAT. L'interférence d'U54 avec la voie CaN/NFAT a été caractérisée et son impact a été démontré sur chaque étape allant de l'interaction avec la CaN à l'inhibition de la translocation nucléaire de NFAT et l'inhibition de la transcription du gène de l'*IL-2*. Nous avons démontré l'interaction de U54 avec la CaN, dans un second temps, nous avons caractérisé l'inhibition de la

déphosphorylation de NFAT1 et donc l'inhibition de l'activité phosphatase de la CaN en présence de U54 pour ensuite observer l'abrogation de la capacité des facteurs NFAT à transloquer dans le noyau. Afin de confirmer l'impact de U54 sur cette voie de signalisation, nous avons nucléofecté des lignées de lymphocytes T J-Jhan avec U54 et caractérisé par qPCR l'inhibition d'environ 90% de la transcription du gène de l'IL-2 en présence de la protéine virale. Enfin, après avoir décrit le mécanisme d'action, nous avons identifié le motif présent sur U54 responsable de l'interaction avec la CaN et donc de l'abrogation de la voie de signalisation en créant un mutant de délétion du motif U54₂₉₃₋₂₉₇ GISIT par U54_{Δ293-297} GISAA. Nous avons pu prouver que le mutant n'était pas capable d'avoir les effets inhibiteurs de la protéine U54 sauvage. Les résultats de cette étude sont décrits en détails dans le chapitre 3.

2.1.2 U54 inhibe la prolifération des cellules de cancer du sein MCF-7

Ces travaux décrivent les propriétés inhibitrices de la protéine U54 du HHV-6B sur la prolifération cellulaire dans le cancer du sein. A partir des résultats obtenus dans l'étude précédente, nous avons voulu évaluer l'impact de la protéine U54 sur le cancer du sein dont la progression est dépendante de la voie CaN/NFAT. Nous avons tout d'abord vérifié que dans une lignée cellulaire de cancer du sein MCF-7, U54 inhibe l'activité des facteurs NFAT endogènes. Nous avons également observé, qu'en présence d'U54, les facteurs NFAT1 exogènes transfectés ne sont pas déphosphorylés, confirmant que l'activité de la CaN est inhibée. Enfin, nous avons démontré que la protéine U54 est capable de réduire d'environ 30% la prolifération cellulaire des cellules MCF-7 de sein alors qu'elle n'a aucun effet sur la prolifération de cellules 293T dont la prolifération est indépendante de NFAT. Les résultats de cette étude sont décrits en détails dans le chapitre 4.

2.1.3 Identification d'épitopes immunodominants de la protéine IE1 restreints aux allèles HLA-A*02, HLA-A*03 et HLA-B*07

Cette étude décrit le processus ayant servi à identifier des épitopes immunodominants pour l'expansion clonale de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques contre la protéine IE1 du HHV-6B restreints aux allèles HLA-A*02, HLA-A*03 et HLA-B*07. Nous avons tout d'abord élaboré des pools de peptides 15 mer chevauchants recouvrant la protéine IE1 au complet. A l'aide de ces pools, nous avons pu caractériser une réponse immunitaire cytotoxique de cellules CD3+ CD8+ IFN- γ + anti-IE1 pré-existante chez des donneurs de sang sains à hauteur de 0.06% des PBMC totales circulantes. Après avoir démontré que la protéine IE1 était une cible potentielle, nous avons identifié de manière systématique les épitopes immunodominants à partir de l'identification des

pools jusqu'à la séquence 9 mer immunogène de chaque peptide restreint pour son allèle HLA. Chacune de ces étapes de sélection a été effectuée par l'expansion clonale de lymphocytes T CD3+ de donneurs sains possédant l'allèle HLA-A*02, HLA-A*03 ou HLA-B*07 par coculture avec des AAPC exprimant chacun des allèles spécifiques au donneur. Le dépistage des peptides immunodominants s'est fait par l'évaluation des lymphocytes capables de répondre à un peptide présenté par les AAPC en relarguant de l'IFN- γ . Enfin, pour confirmer le potentiel cytotoxique des lymphocytes obtenus suite à l'expansion, nous avons infectés des PBMC de donneurs sains avec un virus HHV-6B de souche Z29 que nous avons mis en coculture avec des lymphocytes T CD3+ stimulées par chacun des différents peptides. Suite à cette coculture, nous avons évalué l'activité de l'enzyme lactate déhydrogénase, témoin d'une activité cytolitique. En conclusion, nous avons été capables d'identifier 6 peptides dont trois restreints au HLA-A*02, deux au HLA-A*03 et un au HLA-B*07 favorisant l'expansion de CTL ayant la capacité de lyser des cellules infectées par HHV-6B. Les résultats de cette étude sont décrits en détails dans le chapitre 5.

Le chapitre 3 contient le texte de l'article intitulé « Inhibition of interleukin-2 gene expression by human herpesvirus 6 U54 tegument protein » écrit par Iampietro M, Morissette G, Gravel A, Flamand L. L'article a été soumis au journal *Plos pathogens* en 2013.

Chapitre 3: U54 inhibe l'activité de la CaN et inhibe la voie de signalisation du facteur de transcription NFAT et l'expression du gène de l'*IL-2*

HHV-6 est un pathogène ubiquitaire infectant plus de 95% de la population mondiale et pouvant persister tout au long de la vie de l'hôte. Comme tout virus herpétique, il exerce une batterie de stratégies d'évitement du système immunitaire en dérégulant et en abrogeant les mécanismes de défenses cellulaires directement ou indirectement. Afin d'élargir les connaissances concernant la relation hôte-pathogène par HHV-6, nous avons étudié l'impact du virus sur la synthèse de l'*IL-2*. En transfectant de manière transitoire plusieurs protéines de tégument du HHV-6B, nous avons identifié la protéine U54 comme un inhibiteur de l'activité endogène ou transitoire des facteurs de transcription NFAT. La protéine est capable d'inhiber la voie CaN/NFAT et l'expression du gène de l'*IL-2* suivant la stimulation des cellules par des activateurs de la voie calcique TPA/ionomycine. Grâce à son motif U54₂₉₃₋₂₉₇ GISIT, la protéine virale est capable de lier CaN et d'inhiber son activité phosphatase sur NFAT, qui ne peut donc se retrouver sous sa forme active. Ensuite, NFAT reste sous sa forme hyperphosphorylé dans le cytoplasme et n'est pas transloqué à l'intérieur du noyau aboutissant ainsi à l'inhibition de l'expression des gènes dépendant de cette voie, dont le gène de l'*IL-2*. Fondamentalement, ces résultats caractérisent le mécanisme par lequel la protéine structurale du tégument du HHV-6B U54 est un suppresseur de la synthèse de l'*IL-2*, cytokine clé dans l'immunité adaptative, et favorise l'induction d'un environnement favorable à sa persistance au sein de l'hôte.

Inhibition of Interleukin-2 Gene Expression by Human Herpesvirus 6 U54 Tegument Protein

Running title: *IL-2* gene silencing HHV-6 by U54 protein

Mathieu Iampietro¹, Guillaume Morissette¹, Annie Gravel¹, Louis Flamand^{1,2}

¹ Division of Infectious Diseases and Immunity, CHU de Quebec Research Center, Quebec city, Canada; ² Department of Microbiology, Infectious Diseases and Immunology, Faculty of Medicine, Laval University, Quebec city, Canada.

Address correspondence to: Louis Flamand PhD MBA

Division of Infectious Disease and Immunity,

Room T1-49

CHU de Quebec Research Center,

Quebec city, Canada

G1V 4G2

Tel: 418-525-4444 (x46164)

Fax: 418-654-2765

Email: Louis.flamand@crchul.ulaval.ca

ABSTRACT

Human Herpesvirus 6B (HHV-6) is a ubiquitous pathogen causing life-long infection in approximately 95% of humans worldwide. To persist within its host, HHV-6B developed several immune evasion mechanisms such as latency during which minimal proteins are expressed and also by disturbing innate and adaptive immune response. The primary cellular targets of HHV-6B are CD4⁺ T cells. Previous studies by Flamand et al. reported on the capacity of HHV-6, as well as UV-irradiated virus to inhibit interleukin-2 (IL-2) synthesis in CD4⁺ lymphocytes suggesting viral structural components could be responsible for this effect. In the present study, we have identified the U54 tegument protein as a protein capable of inhibiting IL-2 expression. We demonstrated that U54 binds the calcineurin (CaN) phosphatase enzyme, causing improper dephosphorylation and nuclear translocation of nuclear factor of activated T cells (NFAT) proteins, resulting in sub-optimal *IL-2* gene transcription. The U54 GISIT motif (aa 293-297), analogous to the NFAT PxIxIT motif, was identified as important for inhibition of NFAT activation. .

INTRODUCTION

Herpesviruses are among the most successful viral pathogens infecting humans. Following the primary infection, a life-long relationship is established with the virus residing in a state of dormancy (latency) with episodic reactivation that can lead to severe complications depending on the immune status of the individual. Two human herpesviruses increasingly recognized as a medically relevant pathogens are human herpesvirus 6A (HHV-6A) and HHV-6B. Due to biological, epidemiological and diseases association differences [1], the International Committee on Taxonomy of Viruses recently classified HHV-6A and HHV-6B, belonging to *β-herpesvirinae* subfamily, as two distinct viruses [2]. HHV-6A was first isolated from AIDS patients and subjects with lymphoproliferative disorders [3] while HHV-6B was first isolated from a healthy subject from Zaire [4]. HHV-6B is the etiological agent of the sixth infantile eruptive disease known as roseola [5] and an increasingly recognized problem in hematopoietic stem cell transplantation where HHV-

6B reactivation is often linked with encephalitis, especially when the source of stem cells is cord blood [6]. The epidemiology and diseases association with HHV-6A are less clear.

HHV-6A and HHV-6B primary target cells are CD4⁺ T lymphocytes [7,8]. The immunomodulatory impacts of HHV-6 infection on T cells functions have been studied in some details. HHV-6 infection is associated with downregulation of CD3 expression [9], *de novo* induction of CD4 expression on CD8⁺ T cells [10] through activation of the CD4 promoter [11], induction of cytokines (IL-10) [12], chemokines (RANTES) [13], inhibition of interferon β production [14] and type 1 interferon signaling [15], induction of T regulatory type 1 cells [12], inhibition of T cell lymphoproliferative response [16] [17] and IL-2 synthesis [16]. Some of these *in vitro* effects have also been observed under *in vivo* conditions. For example, in patients who received allogeneic bone marrow transplantation, active HHV-6 infection, as revealed by the presence of plasma viremia, was associated with lymphocytopenia and defective T-cell proliferation to recall antigens [18].

The development of a specific and efficient T cell response is a key for the generation of a robust immunity against any viruses. The clonal expansion of T cells in response to T cell receptor (TCR) engagement is intimately linked to the cell's ability to synthesize, secrete and consume IL-2, the main T cell growth factor [19,20,21]. TCR signaling induces AP-1, increases the levels of active NF- κ B p65/rel and calcium resulting in calmodulin activation followed by CaN-mediated dephosphorylation of NFAT, promoting its translocation into the nucleus. NFAT, in conjunction with constitutive factors such as OCT-1, bind to specific sites in a cooperative fashion the IL-2 promoter, resulting in *IL-2* gene transcription [22,23,24]. Introduction of mutations that abolish NFAT binding to the two high-affinity NFAT-binding sites results in a dramatic reduction in promoter activity [25]. Furthermore, low doses of the immunosuppressants cyclosporin A (CsA) and FK506, which inhibit the phosphatase activity of CaN and thus the nuclear translocation of NFATs, also block *IL-2* gene expression. These results show that the induction of the *IL-2* gene

transcription in T cells depends critically on the activity of NFAT factors [26,27,28].

Flamand et al first reported that HHV-6 infection of T cells is associated with IL-2 gene transcription inhibition [16]. Their results clearly showed that viral infectivity was dispensable for IL-2 inhibition, indicating that viral attachment to the cellular receptors or an immunosuppressive protein present within the virion could be responsible for the observed effects. In the present study we have analyzed the ability of U11 and U54, two HHV-6 virion tegument proteins, at causing *IL-2* gene transcription inhibition. Our results indicate that U54, but not U11, efficiently inhibits IL-2 promoter activation. By physically interacting with CaN, U54 prevents the dephosphorylation of NFAT by CaN blocking its nuclear translocation and subsequent IL-2 promoter activation. The GISIT (aa 293-297) motif within U54, analogous to the PxIxIT motif present within NFAT family members and where calcineurin docks [29,30,31], is partially accountable for U54's inhibitory effects. Lastly, our results indicate that U54 is a secreted protein that can penetrate in uninfected bystander cells.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines

Human embryonic kidney 293T (293T) and Hela cell lines were obtained from ATCC and cultured in DMEM medium supplemented with 10% HI-FBS, HEPES, non essential amino acids (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO), sodium pyruvate (Wisent, Montreal, QC) and plasmocin (5 µg/ml) (Invivogen, San Diego, CA). The J-Jhan human T cell line was cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% HI-FBS.

Plasmids

The sequence coding for the tegument protein U54 of HHV-6 Z29 strain (HHV-6B) was amplified from viral DNA using primers U54 forward 5'-TACAAGTCCGGACTCAGATCTATGCAACCCGCCACTCTA -3' and U54 reverse 5'-GTTATCTAGATCCGGTGTCAATGGTGATGGTGATGATG -3' by PCR. After PCR, U54 1.6 kb band was isolated and digested with BamHI/XhoI. Then, the insert was subcloned into TOPO2.1 vector (Invitrogen, Burlington, ON) into the BamHI/XhoI sites. Finally, the U54 insert was digested with BamHI/XhoI and inserted into the BamHI/XhoI sites of the pcDNA4TO/Myc-His A (4TO) (Invitrogen, Burlington, ON) vector in frame with Myc tag to generate the pcDNA4TO-U54-Myc vector (4TO-U54). By the same procedure, U54 sequence was inserted into the pcDNA4TO-mcherry (4TO-mcherry) vector to generate pcDNA4TO-U54-mcherry (U54-mcherry) vector. Site-directed mutagenesis was used to mutate IT (aa 296-297) of U54 to AA (aa 296-297) to yield 4TO-U54mut vector. The U54 sequence was also double digested by BspEI/XhoI and isolated from the 4TO-U54 vector and then inserted into a pENTR4-eGFP (Invitrogen, Burlington, ON) plasmid with BspEI/SalI. Then, pENTR4-eGFP-U54 was recombined with the pLentiCMV hygro DEST vector (Addgene plasmid #17454) by using the Gateway LR Clonase II enzyme mix (Life Technologies inc) to yield the pLentiCMV hygro-eGFP-U54 (GFP-U54) vector. The sequence coding for the tegument protein U11 of HHV-6 Z29 strain was amplified from viral DNA using primers U11 forward 5'-GGATCCGATTTGAAAGCGCAGTCGATCCCG -3' and U11 reverse 5'-CTCGAGTCACGACGCGATCACTGACTTGTC -3' by PCR. After PCR, U11 2.5 kb band was isolated and digested with BamHI/XbaI. Then, the insert was subcloned into pENTR4-FLAG vector (Invitrogen, Burlington, ON) into the BamHI/XbaI sites. Finally, pENTR4-U11-FLAG was digested with BamHI/EcoRV and isolated U11-FLAG sequence was blunted on BamHI strand before being subcloned into 4TO vector into EcoRV site to generate the pcDNA4TO-U11-FLAG vector (4TO-U11). The pcDNA His-Max A-IE2 (IE2) [32] and pZVH14 [33] were described previously. The pAP-1-Luc, pNF- κ B-Luc, pCRE-Luc were obtained from Stratagene (Mississauga, ON), pCLN15deltaCX (IL-2-Luc) and p-NFAT-Luc (NFAT-Luc) were described previously [34].

Plasmids pREP4-NFAT1 (REP-NFAT1), pREP4-NFAT2 (REP-NFAT2) containing NFAT1 or NFAT2 coding sequences were described in previous work [35]. The sequence coding for NFAT1 was amplified from REP-NFAT1 using primers NFAT1 forward 5'-GTACCGCGGGCCCGGATGAACGCCCCCGAGCGG -3' and NFAT1 reverse 5'-GTTATCTAGATCCGGTGTACGTCTGATTTCTGGCAGGAGGTC -3' and isolated by digesting REP-NFAT1 vector with BamHI. Then, the insert was subcloned into the BamHI site of the peGFP-C3 plasmid to generate peGFP-C3-NFAT1 (NFAT1-GFP) vector. Plasmid peGFP-C1-NFAT2 (NFAT2-GFP) coding for NFAT2-GFP was obtained from Novus biologicals (Oakville, ON).

Drugs

Cyclosporin A (CsA) (LC Laboratories, Woburn, MA) is used as a calcineurin inhibitor. Ionomycin (Sigma, Saint Louis, MO) is a Ca^{2+} ionophore used as a mobile ion carrier for Ca^{2+} . TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) (Sigma, Saint Louis, MO) is a phorbol ester that binds and activates protein kinase C that will subsequently target and activate AP-1 and NF- κ B transcription factors.

Luciferase assays

293T cells were seeded at $1,25 \times 10^5$ cells per well in 12 well plates (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) 24h later, cells were transfected with 4TO, 4TO-U54, 4TO-U11, 4TO-U54mut, REP-NFAT1, REP-NFAT2, NFAT-Luc and IL-2-Luc using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Burlington, ON) and incubated at 37°C for 48h. Cells were then stimulated with TPA 25 ng/ml and ionomycin 0,5 μM for 24h before being lysed with lysis buffer 1X and cell lysates assayed for luciferase activity using a luminometer (Dynex Technologies, Chantilly, VA). BCA protein assays (Thermo Scientific, Waltham, MA) were used for normalization. J-Jhan cells (5×10^6) were transfected with 4TO, 4TO-U54 and IL-2-Luc using the T-008 program of Amaxa Nucleofector II system (Lonza, Mississauga, ON) and maintained in RPMI1640 medium at 37°C for 48h. Cells were stimulated

with TPA 25 ng/ml and ionomycin 0,5 μ M for 16h before being lysed and assayed as described above for 293T cells.

Western blot analysis

293T cells were transfected with 4TO, 4TO-U54, 4TO-U11, 4TO-U54mut, REP-NFAT1 or REP-NFAT2 plasmids using Lipofectamine 2000. To evaluate protein expression, cells were lysed in Laemmli lysis buffer 2X and boiled for 5minutes before centrifugation 1min at 13000rpm. The 52 kDa U54 and U54mut proteins were detected using a mouse monoclonal mouse anti-Myc(clone 9E10).The 100 kDa U11 protein was detected with a mouse monoclonal anti-D-tag (FLAG) (ABM, Richmond, BC), the 140 kDa NFAT1 detected with a mouse monoclonal anti-NFAT1 (25A10.D6.D2) (Novus Biologicals, Oakville, ON), the 110 kDa NFAT2 detected with a mouse monoclonal anti-NFAT2 (SC-7294) (Santa Cruz, Santa Cruz, CA) and the 43 kDa β -actin detected with a mouse monoclonal anti- β -actin (Sigma, Saint Louis, MO).

Co-ImmunoPrecipitaion assays

293T cells were seeded at $1,25 \times 10^5$ cells per well in 12 well plates and maintained in DMEM medium described above for 24h. Cells were transfected with 4TO, 4TO-U54, 4TO-U11, 4TO-U54mut and REP-NFAT1 plasmids using Lipofectamine 2000 for 48h. Cells were then stimulated with TPA 25 ng/ml and ionomycin 0,5 μ M for 15 min before being lysed with 500 μ l of RIPA lysis buffer supplemented with a cocktail of protease inhibitors (Thermo Scientific, Ottawa, ON) for 30 minutes at 4°C. Lysates were centrifuged at 10000 rpm at 4°C for 10 minutes and 450 μ l of supernatants were collected for next step while 50 μ l were added to Laemmli buffer 2X as total extract to evaluate expression of proteins of interest. Supernatants were incubated with rotation with anti-Myc, anti-FLAG, or anti-CaN (Novus Biologicals, Oakville, ON) monoclonal antibodies for 1h at 4°C before adding protein G agarose beads (Pierce, Rockford, IL) for an overnight incubation at

4°C. Beads were centrifuged at 10000 rpm at 4°C and washed with RIPA buffer four times and resuspended in 50 µl of Laemmli lysis buffer 2X for western blot analysis.

Microscopy

Fluorescence microscopy assay: HeLa cells were plated at 1×10^5 cells in 35 mm² dishes and maintained in DMEM medium described above at 37°C for 24h. Cells were transfected with 4TO-mcherry, U54-mcherry, eGFP, NFAT2-GFP and NFAT1-GFP plasmids using Lipofectamine 2000 for 48h. Then, cells were stimulated with TPA 25 ng/ml and ionomycin 0,5 µM for 15 min. 293T cells were at 1×10^5 cells in 35 mm² dishes and maintained in DMEM medium at 37°C for 48h. Then, supernatants harvested from previously transfected 293T cells with GFP, GFP-U54, 4TO-mcherry and U54-mcherry were cultured with fresh 293T cells for 16h. Finally, images were captured by a CoolSNAP HQ camera mounted on an Olympus BX-51 upright microscope using a 40X or 60X UPlan Apo objective, and processed with ImagePro 4.5.1 software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) before being analyzed GFP and RFP fluorescence.

Live cell assay: HeLa cells were plated at 1×10^5 cells in 35 mm² dishes and maintained in DMEM medium at 37°C for 24h. Cells were transfected with 4TO-mcherry, U54-mcherry and NFAT2-GFP plasmids using Lipofectamine 2000 and maintained in DMEM at 37°C for 48h. Following incubation, cells were put inside an environmental LiveCell room (Pathology Devices, Westminster, MD) at 37°C containing 5% CO₂. Images were captured with a confocal spinning disc WaveFX microscope (Quorum technologies, Guelph, ON) with a EM-CCD ImageEM C9100-13 camera (Hamamatsu photonics, Boston, MA) using a 20X HC Plan Apo 20X/0.70 Ph2 objective (Leica, Allendale, NJ). Images (GFP and mCherry) were captured before and every two minutes for 2h after TPA 25 ng/ml and ionomycin 0,5 µM. Images were analyzed using Volocity 5.2.1 software (PerkinElmer, Woodbridge, ON) to make a movie with the obtained images as well as for the quantification nuclear GFP fluorescence.

RT-PCR assay

J-Jhan cells were transfected at 5×10^6 cells per condition with 4TO or 4TO-U54 using the T-008 program of Amaxa Nucleofector system (Lonza, Mississauga, ON) and maintained in RPMI1640 medium described above at 37°C for 48h. Then, cells were stimulated with TPA 25 ng/ml and ionomycin $0,5 \mu\text{M}$ for 6h before being harvested and RNA extracted using Qiazol lysis reagent (Qiagen, Gaithersburg, MD). Retrotranscription (RT) into cDNA was carried out as described by Jaworska et al [14] One-tenth of the cDNA was used for real time PCR as described by Jaworska et al [15]. The primers used for IL-2 detection were 5'- GAA TCC CAA ACT CAC CAG GAT GCT C -3' and IL-2 reverse 5'- TAG CAC TTC CTC CAG AGG TTT GAG T -3' and GAPDH was used for normalization as described [14].

Fluorescence microplate assay

293T cells were transfected at 2×10^5 cells per condition with GFP, GFP-U54, 4TO-mcherry or U54-mcherry using Lipofectamine 2000 and maintained in DMEM medium described above for 48h. Then, supernatants were harvested and fluorescence released into supernatants were evaluated for GFP or RFP by using a Infinite 200 Pro Nanoquant microplate reader (Tecan, Morrisville, NC).

Statistical analysis

Experimental groups were compared using a one-way ANOVA followed by a Bartlett's test to show if the variances differed significantly followed by a Boneferonni's multiple comparison test. Results were considered significantly different when $P < 0.05$. Experimental groups were also compared using a two-way ANOVA followed by a Boneferonni's multiple comparison test. Results were considered significantly different when $P < 0.05$.

RESULTS

Characterization of U54 tegument protein as inhibitor of *IL-2* gene transcription

Results published by Flamand et al suggested that HHV-6 virion component(s) were likely be responsible for inhibition of *IL-2* gene expression [16]. We tested whether U11 or U54, two HHV-6 tegument proteins, could inhibit the expression of a luciferase reporter construct whose expression is dependent on the activation of NFAT, transcription factors essential for *IL-2* gene transcription. 293T cells were transfected with NFAT-LUC reporter and control (4TO), 4TO-U54 or 4TO-U11 expression vectors. Forty-eight hours later, cells were stimulated with TPA/ionomycin for an additional 24h after which the luciferase activity was determined. As determined in the first experiment, TPA/ionomycin treatment efficiently activated endogenous NFAT resulting in a 7.5x fold increase ($P < 0.0001$) on luciferase activity (figure 1A). When cells were transfected with a U54 expression vector, luciferase activity was reduced by more than 95%, equivalent to levels on non-activated cells ($P < 0.0001$). Expression of U11, a second HHV-6 tegument protein, had no significant effect of luciferase activity. Expression of both U54 and U11 proteins was monitored by western blot analysis (figure 1B). To determine if this effect of U54 is specific for NFAT, we tested whether U54 affected the expression of reporter genes driven by NF- κ B, AP-1 and cyclic AMP responsive element (CRE). Cells were transfected with U54 expression vector or known HHV-6 transactivators including the immediate-early 2 protein (IE2) and pZVH14 plasmid containing the U30 and U31 ORFs. In contrast to NFAT regulated promoters that are inhibited by U54, reporters responsive to AP-1 (figure 1C), CRE (figure 1D) and NF- κ B (figure 1E) were activated 2.5x fold to 5x fold by U54. The pZVH14 and IE2 activated these reporters 50x to 400x fold. These results suggest that U54 interferes specifically with the expression of genes that are regulated through NFAT transcription factors.

Considering that 293T cells are non-lymphoid cells lacking NFAT1 and NFAT2 expression (figure 2B and [36]), the main transcription factors associated with *IL-2* gene transcription, we have

repeated these experiments in the presence of ectopically-expressed NFAT1 and NFAT2. As presented in figure 1, in the absence of NFAT1 or NFAT2 expression, the NFAT-LUC reporter is minimally activated by TPA/ionomycin treatment. Such increase on NFAT-LUC activity is abrogated by U54 expression ($P < 0.0001$) (figure 2A). When NFAT1 or NFAT2 are expressed, the NFAT-LUC activity increases more than 900x folds in response to TPA/ionomycin treatments ($P < 0.0001$). In the absence of TPA/ionomycin treatment, the NFAT-LUC reporter was minimally activate (not shown). When NFAT1 or NFAT2 was co-expressed with U54, luciferase activity was reduced by more than 90% ($P < 0.0001$). Western blot analysis indicates that all proteins were efficiently expressed and that U54 had no significant impact on NFAT1 or NFAT2 expression (figure 2B).

We next repeated the experiment presented under figure 2A using a luciferase reporter construct driven by the more complex IL-2 promoter rather than the simpler NFAT-LUC reporter. As for NFAT-LUC, in the absence of NFAT1 or NFAT2 expression the IL-2 promoter was minimal (figure 3A). In the presence of ectopically-expressed NFAT1 or NFAT2, the IL-2-LUC reporter was activated approximately 15x folds following TPA/ionomycin treatment ($P < 0.0001$). In the presence of U54, the IL-2-LUC reporter activity was significantly inhibited ($P < 0.0001$). Western blot analysis indicates that all proteins were efficiently expressed and that U54 had no significant impact on NFAT1 or NFAT2 expression (figure 3B).

U54 protein interacts with calcineurin phosphatase enzyme that regulates NFAT activity

We analyzed the amino acid sequence of U54 and identified a motif (GISIT) that bears resemblance to the conserved PxIxIT motif (where x represents polar residues) present within NFAT family members. Considering that a peptide with the sequence VIVIT acts a potent inhibitor of NFAT activation [31], we surmised that the GISIT motif within U54 could be responsible for NFAT inhibition. Furthermore, knowing that the PxIxIT motif represents the CaN docking site

[29,30,31], we hypothesized that U54 might physically interact with CaN. Cells were transfected with control or Myc-tagged 4TO-U54 expression vector. In parallel, cells were transfected with REP-NFAT1 or FLAG-tagged 4TO-U11 expression vectors as controls. After 48 hours, cells were stimulated with TPA/ionomycin for 15 min and then endogenous CaN was immunoprecipitated using anti-CaN antibodies and protein G agarose beads followed by western blot analysis using anti-myc antibodies. The results obtained indicate that U54 co-immunoprecipitated with CaN (figure 4A) while U11 did not (figure 4B). We next tested whether U54 might interact with NFAT1. To do this, NFAT1 was expressed in the absence or in the presence of U54 or U11, as control. We separately immunoprecipitated U54 (anti-myc), CaN (anti-CaN) or U11 (anti-FLAG) and proceeded to do western blot analysis using anti-NFAT1 antibodies. As shown, U54 and U11 do not interact with NFAT1 (figure 4C). In contrast, CaN efficiently precipitated NFAT1 following TPA/ionomycin stimulation (figure 4C).

U54 inhibits phosphatase activity of calcineurin on NFAT

To migrate to the nucleus, NFAT proteins must be dephosphorylated by CaN. Considering that U54 interacts with CaN, we tested whether U54 might interfere with NFAT dephosphorylation upon cellular activation. Cells were transfected with NFAT1 expression vector together with a 4TO control or a 4TO-U54 expression vector. Half the cultures were treated with TPA/ionomycin for 15 min. Cells pretreated with CsA were used as a positive control for inhibition of NFAT dephosphorylation. As shown in figure 5, under resting condition, NFAT1 was hyperphosphorylated, as expected. In control transfected cells (4TO), TPA/ionomycin induced the dephosphorylation of NFAT1. In contrast, in the presence of U54 or CsA, NFAT1 remained hyperphosphorylated .

U54 inhibits nuclear translocation of NFAT transcriptional factors

Our results so far indicate that HHV-6 U54 can inhibit the expression of NFAT-regulated genes. To understand how this might occur, we studied NFAT1-GFP or NFAT2-GFP nuclear translocation in the absence or in the presence of U54-mcherry. We first confirmed that the U54-mcherry behaved similarly to U54-myc by demonstrating the inhibition of NFAT-luc activity in NFAT2/U54-mcherry/NFAT-luc cotransfected cells (figure 6A). Results indicate that following TPA/ionomycin stimulation 90% of NFAT2 activity is inhibited by U54-mcherry ($P < 0.0001$). Then, we transfected HeLa cells with NFAT2-GFP or NFAT1-GFP and mcherry or U54-mcherry vectors to study NFAT2-GFP or NFAT1-GFP nuclear translocation by fluorescence microscopy. Under resting conditions, NFAT2-GFP and NFAT1-GFP were mainly cytoplasmic, as expected (figure 6B and supplementary figure 1). U54-mCherry was detected in both the cytoplasm and the nucleus. In cells transfected with the mCherry, NFAT2-GFP and NFAT1-GFP efficiently translocated and accumulated in the nucleus in response to TPA/ionomycin activation. When U54-mcherry was co-expressed, NFAT2-GFP and NFAT1-GFP remained cytoplasmic following TPA/ionomycin stimulation (figure 6B). As positive control for inhibition of NFAT2-GFP and NFAT1-GFP translocation, cells were pre-incubated with CsA prior to stimulation. Under such circumstances NFAT2-GFP and NFAT1-GFP remained cytoplasmic, as expected. All these results were confirmed by live cell experiments in which we cotransfected HeLa cells with mCherry control or U54-mcherry with NFAT2-GFP. Images, movies and intranuclear GFP fluorescence measurements obtained using these assays (supplementary figure 2A, 2B and 2C respectively) indicated that in the presence of mCherry, NFAT2-GFP efficiently translocated to the nucleus during first 5 minutes following TPA/ionomycin stimulation followed by relocalizing to the cytoplasm. In contrast, in U54-mCherry transfected cells, NFAT2-GFP remained cytoplasmic at all timepoints observed remained cytoplasmic during entire experiment with U54-mcherry. These

results indicate that HHV-6 U54 inhibits IL-2 gene activation by preventing nuclear translocation of NFAT1 and NFAT2.

Involvement of U54 GISIT motif in the interaction with CaN and inhibition of phosphatase activity

Considering that U54 interacted with CaN, we tested whether the U54 GISIT motif is responsible for this interaction. We therefore mutated the GISIT motif into GISAA (figure 7A) based on previous work indicating that mutation of the IT residues within the VIVIT motif was sufficient to abrogate the inhibitory properties of the VIVIT peptide [31]. To compare the NFAT inhibitory activity of U54mut relative to U54, we performed a dose-response experiment. Cells were transfected with a sub-optimal quantity the REP-NFAT1 expression vector (a lesser amount of this vector was used on purpose to avoid saturating the system), optimal quantity of 4TO control or NFAT-Luc reporter and varying amounts of 4TO-U54 and 4TO-U54mut expression vectors. Twenty-four hours after TPA/ionomycin stimulation, the luciferase activity was determined. In cells transfected with the 4TO control vector, a 7.5x fold increase in NFAT-Luc activity was observed following stimulation. Transfection of increasing quantities of U54 lead to a dose-dependent inhibition on NFAT-Luc activity (figure 7B). The U54mut also lead to a dose-dependent reduction on NFAT-Luc activity but relative to U54, the activity of the mutant is always significantly less than U54 ($P < 0.001$ and $P < 0.01$). A gross estimate indicates that the U54mut is half as potent as U54. Tegument protein U54 and the U54mut were expressed at similar levels as verified by western blot analysis (figure 7C). These results suggest that the U54 GISIT motif plays a role in the inhibition of NFAT activation.

U54mut can not inhibit NFAT dephosphorylation as efficiently as U54

We next determined the capacity of U54mut to interact with CaN. Cells were transfected with control, and both Myc-tagged 4TO-U54 or 4TO-U54mut expression vectors. After 48 hours,

endogenous CaN was immunoprecipitated using anti-CaN antibodies and protein G agarose beads followed by western blot analysis using anti-Myc antibodies. The results obtained indicate that U54 co-immunoprecipitated with CaN as expected. The U54mut also interacted with CaN, albeit less than U54, explaining the partial NFAT inhibitory activity of the U54mut (figure 8A).

Lastly, we tested impact of U54mut on NFAT dephosphorylation. Cells were transfected with 4TO, 4TO-U54 or 4TO-U54mut expression vectors and forty-eight hours later, cells were stimulated with TPA/ionomycin for 15 minutes before being lysed and the proceeding of western blot analysis. The results revealed that NFAT1 was efficiently dephosphorylated in the presence of U54mut while remained hyperphosphorylated with U54 or following pretreatment with CsA (positive control) (figure 8B). These results confirm the importance of the U54 GISIT motif in the inhibitory effect of this tegument protein on phosphatase activity of CaN.

Inhibition of *IL-2* gene transcription by U54 tegument protein in J-Jhan T cell line

Lastly, to validate the above results in a more physiological setting, we evaluated the ability of U54 at inhibiting *IL-2* gene expression in T lymphocytes. Jjan T cells were transfected with 4TO, 4TO-U54 or 4TO-U54mut expression vectors. Forty-eight hours later, cells were treated with TPA/ionomycin for 6h before being harvested and lysed for the proceeding of RT-PCR assay. As previously determined, TPA/ionomycin treatment efficiently activated endogenous *IL-2* gene transcription resulting in a 30x fold increase ($P < 0.05$) *IL-2* mRNA (figure 9A). When cells expressed U54, the *IL-2* mRNA levels were reduced to those of resting cells ($P < 0.05$) and comparable to those CsA pretreated cells. These results confirmed the capacity of U54 to abrogate *IL-2* gene expression in T cells, the primary HHV-6 target cell type. Western blot analysis indicates that all proteins were efficiently expressed (figure 9B).

Secretion of U54 protein and penetration into bystander cells

Interestingly, during fluorescence microscopy experiments performed in figure 6, we observed RFP fluorescence in U54-mcherry wells into supernatants leading us to hypothesize a possible capacity of U54 to be secreted. To determine it, we determined the presence of U54 into supernatants. 293T cells were transfected with 4TO, 4TO-U54 and 4TO-U11 expression vectors for forty-eight hours. Then, cell lysates and supernatants were harvested and we confirmed by western blot analysis the good expression of proteins in cell lysates and we evaluated the presence of secreted proteins into supernatants. As observed, U54 was specifically secreted from transfected cells while U11 remained strictly intracellular (figure 10A). We repeated the experiment by transfecting 293T cells with 4TO, GFP, GFP-U54, mcherry and U54-mcherry for forty-eight hours. Images taken from dishes with transfected cells confirmed the good expression of proteins (supplementary figure 3A and 3B) Then, supernatants were divided in two parts, one part was used to measure GFP and RFP fluorescence witnessing protein secretion, and we detected fluorescence only into supernatants from GFP-U54 (figure 10B) and U54-mcherry (figure 10C) transfected cells. The other part was cultured with fresh uninfected 293T cells for sixteen hours. Penetration of protein in bystander cells was determined by fluorescence microscopy for GFP and RFP. The results revealed that GFP-U54 (figure 10D) and U54-mcherry (figure 10E) were able to penetrate bystander cells in little proportion.

DISCUSSION

Following primary infection of CD4⁺ T cells into a new host, HHV-6B, the etiologic agent of *Exanthem subitum* in children, is able to persist life-long with several reactivations episodes. In healthy patients, these reactivations are controlled by immune system but can lead to serious complications in immunocompromised patients. Like all herpesviruses, HHV-6 developed several

strategies of immune escape by disturbing numerous mechanisms involved in the elimination of pathogens. Some viral impacts have been reported and demonstrate the capacity of HHV-6 to disrupt cell defenses on a large scale to take the advantage. HHV-6 infection has been associated with downregulation of TCR complex by decreasing CD3 expression [9], decrease of cytotoxic elements with the induction of CD4 expression on CD8⁺ T cells [10] through activation of the CD4 promoter [11], increase anti-inflammatory cytokines (IL-10) [12], inhibition of innate immune response by shutting down interferon β production [14] and type 1 interferon signaling [15], induction of anti-inflammatory response by favoring proliferation of T regulatory type 1 cells [12], inhibiting T cell lymphoproliferative response [16] [17] and *IL-2* gene transcription [16]. All these mechanisms combined *in vivo* can lead to already observed effects in bone marrow transplant recipients that became immunocompromised for CMV specific T cell response following HHV-6 reactivation due to lymphocytopenia [18].

Flamand et al described the effect of HHV-6 on *IL-2* gene transcription and the consequences on cell proliferation following CD4⁺ T cells infection [16]. They demonstrated that a wild-type HHV-6 infectious virus could reduce by approximately 85% the amount of IL-2 mRNA or cell proliferation, but more surprisingly, similar results were obtained by using heat-inactivated and UV-irradiated viruses that were unable to replicate and induce viral *de novo* protein synthesis. These observations lead us to generate the hypothesis that suppression of *IL-2* gene transcription is caused by a structural component of HHV-6. Structure of all herpesviruses is made of three components, one external envelope, and two internal genome protections with the tegument and the nucleocapsid known to liberate their constitutive proteins following viral entry and decapsulation into infected cell. Tegument proteins of CMV, an other β -herpesvirus, were already described as potent regulators for viral replication or immunosuppression [37,38] and our work identified HHV-6 U54 tegument protein as an inhibitor of *IL-2* gene expression.

Following TCR activation, induced AP-1 increases NF- κ B p65/rel and Ca²⁺ release in the

cytoplasm, the serine/threonine calcineurin phosphatase forms a complex with calmodulin and binds to cytoplasmic phosphorylated form of NFAT (NFAT1-NFAT4) proteins and induce its dephosphorylation. Then, dephosphorylated NFAT translocate in the nucleus to specifically bind to DNA in association with other transcription factor as OCT-1 and transcript *IL-2* gene [27,39]. Nowadays, *IL-2* gene pathway is very well characterized and a lot of strategies to counteract its modulation are described [39]. There are small molecular inhibitors such as most common CsA or FK506/FKBP12 that block substrate access to the active centre of CaN [40]. There are also inhibitory peptides that can be interaction partners of calcineurin and can inhibit its activity. These peptides, as motif for CaN docking site, can be more specific than CsA or FK506 and their mode of action are to mask the active centre of CaN like CaN₄₅₇₋₄₈₂-AID and CaN₄₂₄₋₅₂₁-AID peptides [41,42] or to block CaN-NFAT interaction in the cytoplasm like mNFAT1₁₀₆₋₁₂₁-SPRIEIT or VIVIT peptides [29,31,43]. More recently, some pathogens have also been characterized with a mechanism allowing them to disrupt *IL-2* pathway such as *H.pylori* expressing VacA protein whose modes of action are not all CaN-NFAT dependent but inhibits NFAT translocation [44]. More interestingly, A238L protein of African swine fever virus has been identified as a potent inhibitor of CaN-NFAT pathway with different mechanisms of action [45]. First, it can inhibit the CREBbp/p300 transactivation leading to the suppression of acetylation and transcriptional activation of NFAT1, NF-κB and c-Jun [46], second it inhibits the activation of JNK [47,48] and third A238L contains a CaN docking site PxIxIT motif [29,31] in the fragment A238L₁₅₇₋₂₃₈ PKIITG that binds to CaN with high affinity and blocks NFAT dephosphorylation [49].

In this study, we highlighted how U54 of HHV-6 Z29 strain (HHV-6B) inhibited NFAT activity by disrupting CaN-NFAT interaction. We described these mechanisms of inhibition by identifying U54₂₉₃₋₂₉₇ GISIT motif similar to the NFAT major CaN docking site PxIxIT motif [29,31] allowing U54 to bind to CaN and compete with NFAT. This U54₂₉₃₋₂₉₇ GISIT motif is slightly different from HHV-6 GS strain (HHV-6A used by Flamand et al) U54₂₉₃₋₂₉₇ GISTT but its

higher homology to NFAT PxIxIT motif lead to a better affinity for docking CaN. We described all the steps by which NFAT activity is blocked due to U54 expression in cells. Following first experiments that allowed us to identify U54 as the target instead of other tegument proteins U11 or U30 and U31 (pZVH14) (figure 1A, C, D, E, 2A, 3A), we proved the U54-CaN interaction (figure 4A), that lead to the inhibition of NFAT1 dephosphorylation (figure 5) that that could not translocate in the nucleus (figure 6B). We then mutated U54₂₉₃₋₂₉₇ GISIT motif into U54_{Δ293-297} GISAA and demonstrated a reduced inhibitory effect of the mutant on NFAT transcriptional activity (figure 7B) or a complete recovery by not disturbing NFAT dephosphorylation when used at low concentration (figure 8A). Finally, we confirmed it by testing the promotion of *IL-2* gene transcription in a physiological J-Jhan T cell line in the presence of HHV-6B U54 protein that lead to the inhibition of *IL-2* transcripts generation following T cell stimulation (figure 9). Interestingly, we observed the capacity of U54 to be secreted from transfected cells into the supernatant and be able to penetrate into bystander cells (figure 10) to possibly exert their inhibitory effect on *IL-2* gene and favorise the environment for the virus HHV-6B. Our work described a new mechanism used by HHV-6 to prevent immune response and take the advantage against its host.

In perspective, NFAT proteins are key elements regulating numerous cell process and particularly involved in some pathologies such as cancers [50]. It could be interesting and informative to test U54 expression in cancer cell lines for two reasons. First, to possibly observe an effect on cell proliferation and second, U54 has already been characterized as an immunodominant target for HHV-6 [51] and could become a specific marker on tumorigenic cells for an immunoadoptive therapy protocol attempt [52]. These potential mechanisms need further investigations.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Canadian Institute of Health Research of Canada to LF. We thank Dr Sachiko Sato and especially Julie-Christine Lévesque who performed live cell experiment. We thank Dr Marc Pouliot who kindly provided mouse monoclonal anti-NFAT2 antibody.

LEGENDS

Figure 3.1: U54 inhibits NFAT transcriptional activity

Transcriptional activity of physiological NFAT factors was evaluated in 293T cells by luciferase assay. A) 293T cells were transfected with 4TO, 4TO-U54, 4TO-U11 and NFAT-Luc reporter plasmids for 48h before being stimulated or not with TPA|ionomycin for an additional 24h. Then luciferase activity was determined by luciferase assay and normalized with BCA assay (n=9). B) Western blot analysis confirmed the expression of proteins of interest for each condition tested. U54-Myc, U11-FLAG proteins were expressed in 4TO-U54 and 4TO-U11 conditions (upper panels). Beta-actin was included as loading control. C) Transcriptional activity of AP-1, D) CRE and E) NF- κ B were evaluated in 293T cells by luciferase assay. 293T cells were transfected with 4TO, 4TO-U54, pZVH14, IE2 and either pAP1-Luc or pCRE-Luc or pNF- κ B-Luc plasmids for 48h before being stimulated for an additional 24h. luciferase activity was determined by luciferase assay and normalized with BCA assay (n=3).

Figure 3.2: U54 inhibits ectopical NFAT1 and NFAT2 transcriptional activity

Transcriptional activity of ectopical NFAT1 and NFAT2 factors was evaluated in 293T cells by luciferase assay. A) 293T cells were transfected with 4TO, 4TO-U54, 4TO-U11, REP-NAFT1, REP-NFAT2 and NFAT-Luc reporter plasmids for 48h before being stimulated or not with TPA|ionomycin for an additional 24h. Then luciferase activity was determined by luciferase assay

and normalized with BCA assay (n=9). B) Western blot analysis confirmed the expression of proteins of interest for each condition tested. U54-Myc or U11-FLAG proteins were expressed in 4TO-U54 or 4TO-U11 conditions (upper panels) and NFAT1 or NFAT2 proteins were expressed in REP-NFAT1 or REP-NFAT2 conditions (middle panels). Beta-actin was included as loading control.

Figure 3.3: U54 inhibits ectopical NFAT1 and NFAT2 activity on IL-2 promoter

Transcriptional activity of ectopical NFAT1 and NFAT2 factors was evaluated in 293T cells by luciferase assay. A) 293T cells were transfected with 4TO, 4TO-U54, 4TO-U11, REP-NFAT1, REP-NFAT2 and IL-2-Luc reporter plasmids for 48h before being stimulated or not with TPA/ionomycin for an additional 24h. Then luciferase activity was determined by luciferase assay and normalized with BCA assay (n=9). B) Western blot analysis confirmed the expression of proteins of interest for each condition tested. U54-Myc or U11-FLAG proteins were expressed in 4TO-U54 or 4TO-U11 conditions (upper panels) and NFAT1 or NFAT2 proteins were expressed in REP-NFAT1 or REP-NFAT2 conditions (middle panels). Beta-actin was included as loading control.

Figure 3.4: U54 interacts with CaN phosphatase enzyme

Interaction between U54 and CaN was evaluated in 293T cells by co-ImmunoPrecipitation (co-IP) assay. A) 293T cells were transfected with 4TO, 4TO-U54, 4TO-U11 and REP-NFAT1 plasmids for 48h before being stimulated with TPA/ionomycin for an additional 20 min and lysed with RIPA lysis buffer. Thereafter, co-IP was performed by immunoprecipitating all conditions by anti-CaN antibody and then by blotting with anti-Myc antibody. Total extracts were used as control to verify the good expression of U54. B) Interaction between U11 and CaN or U54 was evaluated in 293T cells by co-IP. 293T cells were transfected by the same 4TO, 4TO-U54 and 4TO-U11 plasmids for 48h before being stimulated with TPA/ionomycin for an additional 20 min and lysed with RIPA lysis buffer. Then, co-IP were performed by immunoprecipitating U54 condition by anti-Myc

antibody, U11 by anti-CaN antibody and 4TO by anti-FLAG antibody as negative control before being blotted by anti-FLAG antibody. Total extracts were used as control to verify the good expression of U11. C) Interaction between NFAT1 and CaN, U54 or U11 was evaluated in 293T cells by co-IP. 293T cells were transfected with 4TO, 4TO-U54, 4TO-U11 and REP-NFAT1 plasmids for 48h before being stimulated with TPA/ionomycin for an additional 20 min and lysed with RIPA lysis buffer. Then, co-IP were performed by immunoprecipitating U54 condition by anti-Myc antibody, NFAT1 by anti-CaN antibody and U11 by anti-FLAG antibody before being blotted by anti-NFAT1 antibody. Total extracts were used as control to verify the good expression of NFAT1.

Figure 3.5: U54 inhibits dephosphorylation of NFAT1 protein by CaN

NFAT1 dephosphorylation was evaluated in 293T cells by Western blot assay. 293T cells were transfected with 4TO, 4TO-U54 and REP-NFAT1 plasmids for 48h before being stimulated with TPA/ionomycin for an additional 20 min and lysed with Laemmli lysis buffer 2X. As negative control, we pretreated 4TO condition with CsA. Then, western blot analysis was performed by blotting each condition with an anti-NFAT1 antibody specific for phosphorylated form of NFAT1 at 140 kDa (upper panel). Western blot analysis confirmed the good expression of U54 by anti-Myc blotting (middle panel). Beta-actin was included as loading control.

Figure 3.6: NFAT2-GFP nuclear translocation is inhibited in the presence of U54-mcherry

Capacity of the construction U54-mcherry to abrogate NFAT2 transcriptional activity was evaluated in 293T cells by luciferase assay. A) 293T cells were transfected with 4TO, 4TO-U54, 4TO-mcherry, U54-mcherry, REP-NFAT2 and NFAT-Luc reporter plasmids for 48h before being stimulated or not with TPA/ionomycin for an additional 24h. Then luciferase activity was determined by luciferase assay and normalized with BCA assay (n=3). B) Nuclear translocation of NFAT2-GFP was tested in HeLa cell line for fluorescence microscopy assay. HeLa cells were transfected with eGFP, 4TO-mcherry, NFAT2-GFP and U54-mcherry plasmids for 48h before

being stimulated or not with TPA/ionomycin for an additional 20 min. Then, green Fluorescence (GFP) was evaluated by FITC (41001) laser with an excitation at 460-500 nm and an emission at 510-560 nm while red fluorescence (m-cherry) was determined by PI (31005) laser with an excitation at 525-555 nm and an emission at 600-660 nm.

Figure 3.7: GISIT motif on U54 protein is important for interaction with CaN and inhibition of NFAT dephosphorylation

Mutation of GISIT motif within U54 to characterize the importance of the analogous PxIxIT motif within NFAT for docking to CaN was evaluated by luciferase assay. A) Schematic representation of CaN docking sites within NFAT1, U54 and U54mut proteins. B) 293T cells were transfected with 4TO, 4TO-U54, 4TO-U54mut, REP-NAFT1 and NFAT-Luc reporter plasmids for 48h before being stimulated or not with TPA/ionomycin for an additional 24h. Then luciferase activity was determined by luciferase assay and normalized with BCA assay (n=9). C) Western blot analysis confirmed the expression of proteins of interest for each condition tested. U54-Myc or U54mut-Myc proteins were expressed in 4TO-U54 or 4TO-U54mut conditions (upper panel) and NFAT1 protein was expressed in REP-NFAT1 conditions (middle panel). Beta-actin was included as loading control.

Figure 3.8: U54mut interacts with CaN but minimally compared to U54 and is not able to inhibit NFAT dephosphorylation

Interaction of U54 or U54mut with CaN was evaluated in 293T cells by co-IP assay. A) 293T cells were transfected with 4TO, 4TO-U54 and 4TO-U54mut plasmids for 48h before being stimulated with TPA/ionomycin for an additional 20 min and lysed with RIPA lysis buffer. Thereafter, co-IP was performed by immunoprecipitating all conditions by anti-CaN antibody and then by blotting with anti-Myc antibody. Total extracts were used as control to verify the good expression of U54 and U54mut. B) NFAT1 dephosphorylation was evaluated in 293T cells by Western blot assay.

293T cells were transfected with 4TO, 4TO-U54, 4TO-U54mut and REP-NFAT1 plasmids for 48h before being stimulated with TPA/ionomycin for an additional 20 min and lysed with Laemmli lysis buffer 2X. As negative control, we pretreated 4TO condition with CsA. Then, western blot analysis was performed by blotting each condition with an anti-NFAT1 antibody specific for phosphorylated form of NFAT1 at 140 kDa (upper panel). Western blot analysis confirmed the good expression of U54 and U54mut by anti-Myc blotting (middle panel). Beta-actin was included as loading control.

Figure 3.9: U54 abrogates *IL-2* gene transcription in J-Jhan T cell line

Inhibition of *IL-2* gene transcription by U54 was determined in a physiological J-Jhan T cell line for *IL-2* expression by RT-PCR assay. A) J-Jhan cells were transfected with 4TO, 4TO-U54 and 4TO-U54mut plasmids for 48h before being stimulated with TPA/ionomycin for an additional 6 h and lysed using Qiazol lysis reagent. Then, cells were RNA extracted and RT was performed to obtain cDNA that were tested with specific primers to evaluate target transcription. Primers used are *IL-2* forward 5'- GAA TCC CAA ACT CAC CAG GAT GCT C -3' and *IL-2* reverse 5'- TAG CAC TTC CTC CAG AGG TTT GAG T -3' while primers used for GAPDH are described in Jaworska et al[14] . B) Western blot analysis confirmed the good expression of U54 and U54mut by anti-Myc blotting. Beta-actin was included as loading control.

Figure 3.10: U54 is secreted from transfected cells

Secretion of U54 protein was evaluated in both 293T cells lysates and supernatants by western blot analysis and GFP or mcherry fluorescence. A) 293T cells were transfected with 4TO, 4TO-U54 and 4TO-U11 plasmids for 48h. Then, supernatants were harvested and analyzed by western blot to evaluate U54 or U11 presence by anti-Myc and anti-FLAG blotting. Beta-actin was included as loading control.

Supplementary figure 3.1 : NFAT1-GFP nuclear translocation is inhibited in the presence of U54-mcherry

Nuclear translocation of NFAT1-GFP was tested in HeLa cell line by fluorescence microscopy assay. HeLa cells were transfected with eGFP, 4TO-mcherry, NFAT1-GFP and U54-mcherry plasmids for 48h before being stimulated or not with TPA/ionomycin for an additional 15 min. Then, green Fluorescence (GFP) was evaluated by FITC (41001) laser with an excitation at 460-500 nm and an emission at 510-560 nm while red fluorescence (m-cherry) was determined by PI (31005) laser with an excitation at 525-555 nm and an emission at 600-660 nm.

Supplementary figure 3.2 : U54-mcherry favors NFAT2-GFP cytoplasmic location

Nuclear translocation of NFAT2-GFP was tested in HeLa cell line by live cell microscopy assay. A) HeLa cells were transfected with NFAT2-GFP and 4TO-mcherry or – B) U54-mcherry, plasmids for 48h. An image of the cell culture was taken as control for cytoplasmic NFAT2-GFP location before being stimulated with TPA/ionomycin for an additional 1h min. During stimulation timecourse, images were taken every 2 minutes by using lasers with a wavelength at 491 nm and 561nm. Emission filters are 536/40 nm (GFP) and 593/40 nm (RFP) (Semrock, Rochester, NY). Following stimulation, images were taken individually every 2 min to make pictures or were compiled in Volocity 5.2.1 3D image analysis software (PerkinElmer, Woodbridge, ON) to make movies with ImageJ software (NIH, Bethesda, MD). C) Images from both experiments 4TO-mcherry/NFAT2-GFP and U54-mcherry/NFAT2-GFP were analyzed with ImageJ software to quantify GFP fluorescence following TPA/ionomycin stimulation for 1h. GFP fluorescence represents intranuclear presence of NFAT2-GFP. Images were selected 3 min before stimulation and then at 3, 15 and 30 min following TPA/ionomycin adding.

REFERENCE LIST

1. Ablashi DV, Balachandran N, Josephs SF, Hung CL, Krueger GR, et al. (1991) Genomic polymorphism, growth properties, and immunologic variations in human herpesvirus-6 isolates. *Virology* 184: 545-552.
2. Adams MJ, Carstens EB Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2012). *Arch Virol* 157: 1411-1422.
3. Salahuddin SZ, Ablashi DV, Markham PD, Josephs SF, Sturzenegger S, et al. (1986) Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science* 234: 596-601.
4. Lopez C, Pellett P, Stewart J, Goldsmith C, Sanderlin K, et al. (1988) Characteristics of human herpesvirus-6. *J Infect Dis* 157: 1271-1273.
5. 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.
6. Scheurer ME, Pritchett JC, Amirian ES, Zemke NR, Lusso P, et al. HHV-6 encephalitis in umbilical cord blood transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Bone Marrow Transplant* 48: 574-580.
7. Lusso P, Markham PD, Tschachler E, di Marzo Veronese F, Salahuddin SZ, et al. (1988) In vitro cellular tropism of human B-lymphotropic virus (human herpesvirus-6). *J Exp Med* 167: 1659-1670.
8. Takahashi K, Sonoda S, Higashi K, Kondo T, Takahashi H, et al. (1989) Predominant CD4 T-lymphocyte tropism of human herpesvirus 6-related virus. *J Virol* 63: 3161-3163.
9. Lusso P, Malnati M, De Maria A, Balotta C, DeRocco SE, et al. (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.
10. Lusso P, De Maria A, Malnati M, Lori F, DeRocco SE, et al. (1991) Induction of CD4 and susceptibility to HIV-1 infection in human CD8+ T lymphocytes by human herpesvirus 6. *Nature* 349: 533-535.
11. Flamand L, Romerio F, Reitz MS, Gallo RC (1998) CD4 promoter transactivation by human herpesvirus 6. *J Virol* 72: 8797-8805.
12. Wang F, Yao K, Yin QZ, Zhou F, Ding CL, 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.
13. Grivel JC, Ito Y, Faga G, Santoro F, Shaheen F, et al. (2001) Suppression of CCR5- but not CXCR4-tropic HIV-1 in lymphoid tissue by human herpesvirus 6. *Nat Med* 7: 1232-1235.

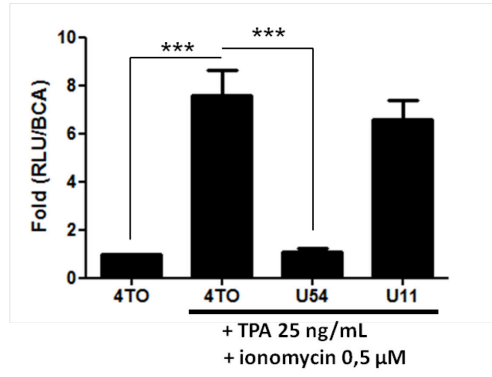
14. Jaworska J, Gravel A, Fink K, Grandvaux N, Flamand L (2007) Inhibition of transcription of the beta interferon gene by the human herpesvirus 6 immediate-early 1 protein. *J Virol* 81: 5737-5748.
15. Jaworska J, Gravel A, Flamand L Divergent susceptibilities of human herpesvirus 6 variants to type I interferons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 8369-8374.
16. 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.
17. Horvat RT, Parmely MJ, Chandran B (1993) Human herpesvirus 6 inhibits the proliferative responses of human peripheral blood mononuclear cells. *J Infect Dis* 167: 1274-1280.
18. Wang FZ, Larsson K, Linde A, Ljungman P (2002) Human herpesvirus 6 infection and cytomegalovirus-specific lymphoproliferative responses in allogeneic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 30: 521-526.
19. Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo R (1976) Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 193: 1007-1008.
20. Gillis S, Smith KA (1977) Long term culture of tumour-specific cytotoxic T cells. *Nature* 268: 154-156.
21. Malek TR (2008) The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol* 26: 453-479.
22. Serfling E, Avots A, Neumann M (1995) The architecture of the interleukin-2 promoter: a reflection of T lymphocyte activation. *Biochim Biophys Acta* 1263: 181-200.
23. Jain J, Loh C, Rao A (1995) Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr Opin Immunol* 7: 333-342.
24. Shaw J, Meerovitch K, Bleackley RC, Paetkau V (1988) Mechanisms regulating the level of IL-2 mRNA in T lymphocytes. *J Immunol* 140: 2243-2248.
25. Boise LH, Petryniak B, Mao X, June CH, Wang CY, et al. (1993) The NFAT-1 DNA binding complex in activated T cells contains Fra-1 and JunB. *Mol Cell Biol* 13: 1911-1919.
26. Macian F (2005) NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* 5: 472-484.
27. Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A (2003) Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* 17: 2205-2232.
28. Serfling E, Berberich-Siebelt F, Chuvpilo S, Jankevics E, Klein-Hessling S, et al. (2000) The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1498: 1-18.

29. Aramburu J, Garcia-Cozar F, Raghavan A, Okamura H, Rao A, et al. (1998) Selective inhibition of NFAT activation by a peptide spanning the calcineurin targeting site of NFAT. *Mol Cell* 1: 627-637.
30. Garcia-Cozar FJ, Okamura H, Aramburu JF, Shaw KT, Pelletier L, et al. (1998) Two-site interaction of nuclear factor of activated T cells with activated calcineurin. *J Biol Chem* 273: 23877-23883.
31. Aramburu J, Yaffe MB, Lopez-Rodriguez C, Cantley LC, Hogan PG, et al. (1999) Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A. *Science* 285: 2129-2133.
32. Tomoiu A, Gravel A, Tanguay RM, Flamand L (2006) Functional interaction between human herpesvirus 6 immediate-early 2 protein and ubiquitin-conjugating enzyme 9 in the absence of sumoylation. *J Virol* 80: 10218-10228.
33. Josephs SF, Salahuddin SZ, Ablashi DV, Schachter F, Wong-Staal F, et al. (1986) Genomic analysis of the human B-lymphotropic virus (HBLV). *Science* 234: 601-603.
34. Northrop JP, Ullman KS, Crabtree GR (1993) Characterization of the nuclear and cytoplasmic components of the lymphoid-specific nuclear factor of activated T cells (NF-AT) complex. *J Biol Chem* 268: 2917-2923.
35. Hoey T, Sun YL, Williamson K, Xu X (1995) Isolation of two new members of the NF-AT gene family and functional characterization of the NF-AT proteins. *Immunity* 2: 461-472.
36. Macian F, Garcia-Rodriguez C, Rao A (2000) Gene expression elicited by NFAT in the presence or absence of cooperative recruitment of Fos and Jun. *EMBO J* 19: 4783-4795.
37. Kalejta RF (2008) Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiol Mol Biol Rev* 72: 249-265, table of contents.
38. Tomtishen JP, 3rd Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). *Virol J* 9: 22.
39. Sieber M, Baumgrass R (2009) Novel inhibitors of the calcineurin/NFATc hub - alternatives to CsA and FK506? *Cell Commun Signal* 7: 25.
40. Fruman DA, Klee CB, Bierer BE, Burakoff SJ (1992) Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 3686-3690.
41. Sagoo JK, Fruman DA, Wesselborg S, Walsh CT, Bierer BE (1996) Competitive inhibition of calcineurin phosphatase activity by its autoinhibitory domain. *Biochem J* 320 (Pt 3): 879-884.

42. Perrino BA (1999) Regulation of calcineurin phosphatase activity by its autoinhibitory domain. *Arch Biochem Biophys* 372: 159-165.
43. Roehrl MH, Kang S, Aramburu J, Wagner G, Rao A, et al. (2004) Selective inhibition of calcineurin-NFAT signaling by blocking protein-protein interaction with small organic molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 7554-7559.
44. Gebert B, Fischer W, Weiss E, Hoffmann R, Haas R (2003) *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science* 301: 1099-1102.
45. Miskin JE, Abrams CC, Goatley LC, Dixon LK (1998) A viral mechanism for inhibition of the cellular phosphatase calcineurin. *Science* 281: 562-565.
46. Granja AG, Perkins ND, Revilla Y (2008) A238L inhibits NF-ATc2, NF-kappa B, and c-Jun activation through a novel mechanism involving protein kinase C-theta-mediated up-regulation of the amino-terminal transactivation domain of p300. *J Immunol* 180: 2429-2442.
47. Matsuda S, Shibasaki F, Takehana K, Mori H, Nishida E, et al. (2000) Two distinct action mechanisms of immunophilin-ligand complexes for the blockade of T-cell activation. *EMBO Rep* 1: 428-434.
48. Granja AG, Nogal ML, Hurtado C, Vila V, Carrascosa AL, et al. (2004) The viral protein A238L inhibits cyclooxygenase-2 expression through a nuclear factor of activated T cell-dependent transactivation pathway. *J Biol Chem* 279: 53736-53746.
49. Miskin JE, Abrams CC, Dixon LK (2000) African swine fever virus protein A238L interacts with the cellular phosphatase calcineurin via a binding domain similar to that of NFAT. *J Virol* 74: 9412-9420.
50. Muller MR, Rao A NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nat Rev Immunol* 10: 645-656.
51. Nastke MD, Becerra A, Yin L, Dominguez-Amorocho O, Gibson L, et al. Human CD4+ T cell response to human herpesvirus 6. *J Virol* 86: 4776-4792.
52. Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME (2008) Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 8: 299-308.

Figure 1

A)



B)

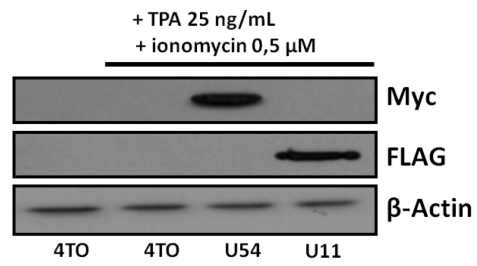
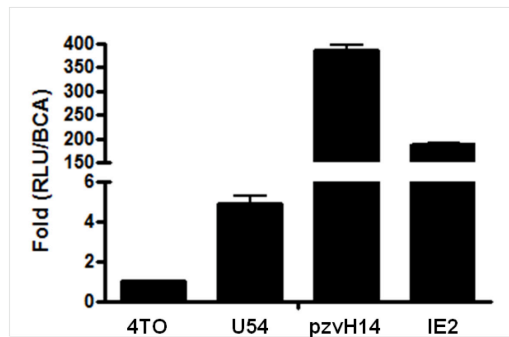
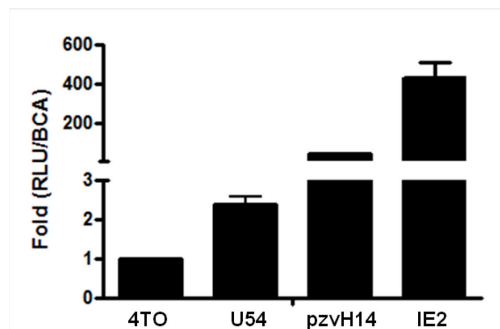


Figure 1

C)



D)



E)

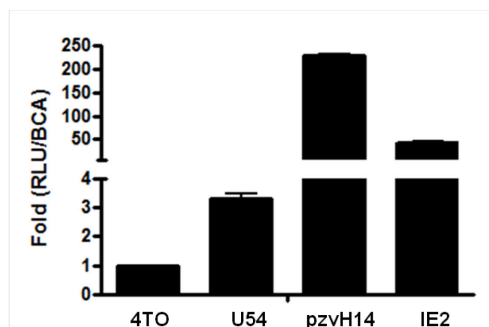
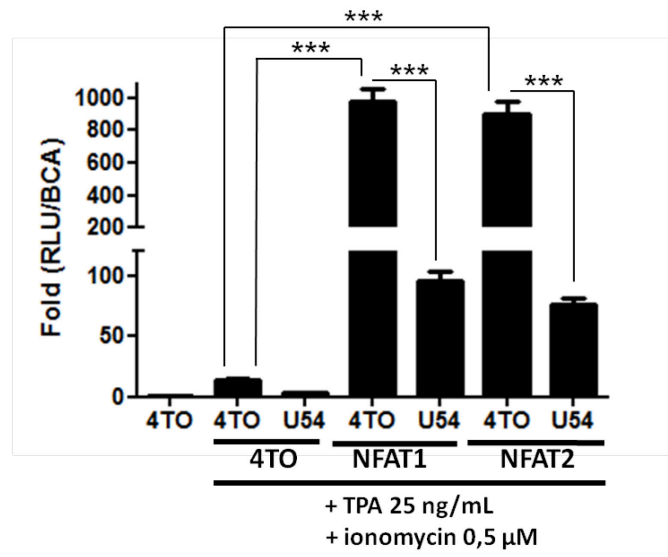


Figure 2

A)



B)

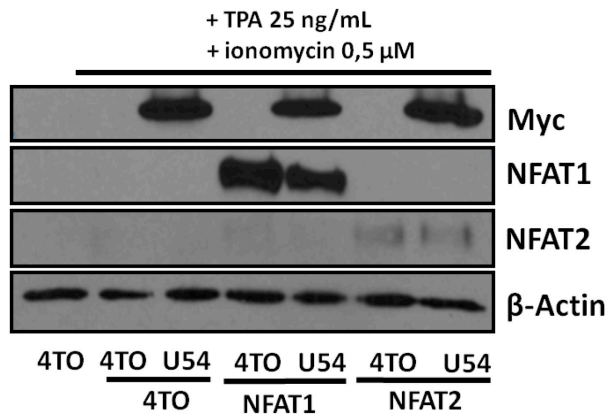
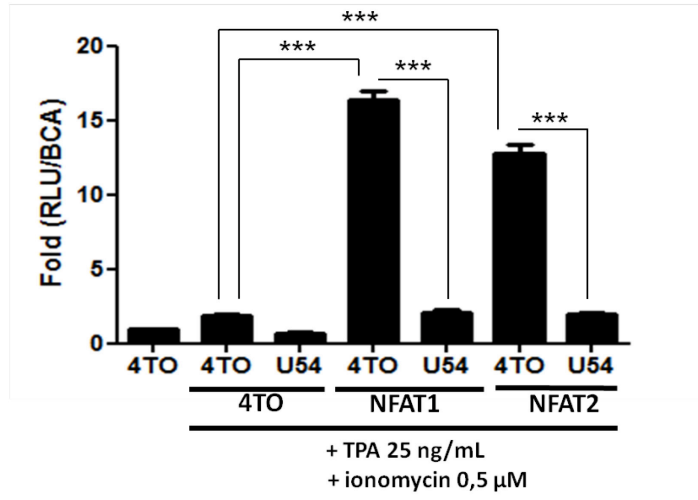


Figure 3

A)



B)

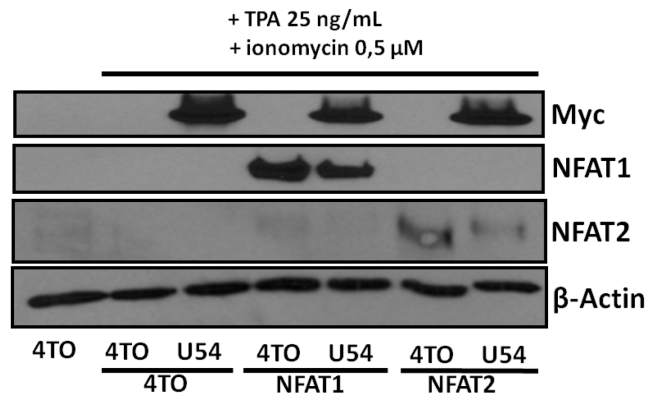
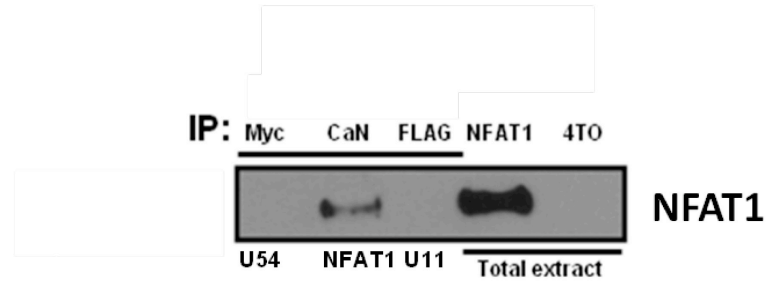
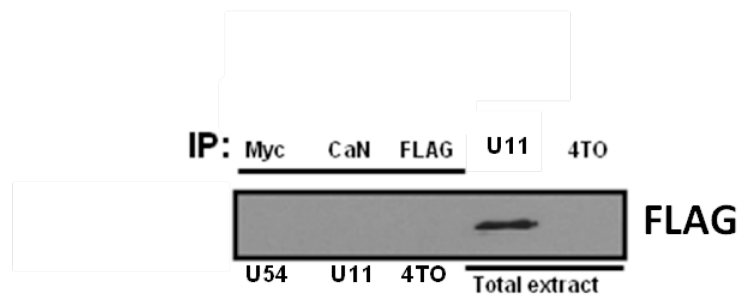


Figure 4

A)



B)



C)

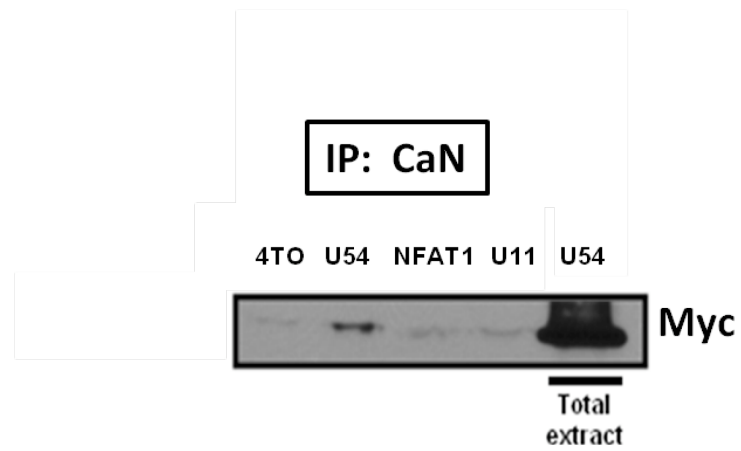


Figure 5

A)

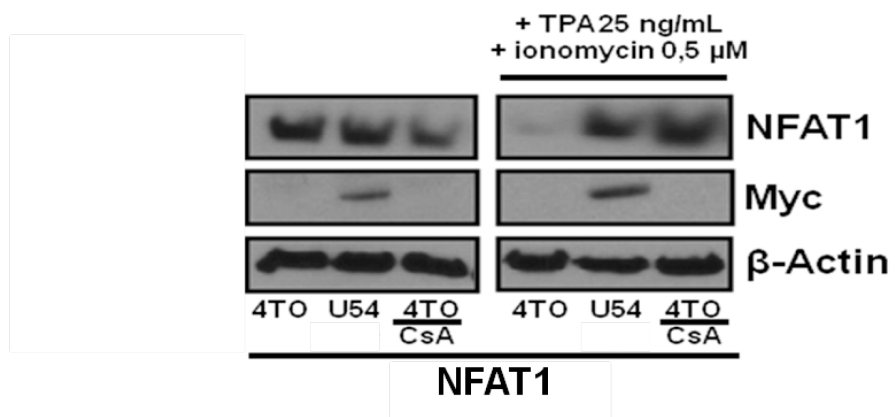
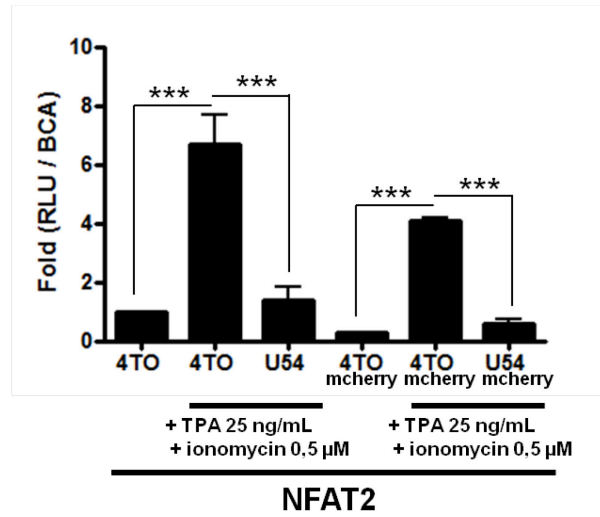


Figure 6

A)



B)

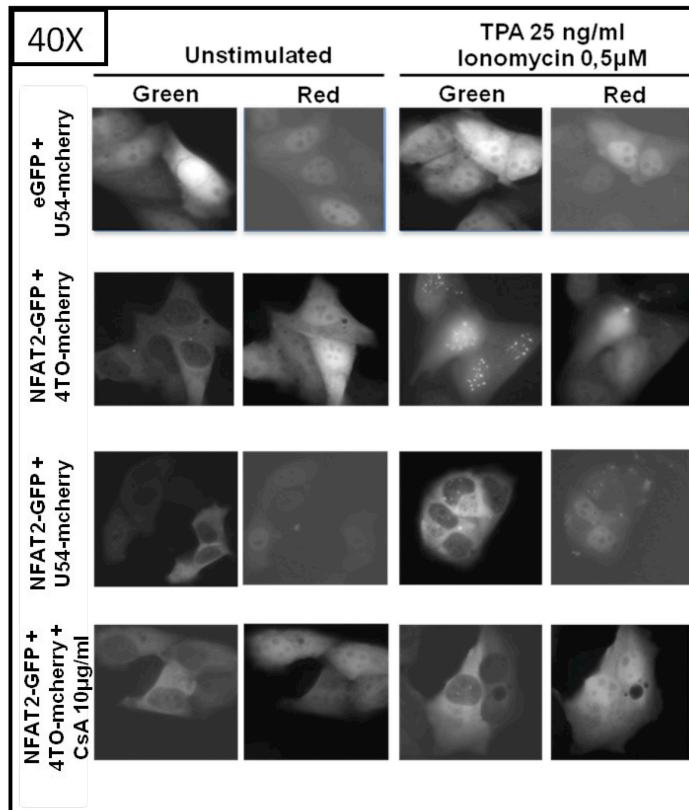
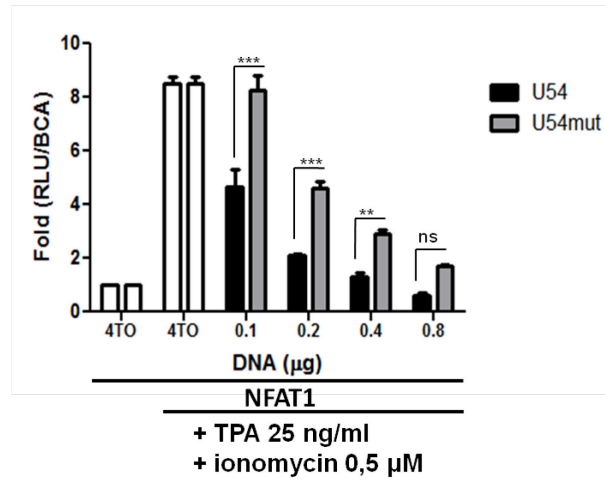


Figure 7

A)



B)



C)

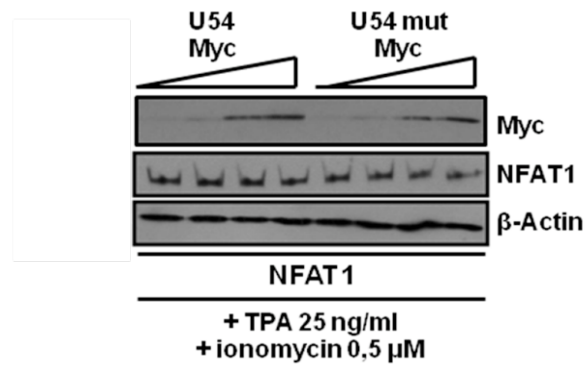
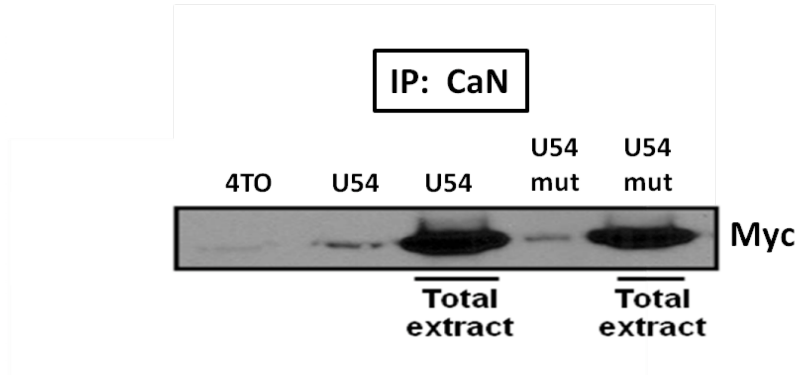


Figure 8

A)



B)

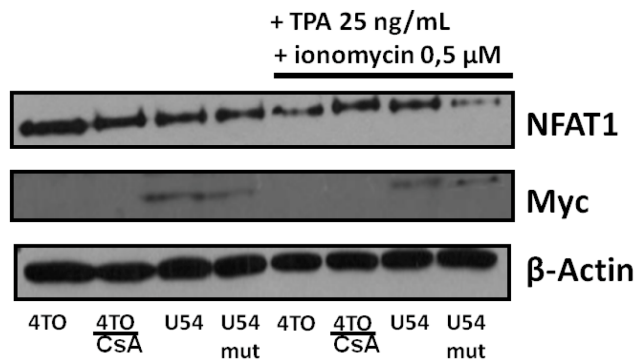
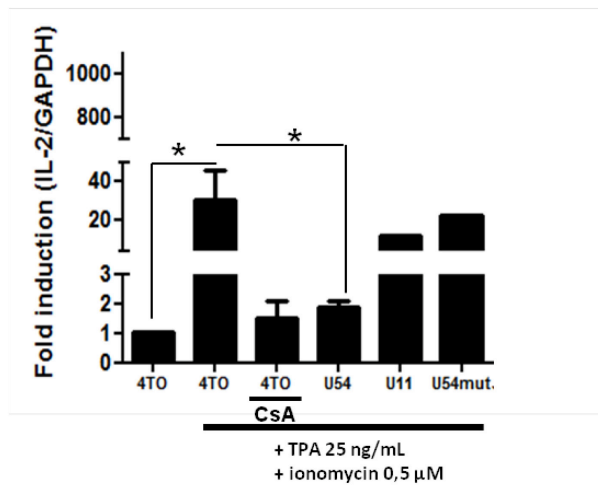


Figure 9

A)



B)

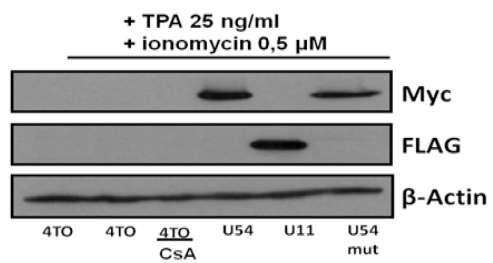
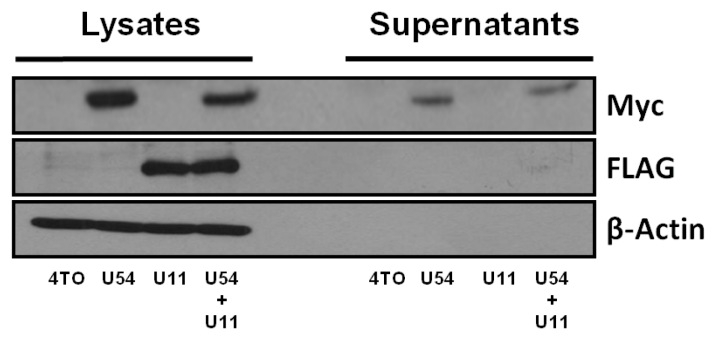


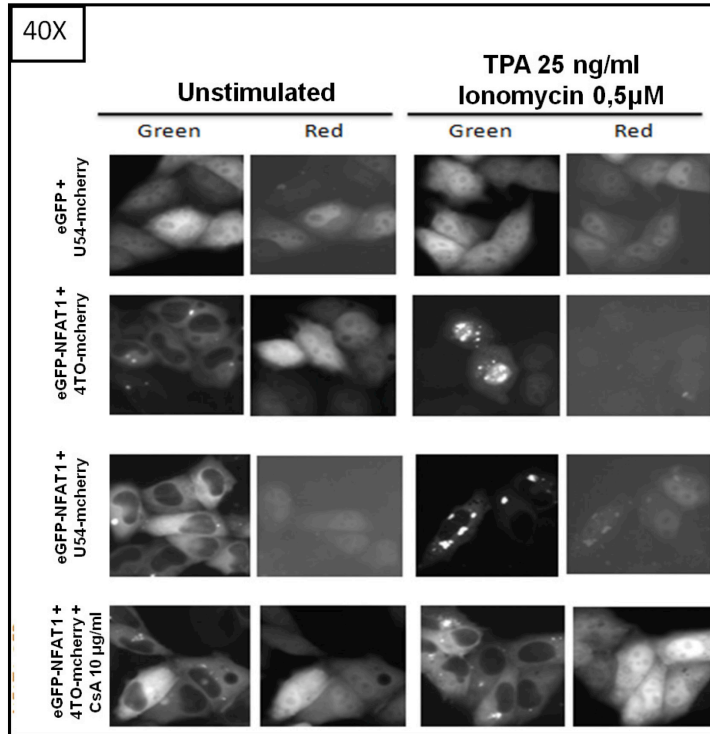
Figure 10

A)



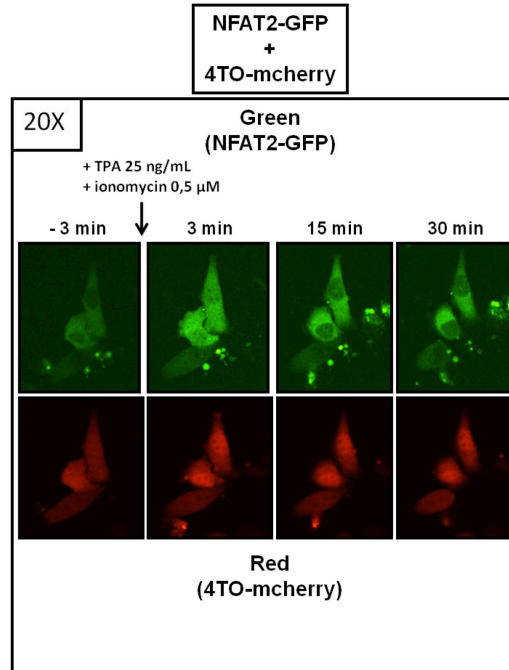
Supplementary figure 1

A)

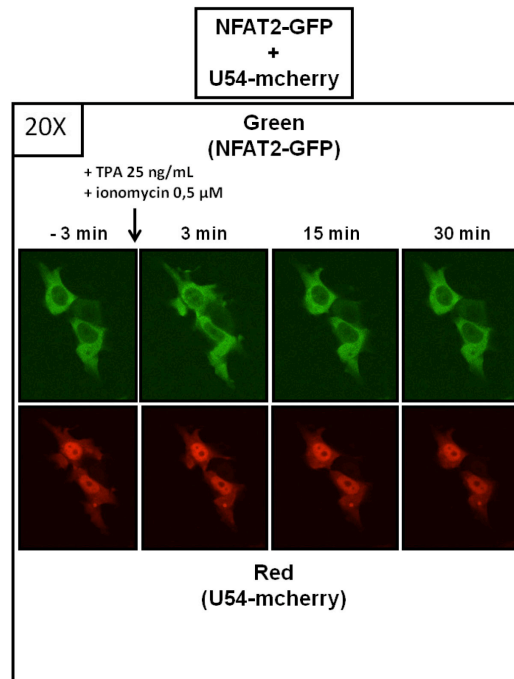


Supplementary figure 2

A)

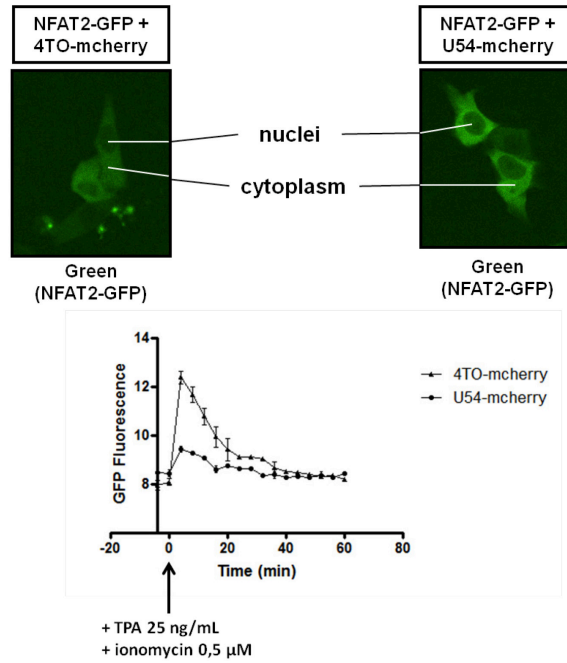


B)



Supplementary figure 2

C)



Le chapitre 4 contient le texte de l'article intitulé « Disturbance of Calcineurin/NFAT pathway by HHV-6 U54 tegument protein in cancer cell proliferation » écrit par Iampietro M, Gravel A, Flamand L. L'article a été soumis au journal *Journal of virology* en 2013.

Chapitre 4: U54 inhibe la prolifération cellulaire d'une lignée de cancer du sein via l'inhibition de la voie CaN/NFAT

HHV-6 est un des microbes les mieux adaptés à l'organisme humain. En effet, il possède un panel de protéines lui permettant de prendre le dessus sur la réponse immunitaire de la personne infectée et de pouvoir persister tout au long de la vie de l'hôte. Dans le chapitre 3, nous avons identifié la protéine U54 comme inhibitrice de la voie CaN/NFAT dont la progression du cancer du sein est dépendante, notamment pour la prolifération cellulaire ainsi que la migration et l'invasion des cellules tumorales. Dans une lignée de cellule de cancer du sein MCF-7 transfectées par U54, nous avons pu caractériser une diminution de la prolifération d'environ 30% au bout de 4 jours de culture. Nous avons également vérifié l'inhibition de la déphosphorylation des facteurs NFAT1 exprimés de manière transitoire dans les cellules MCF-7 par U54. Cette étude détermine le rôle inhibiteur de la protéine U54 sur la prolifération de cellules tumorales, donc un mécanisme anti-cancéreux qu'il serait intéressant d'approfondir. De plus, théoriquement, la transfection de U54 dans des cellules cancéreuses de sein permettrait l'apprêtement antigénique de la protéine et ainsi de pouvoir éliminer spécifiquement ces cellules en cultivant des CTL anti-U54 avec des cellules MCF-7 présentant les épitopes viraux à leur surface.

Disturbance of Calcineurin/NFAT pathway by HHV-6 U54 tegument protein in MCF-7 breast cancer cell proliferation

Running title: Inhibition of MCF-7 cells proliferation by HHV-6 U54 protein

Mathieu Iampietro¹, Annie Gravel¹, Louis Flamand^{1,2}

¹ Division of Infectious Diseases and Immunity, CHU de Quebec Research Center, Quebec city, Canada; ² Department of Microbiology, Infectious Diseases and Immunology, Faculty of Medicine, Laval University, Quebec city, Canada.

Address correspondence to: Louis Flamand PhD MBA

Division of Infectious Disease and Immunity,

Room T1-49

CHU de Quebec Research Center,

Quebec city, Canada

G1V 4G2

Tel: 418-525-4444 (x46164)

Fax: 418-654-2765

Email: Louis.flamand@crchul.ulaval.ca

ABSTRACT

Nuclear factor of activated T cells (NFAT) proteins are key regulators involved in multiple physiological mechanisms such as immune response or cell growth. Selective calcineurin /NFAT inhibitors already demonstrated their capacity to decrease NFAT-dependent cancer cell progression, particularly in breast cancer. In this study, we demonstrated the role of U54 tegument protein of Human Herpesvirus 6B (HHV-6B) in inhibiting MCF-7 breast cancer cell line proliferation by abrogating NFAT activity.

The family of NFAT transcription factors is composed of five elements (NFAT1-NFAT5) [1,2] out of which four of them are regulated by Ca^{2+} (NFAT1-NFAT4) [3,4]. In resting cells, NFAT proteins are hyperphosphorylated and remain cytoplasmic while following stimulation and Ca^{2+} release, they become active and enhance a broad range of gene expression in the nucleus [5,6]. To be activated, NFAT proteins interact with the Ca^{2+} /calmodulin-dependent serine phosphatase calcineurin (CaN) on its CaN specific docking sites PxIxIT or LxVP [7] and are dephosphorylated on their phosphoserine motifs leading to their nuclear translocation and DNA binding to regulate multiple cellular process [8,9].

Disorders of CaN/NFAT pathway have already been characterized for leading to disturbance of adaptive immune response, cell differentiation or cell proliferation [10]. Nowadays, some selective inhibitors are known to prevent CaN/NFAT interaction [11] and subsequent NFAT activation. These include drugs like cyclosporine A (CsA) [12] and FK506 (Tacrolimus) [13] or inhibitory peptides similar such as VIVIT, resembling NFAT PxIxIT CaN docking site, are effective CaN inhibitors [14,15]. Proteins expressed by pathogens, such as A238L protein of African swine fever virus that possesses a motif similar to PxIxIT (A238L₂₀₀₋₂₁₃) also inhibit CaN [16,17]. Recently, Iampietro et al identified HHV-6B U54 tegument protein, also possessing a GISIT₂₉₃₋₂₉₇ CaN binding domain inhibiting CaN/NFAT interaction and preventing NFAT activation and

subsequent *IL-2* gene expression (include ref.). We now evaluated the effects of U54 on the proliferation of cancer cells relying on constitutively activated NFAT for sustained growth.

Breast cancer is the leading cause of cancer death in women worldwide [18] and is caused by disturbance of NFAT activity [19,20] by promoting cell transformation, proliferation, invasion and tumor angiogenesis [21]. We used the MCF-7 breast cancer cell line as a representative of breast cancer cells to test whether blockade of NFAT activation by HHV-6B U54 protein could inhibit cell proliferation. To achieve this goal, MCF-7 cells (2×10^5) were transfected with expression vectors pcDNA4TO (4TO), pcDNA4TO-U54-Myc (4TO-U54), pcDNA4TO-U54mut-Myc (4TO-U54mut), pcDNA4TO-U11-FLAG (4TO-U11) and pNFAT-Luc (NFAT-Luc) reporter plasmids (described in Iampietro et al) for 48h before being stimulated or not with TPA 25 ng/ml and ionomycin 0.5 μ M (TPA/ionomycin) for an additional 24h. Then, luciferase activity was determined and normalized with BCA assay (n=4).. TPA/ionomycin treatment efficiently activated endogenous NFAT resulting in a 5x fold increase ($P < 0.0001$) in luciferase activity (figure 1A). When cells were transfected with a U54 expression vector, luciferase activity was reduced by more than 70%, almost equivalent to levels on non-activated cells ($P < 0.0001$). Cells treated with CsA 5 μ g/ml were used as positive control for NFAT blockade. Expression of U11, a second HHV-6 tegument protein, had no significant effect while U54mut had a marginal effect on luciferase activity. Expression of U54, U54mut and U11 proteins was monitored by western blot analysis (figure 1B) as described (ref) . Beta-actin was included as loading control. Having confirmed that U54 can inhibit NFAT in breast cancer cells, we next whether this effect has repercussion on cell proliferation. We transfected 293T and MCF-7 cells (1×10^5) with same plasmids and same procedure as above except that cells were not activated by TPA/ionomycin treatment. . 293T cells, were used as control cells in which proliferation is not dependent on NFAT activity. Cells were counted every 24h for four days using an automatic cellometer auto T4 cell counter (Nexcelcom, Lawrence, MA). After 72h and 96h, MCF-7 cells transfected with 4TO, U54mut and U11 grew

significantly with a 4,5x fold and 7,5x fold increase respectively ($P < 0.0001$) (n=4) (figure 2A). In contrast, after 72h and 96h U54-transfected cells proliferated significantly less ($P < 0.001$) (n=4) (figure 2A). Cells treated with CsA 5 $\mu\text{g/ml}$ were used as positive control. In contrast to MCF-7 cells, expression of U54 had no negative impact of 293T cell proliferation (figure 2B). In fact, transfection of U54, U54mut and U11 caused a slight increase in cell proliferation. Expression of U54, U54mut and U11 proteins was monitored by western blot analysis (figure 2C). Beta-actin was included as loading control. Lastly, we verified the role of U54 protein in the inactivation of NFAT leading to cell growth inhibition. To highlight this mechanism, we analyzed phosphorylation status of ectopically expressed NFAT1 detected using a mouse monoclonal anti-NFAT1 detecting the hyperphosphorylated form of NFAT1 (140 kDa) by western blot analysis. We transfected MCF-7 cells ($1,5 \times 10^5$) with 4TO, 4TO-U54, 4TO-U11, 4TO-U54mut and pREP-NFAT1 (REP-NFAT1) for 48h before being stimulated or not with TPA/ionomycin for an additional 10 min. Cells pretreated with CsA 5 $\mu\text{g/ml}$ were used as a positive control for inhibition of NFAT dephosphorylation. As shown in figure 3, under resting condition, NFAT1 was hyperphosphorylated as expected. In control transfected cells (4TO), TPA/ionomycin induced the dephosphorylation of NFAT1. Such NFAT dephosphorylation was observed in the presence of U11 and U54mut. In contrast, in the presence of U54 or CsA, NFAT1 remained hyperphosphorylated (figure 3). Beta-actin was included as loading control. These results confirm the capacity of HHV-6B U54 protein to abrogate NFAT activation and subsequent MCF-7 breast cancer cell line proliferation.

In a previous work, we identified HHV-6B U54 tegument protein as a new viral protein preventing CaN/NFAT pathway that favoured immune escape and viral infection. In this study, we confirmed this mechanism by highlighting the capacity of U54 to limit breast cancer cell proliferation. For several years, cancer immunotherapy protocols have demonstrated success against lymphoproliferative disorders [22]. Although EBV transformed cells expressing viral antigens can be targeted and killed by specific cytotoxic T cells [23,24], immunotherapy against solid tumors

such as breast cancer remains a challenge. Being identified as an immunodominant target against HHV-6B [25,26], U54 could give a double advantage to immune response directed against breast cancer by diminishing cell proliferation, migration or invasion [19,20,21] and specifically mark cells for an adoptive immunotherapy protocol. Nevertheless, some studies need further investigation to finalize a reliable technique of gene therapy allowing specific targeting of breast cancer cells to induce viral gene expression.

LEGENDS

Figure 4.1: U54 inhibits endogenous NFAT transcriptional activity in MCF-7 cells

Transcriptional activity of physiological NFAT factors was evaluated in 293T cells by luciferase assay. A) 293T cells were transfected with 4TO, 4TO-U54, 4TO-U11, 4TO-U54mut and NFAT-Luc reporter plasmids for 48h before being stimulated or not with TPA/ionomycin for an additional 24h. As positive control, we pretreated 4TO condition with CsA. Then luciferase activity was determined by luciferase assay and normalized with BCA assay (n=6). B) Western blot analysis confirmed the expression of proteins of interest for each condition tested. U54-Myc, U11-FLAG and U54mut-Myc proteins were expressed in 4TO-U54, 4TO-U11 and 4TO-U54mut conditions (upper panels). Beta-actin was included as loading control.

Figure 4.2: U54 specifically abrogates MCF-7 breast cancer cells growth

Proliferation of 293T and MCF-7 cell lines were evaluated by counting assay. B) 293T cells and – A) MCF-7 cells were transfected with 4TO, 4TO-U54, 4TO-U11 and 4TO-U54mut plasmids for 96h. As positive control, we pretreated 4TO condition with CsA. Cells were harvested and evaluated at 24h, 48h, 72h and 96h following transfection by cell counting assay (n=4). C) Western blot analysis confirmed the expression of proteins of interest for each condition tested. U54-Myc, U11-FLAG and U54mut-Myc proteins were expressed in 4TO-U54, 4TO-U11 and 4TO-U54mut conditions (upper panels). Beta-actin was included as loading control.

Figure 4.3: U54 inhibits dephosphorylation of NFAT1 protein by CaN

NFAT1 dephosphorylation was evaluated in MCF-7 cells by Western blot assay. A) MCF-7 cells were transfected with 4TO, 4TO-U54, 4TO-U11, 4TO-U54mut and REP-NFAT1 plasmids for 48h before being stimulated with TPA/ionomycin for an additional 10 min and lysed with Laemmli lysis buffer 2X. As negative control, we pretreated 4TO condition with CsA. Then, western blot analysis was performed by blotting each condition with an anti-NFAT1 antibody specific for phosphorylated

form of NFAT1 at 140 kDa (upper panel). Western blot analysis confirmed the good expression of U54 or U54mut by anti-Myc blotting and U11 by anti-FLAG blotting (middle panels). Beta-actin was included as loading control.

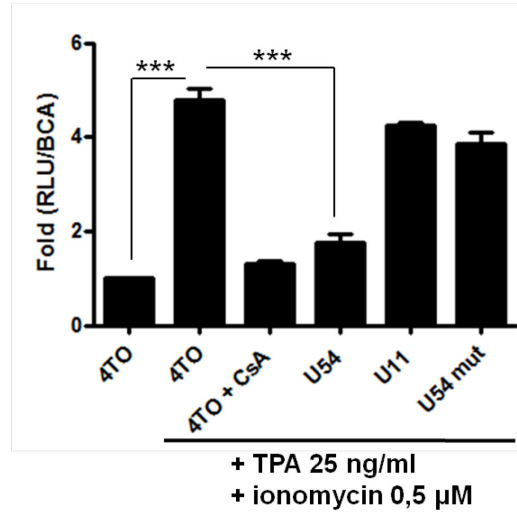
REFERENCE LIST

1. Graef IA, Gastier JM, Francke U, Crabtree GR (2001) Evolutionary relationships among Rel domains indicate functional diversification by recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5740-5745.
2. Chytil M, Verdine GL (1996) The Rel family of eukaryotic transcription factors. *Curr Opin Struct Biol* 6: 91-100.
3. Feske S, Draeger R, Peter HH, Rao A (2000) Impaired NFAT regulation and its role in a severe combined immunodeficiency. *Immunobiology* 202: 134-150.
4. Feske S, Giltneane J, Dolmetsch R, Staudt LM, Rao A (2001) Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nat Immunol* 2: 316-324.
5. Rao A, Luo C, Hogan PG (1997) Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 15: 707-747.
6. Serfling E, Berberich-Siebelt F, Chuvpilo S, Jankevics E, Klein-Hessling S, et al. (2000) The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1498: 1-18.
7. Garcia-Cozar FJ, Okamura H, Aramburu JF, Shaw KT, Pelletier L, et al. (1998) Two-site interaction of nuclear factor of activated T cells with activated calcineurin. *J Biol Chem* 273: 23877-23883.
8. Crabtree GR, Olson EN (2002) NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* 109 Suppl: S67-79.
9. Graef IA, Wang F, Charron F, Chen L, Neilson J, et al. (2003) Neurotrophins and netrins require calcineurin/NFAT signaling to stimulate outgrowth of embryonic axons. *Cell* 113: 657-670.
10. Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A (2003) Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* 17: 2205-2232.
11. Sieber M, Baumgrass R (2009) Novel inhibitors of the calcineurin/NFATc hub - alternatives to CsA and FK506? *Cell Commun Signal* 7: 25.
12. Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, et al. (1991) Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66: 807-815.
13. Fruman DA, Klee CB, Bierer BE, Burakoff SJ (1992) Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 3686-3690.

14. Aramburu J, Garcia-Cozar F, Raghavan A, Okamura H, Rao A, et al. (1998) Selective inhibition of NFAT activation by a peptide spanning the calcineurin targeting site of NFAT. *Mol Cell* 1: 627-637.
15. Aramburu J, Yaffe MB, Lopez-Rodriguez C, Cantley LC, Hogan PG, et al. (1999) Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A. *Science* 285: 2129-2133.
16. Miskin JE, Abrams CC, Goatley LC, Dixon LK (1998) A viral mechanism for inhibition of the cellular phosphatase calcineurin. *Science* 281: 562-565.
17. Miskin JE, Abrams CC, Dixon LK (2000) African swine fever virus protein A238L interacts with the cellular phosphatase calcineurin via a binding domain similar to that of NFAT. *J Virol* 74: 9412-9420.
18. Hutchinson L Breast cancer: challenges, controversies, breakthroughs. *Nat Rev Clin Oncol* 7: 669-670.
19. Jauliac S, Lopez-Rodriguez C, Shaw LM, Brown LF, Rao A, et al. (2002) The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion. *Nat Cell Biol* 4: 540-544.
20. Yoeli-Lerner M, Yiu GK, Rabinovitz I, Erhardt P, Jauliac S, et al. (2005) Akt blocks breast cancer cell motility and invasion through the transcription factor NFAT. *Mol Cell* 20: 539-550.
21. Mancini M, Toker A (2009) NFAT proteins: emerging roles in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 9: 810-820.
22. Heslop HE (2009) How I treat EBV lymphoproliferation. *Blood* 114: 4002-4008.
23. Carbone A, Gloghini A, Dotti G (2008) EBV-associated lymphoproliferative disorders: classification and treatment. *Oncologist* 13: 577-585.
24. Lucas KG, Small TN, Heller G, Dupont B, O'Reilly RJ (1996) The development of cellular immunity to Epstein-Barr virus after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 87: 2594-2603.
25. Nastke MD, Becerra A, Yin L, Dominguez-Amorocho O, Gibson L, et al. Human CD4+ T cell response to human herpesvirus 6. *J Virol* 86: 4776-4792.
26. Gerdemann U, Keukens L, Keirnan JM, Katari UL, Nguyen CT, et al. Immunotherapeutic strategies to prevent and treat human herpesvirus 6 reactivation after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 121: 207-218.

Figure 1

A)



B)

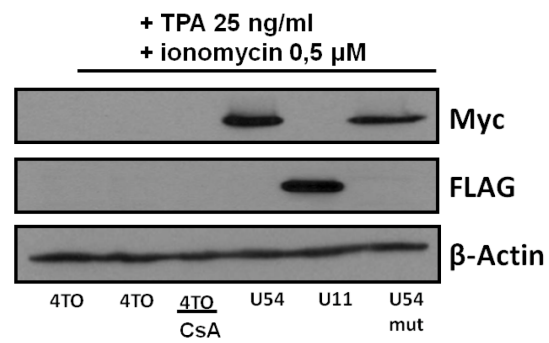
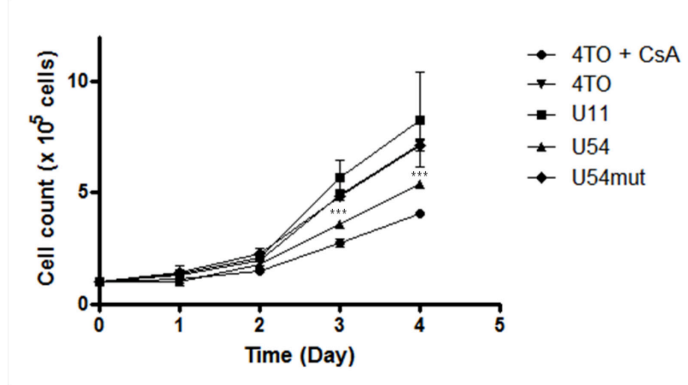
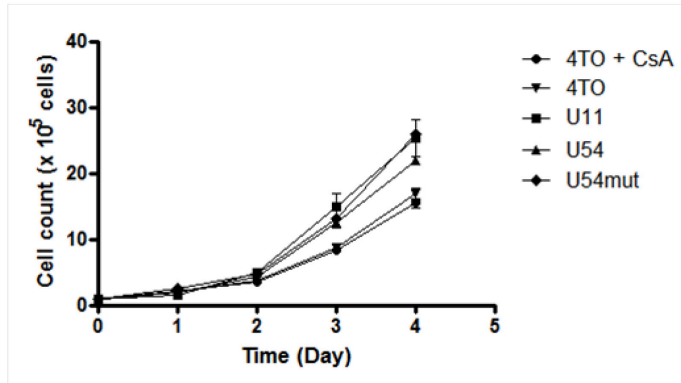


Figure 2

A)



B)



C)

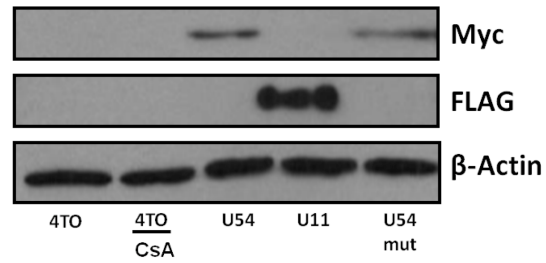
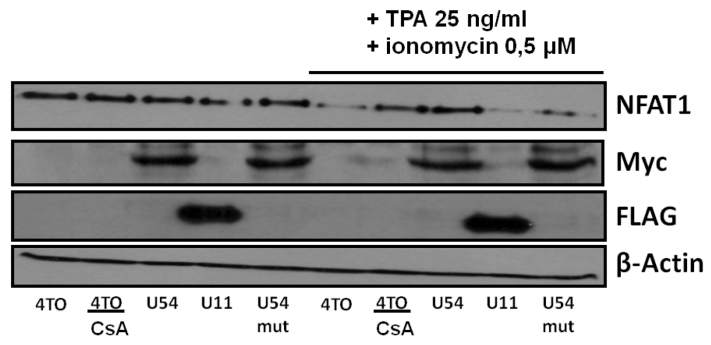


Figure 3

A)



Le chapitre 5 contient le texte de l'article intitulé « Identification of HLA-A*02, -A*03 and -B*07 class I-restricted CD8+ T cell epitopes derived from human herpesvirus 6B immediate early I protein » écrit par Iampietro M, Morissette G, Gravel A, Hasan A, O'Reilly RJ, Flamand L. L'article a été soumis au journal *Blood* en 2013.

Chapitre 5: Identification de peptides immunodominants against IE1 protein of HHV-6B

HHV-6 est un pathogène opportuniste infectant et persistant au sein de son hôte dans pratiquement 100% de la population mondiale. Suite à l'infection primaire, le virus va causer la 6ème maladie plus communément appelée roséole de l'enfant. Chez un individu sain immunocompétent, cette infection va être contrôlée aisément par le système immunitaire mais le virus, par sa capacité à entrer dans un état de latence, va rester inactif dans son réservoir cellulaire et inoffensif malgré quelques épisodes de réactivations. Cependant, grâce à cette caractéristique de la latence, chez un individu immunodéprimé, tel qu'un greffé de moelle osseuse (HSCT), une réactivation insidieuse du HHV-6 peut prendre le dessus sur les défenses de l'hôte et exercer son pouvoir pathogène pouvant être associé à de lourdes pathologies comme des encéphalites, des hépatites ou bien le rejet de greffe. La mise au point de traitement d'immunothérapie adoptive contre deux autres virus herpétiques, l'EBV et le HCMV, ont ouvert la voie sur un possible contrôle ou traitement d'éventuelles réactivations virales à HHV-6B. Ces travaux ont permis de découvrir des épitopes immunodominants dirigés contre la protéine IE1 du virus associés aux molécules HLA parmi les plus répandus dans la population caucasienne HLA-A*02, HLA-A*03 et HLA-B*07 grâce à des techniques d'expansion de lymphocytes T qui ont répondu à la présentation antigénique. Pour cela, nous avons évalué les capacités fonctionnelles des cellules T à sécréter de l'IFN- γ suite à la reconnaissance d'un peptide ou bien le potentiel cytotoxique de cellules T stimulées par un peptide cultivées avec des PBMC infectées par HHV-6B. De plus, pour la première fois, une cible commune pour les deux espèces virales HHV-6A et HHV-6B a été identifiée. Finalement, notre travail a permis de caractériser de nouvelles cibles anti-HHV-6 pouvant servir à la mise en place d'un protocole d'immunothérapie adoptive pour des patients immunodéprimés.

**Identification of HLA-A*02, -A*03 and -B*07 class I-restricted
CD8+ T cell epitopes derived from human herpesvirus 6B
immediate early I protein.**

Running title : Identification of HHV-6 CD8+ T cell epitopes

Mathieu Iampietro¹, Guillaume Morissette¹, Annie Gravel¹, Aisha Hasan², Richard J.

O'Reilly² and Louis Flamand^{1,3}.

¹ Division of Infectious Disease and Immunity, CHU de Quebec Research Center, Quebec city, Canada; ² Department of Pediatrics, Bone Marrow Transplantation Service and Division of Immunology, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY 10065, USA ; ³ Department of Microbiology, Infectious Disease and Immunology, Faculty of Medicine, Laval University, Quebec city, Canada.

Address correspondence to: Louis Flamand PhD MBA
Division of Infectious Disease and Immunity,
Room T1-49
CHU de Quebec Research Center,
Quebec city, Canada
G1V 4G2

Tel:418-525-4444 (x46164)
Fax: 418-654-2765
Email:Louis.flamand@crchul.ulaval.ca

ABSTRACT

Human herpesvirus-6B (HHV-6B) is a ubiquitous pathogen infecting humans. Serious complications due to HHV-6B reactivation are frequently observed in immunocompromised patients such as bone marrow transplant (BMT) recipients. Adoptive immunotherapy is a promising therapeutic avenue for the treatment of opportunistic infections, including herpesviruses. While T cell immunotherapy can successfully control Cytomegalovirus (CMV) and Epstein-Barr virus (EBV) reactivations in BMT recipients, thus far this therapy has not been available for HHV-6 infections, in part due to a lack of identified immunodominant CD8+ T cell epitopes with defined protective activity. In the current study, our goal was to identify viral epitopes derived from the HHV-6B immediate early protein I (IE1B) protein that are recognized by CD8+ T cells presented in the context of three of the most prevalent HLA class I alleles within the Caucasian population, HLA-A*02, HLA-A*03 and HLA-B*07. Such epitopes were identified and functionally tested for their ability to generate cytotoxic CD8+T cells against HHV-6B infected cells. Cross-reactivity of specific HHV-6B expanded T-cells against HHV-6A infected cells was also confirmed against one epitope presented by HLA-A*02 molecule. Our findings will help push forward the field of adoptive immunotherapy for the treatment and/or the prevention of HHV-6 reactivation in BMT recipients.

INTRODUCTION

Immunocompromised subjects are susceptible to opportunistic infections, including reactivation of endogenous viruses that compromise the graft and the overall health of the patient. With an increasing number of bone marrow and solid organ transplantation being performed each year, the prevention of secondary viral infections is a concern that clinicians need to address routinely(1-5). The use of anti-viral drugs, when available, is often of limited use due to their toxicity (6-9).

Therefore, alternative therapeutic strategies need to be considered. Adoptive immunotherapy, in which effector anti-viral cytotoxic T cells are expanded in vitro and then infused into the transplant recipient, is a therapeutic avenue that has proven beneficial against adenovirus and two human herpesviruses, cytomegalovirus (CMV) and Epstein-Barr virus (EBV)(10-14).

HHV-6 is a member of the *Herpesviridae* family and *β -herpesvirinae* subfamily existing as two different species, HHV-6A and HHV-6B sharing 95% of sequence homology(15, 16). HHV-6B primary infection occurs during the first two years of life in approximately 95% of individuals and has been identified as the etiologic agent of *exanthem subitum* in children(17). Once acquired, the virus persists within its host in an asymptomatic latent form that can reactivate periodically(18). These reactivations are generally contained by the immune system in immunocompetent subjects but in approximately 50% of BMT recipients, serious complications occur; these include delayed engraftment, graft versus host disease (GVHD) or pneumonitis and encephalitis that can lead to death(19-26). Currently, the only available treatment against HHV-6 is the administration of antivirals such as Ganciclovir, Cidofovir or Foscarnet, which offer variable protection and are frequently associated with severe adverse side effects such as nephrotoxicity and bone marrow suppression.

Adoptive immunotherapy can theoretically be extended to HHV-6 to improve BMT engraftment and contain viral reactivation in recipients. Recent studies have demonstrated an HHV-6 specific T cell immune response(27, 28) directed against some viral proteins in association with HLA-A*02 or HLA-B*40 antigens(28, 29). There is a need for the identification of additional viral targets (epitopes) presented in association with the common HLA class I alleles.

In the current study, we provide evidence that the IE1 protein from HHV-6B is proteolytically processed in such a way that it represents a good target for peptide presentation and immune recognition by specific CD8+ T cell response from healthy subjects. We were able to expand HLA class I restricted IE1-specific T cells presented in the context of the most prevalent HLA alleles in Caucasian population, HLA-A*02, HLA-A*03 and HLA-B*07(30). From these experiments, we

have identified 9 mer epitopes that were successfully used to expand CD8⁺ T cells clones capable of recognizing and lysing HHV-6-infected target cells in an antigen-specific manner. One such peptide, common in the IE1 protein of both HHV-6 species and presented by HLA-A*02, was used to expand cytotoxic T lymphocytes (CTL) capable of killing HHV-6B-infected and HHV-6A-infected target cells. The expansion of IE1 specific CTL could prove useful for adoptive immunotherapy to help contain HHV6 reactivation in BMT recipients.

MATERIALS AND METHODS

Leukocyte isolation and cell lines

Venous blood from healthy donors aged between 18 – 50 years old was obtained following informed consent and approbation by the CHU de Quebec ethics committee. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by centrifugation of whole blood over lymphocyte separation medium (Wisent, Montreal, QC) as previously described(31). For some experiments, T cells were isolated from PBMC by negative selection (Easysep Negative Selection, Stemcell Technologies, Vancouver, BC). Cos7 cell lines stably expressing mouse MHC class I H2K^b (Cos7-H2K^b)(32) were kindly provided by K. Rock, Department of Pathology, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA, USA(33). OTI splenocytes were isolated from C57BL/6-Tg(Tcr α Tcr β)/100Mjb/J mice (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) and used to recognize H2K^b- SIINFEKL peptide complex. Murine embryonic fibroblasts NIH3T3 stable cell lines expressing various Human Leukocyte class I Antigens (HLA) (A*02, A*03 or B*07) and costimulatory molecules B7.1, LFA3 and ICAM1, referred to as Artificial Antigen Presenting Cell (AAPC)(34), were used as sensitizing APCs to induce expansion of IE1-CTL clones as described below. Stably expressing IE1B AAPC (AAPC-IE1B) were generated following overnight transduction with lentiviral vector coding for IE1-Z29 protein (pLenti-CMV-IE1) and polybrene (6 μ g/ml). The next day, cells were washed with PBS to remove polybrene and avoid cytotoxicity

before fresh media was added for 48h. Transduced cells were then selected with 500µg/ml Hygromycin (Wisent, Montreal, QC). AAPC-IE1B is used as a model for the selection of IE1B peptides presented following physiological processing and peptide presentation.

Genotyping

Subjects were HLA typed using sequence specific primers according to the manufacturer's instructions (Life Technologies, Burlington, ON) by Dr Éric Wagner, Director of the immunology and histocompatibility laboratory at CHU de Québec-CHUL.

Peptides and Pepmixes

To stimulate PBMCs, we synthesized 15 mer peptides with 9 amino acids overlap covering the entire HHV-6 IE1B protein using the Intavis multiprep RS peptide synthesizer (Intavis, Koeln, Germany). For IE1B-epitope mapping, peptides were pooled into 28 mini-pools and were structured into a table allowing characterization of a single 15 mer peptide by the 2-dimensions characterization, as previously described(35-37). To identify the immunoresponsive sequence, we also synthesized 9 mer peptides with 8 aa overlap lyophilized peptides were reconstituted at 10mg/ml in DMSO. As control, a CEF control peptide pool containing 9 mer class I restricted immunodominant peptides from EBV, CMV and Influenza virus and obtained through the NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH, was used. For the evaluation of IE1 protein processing, commercially available Ovalbumin (OVA) 257-264 SIINFEKL peptide (SIIN) (GenScript, Piscataway, NJ) was used as positive control to pulse Cos7-H2K^b and stimulate OTI cells.

PBMCs stimulation

PBMC (5×10^6 /ml) were pulsed with 15 mer peptide pools (10µg/ml) and maintained in RPMI1640 medium (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) supplemented with 10% of heat inactivated FBS,

HEPES and 5µg/ml plasmocin (Invivogen, San Diego, CA) (CTL media) into a 5ml polystyrene tube at 37°C for 2h. Following stimulation, Brefeldin-A (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) (10µg/ml) was added to inhibit IFN γ secretion into supernatant then incubated at 37°C for 16h.

Flow Cytometry

Following peptide stimulation, PBMCs were washed twice with PBS at 4°C with successive centrifugations (5min – 1500 rpm) and then fixed with 0.1ml 4% paraformaldehyde (Fisher Bioreagents, Fairlawn, NJ) at 37°C for 5 min before being washed with PBS. For intracellular immunostaining, PBMC were permeabilized with permeabilization buffer 1X (eBiosciences, San Diego, CA). To specifically study CTLs response, we surface-stained PBMC with APC-labeled anti-CD3 and PE-labeled anti-CD8 antibodies and then performed intracellular staining with FITC-labeled anti-IFN γ antibody (eBiosciences, San Diego, CA) in the dark for 20 min at 22°C. Finally, cells were washed and resuspended in 500µl of PBS before analysis. For each sample, 1x10⁵ CD3+ cells were analyzed for CD8+ and IFN γ + cells on a FACSCalibur with Cell Quest Software (BD, Mississauga, ON). APC-, PE-, and FITC-labeled isotypic IgGs were used as negative controls.

Plasmids

The sequence coding for the ovalbumin SIINFEKL peptide (5'AGCATTATTAACCTTTGAAAACTG 3') was inserted into the BstEII site of the pcDNA4TO-IE1 (4TO-IE1) vector(38) to generate the 4TO-IE1-SIIN vector. The pcDNA3.1-OVA (3.1-OVA) vector was kindly provided by K. Rock. For stable IE1 expression, we isolated the IE1 gene by digesting the pcDNA4TO-IE1 vector with BamH1/Xho1 and subcloned the insert into the BamH1/Xho1 digested pENTR1A vector (Addgene plasmid #17398)(39) to generate pENTR1A-IE1B. The pENTR1A-IE1B vector was then recombined with the pLentiCMV hygro DEST vector (Addgene plasmid #17454)(39) using the Gateway LR Clonase II enzyme mix (Life Technologies inc) to yield the pLentiCMV hygro-IE1B vector. To generate lentiviruses, the pLentiCMV hygro-

IE1B vector was co-transfected in 293T cells with MD2.G (Addgene plasmid #12259), MDLg/pRRE (Addgene plasmid #12251) and pRSV-Rev (Addgene plasmid #12253)(40). Forty-eight hours later, supernatants were collected, filtered (0.45µm), aliquoted and frozen at -150°C until used.

IE1 processing assay

Cos7-H2K^b were plated at 1x10⁵ cells per well in 12-well plate and maintained in DMEM medium (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) supplemented with 10% of heat inactivated FBS, HEPES and plasmocin (5µg/ml) (Invivogen, San Diego, CA). Cells were transfected with 4TO, 4TO-IE1, 3.1-OVA or 4TO-IE1-SIIN plasmids for 48h using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Burlington, ON) following reagent's instructions before being cocultured with 1x10⁵ OT1 splenocytes for 24h at 37°C. To analyze IE1 protein processing, we evaluated mIFN γ release into supernatant by OT1 cells after recognition of H2K^b-SIINFEKL complex. Concanavalin-A (conA) (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) (50ng/ml) and pulsed Cos7-H2K^b with exogenous SIINFEKL peptide (10µg/ml) were used as positive control to stimulate OT1 splenocytes and mIFN γ release into supernatant.

Western blot analysis

Cos7-H2K^b cells were transfected with 4TO, 4TO-IE1, 4TO-IE1-SIIN or 3.1-OVA plasmids. To evaluate protein expression, cells were lysed in 2X Laemmli lysis buffer and boiled for 5minutes before centrifugation 1min at 13000rpm. The 150 kDa IE1 protein was detected using a polyclonal rabbit anti-IE1(41), 45 kDa OVA protein with a monoclonal mouse anti-OVA (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) and the 43 kDa β -actin with a monoclonal mouse anti- β -actin (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO). Expression of IE1 within NIH3T3 cell lines was determined by western blot.

CTL expansion

AAPC-IE1B cells expressing HLA class I molecule were plated in 6-well plates at 5×10^5 per well and irradiated 24h later with 1500 cGy using a gamma-cell irradiator (Compagnie). Cells were cocultured at 37°C in CTL media for 21 days with 3×10^6 T-lymphocytes per well from an HLA class I compatible healthy volunteer donor. From day 10 to day 21, interleukine-2 (IL-2) (20 U/ml), obtained through the NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH, was added every 3 days. On day 21, cells were harvested and used for functional studies. CTL expansion protocol was also used with peptide pulsed AAPC. Following irradiation, cells were pulsed with individual 15 mer or 9 mer peptides for 3-4h before being washed with PBS1X to remove soluble peptides and then cocultured with T-lymphocytes in CTL media for 10 or 21 days. CTLs were stimulated with recombinant IL-2 (20UI/ml) every 3 days starting on day 5.

Immune Epitope Database (IEDB)

Individual 15 mer peptides were selected using the T cell Epitope Prediction software (<http://www.iedb.org>) for their capacity to bind (9 mer) with medium high binding affinity to MHC class I molecules. Peptides that demonstrated affinities $<1 \mu\text{M}$ were selected for additional study.

PBMC infection with HHV-6B Z29 and HHV-6A GS

PBMC were stimulated for 48h with phytohaemagglutinin-P (PHA-P) (10 $\mu\text{g/ml}$) to induce cell mitosis and facilitate viral infection. Then, cells were washed, counted and infected with HHV6-B Z29 or HHV-6A GS strains at a multiplicity of infection (MOI) of 0.1 to ensure robust infection(42). After 4h of infection, cells were washed with PBS1X and cultured in CTL media for 3 days at a concentration of 1×10^6 cell/ml in a 25 cm² flask. Uninfected PBMC were used as a negative control.

RT-PCR assay

Uninfected or HHV-6-infected PBMC (1×10^6 cells) were harvested and RNA extracted using Qiazol lysis reagent (Qiagen, Gaithersburg, MD). Retrotranscription (RT) into cDNA was carried out as described by Jaworska et al(38). One-tenth of the cDNA was used for real time PCR as described by Jaworska et al(42).

Functional studies

ELISA: mIFN γ and hIFN γ (IFN γ) were quantitated using commercial ELISA kits (eBiosciences, San Diego, CA) following manufacturer's instructions. Supernatants were serially diluted from 1:1 to 1:100 for cytokine quantification.

Cytotoxicity Assay : CTL and PBMC were harvested, washed with PBS, counted and co-cultured at an effector cells (E) target cells (T) ratio of 5:1. Cells were cocultured in RPMI-1640 medium supplemented with 1% FBS + HEPES and 5 μ g/ml plasmocin in a U bottom 96-well plate for 6 hours. Then, plates were centrifuged 10 min-1100 rpm to pellet cells at the bottom and supernatants were used to detect lactate dehydrogenase activity released using Cytotoxicity Detection kit (Roche, Indianapolis, IN). PBMC cultured in media supplemented with 1% Triton X-100 (Fisher) were used as positive control (100% killing). Percentage of specific lysis was calculated by the method:
Cytotoxicity (%) = [(experimental value – low control) / (high control – low control)] x 100.

Statistical analysis

Experimental groups were compared using a non-parametric method with the Kruskal-Wallis one-way analysis of variance. Results were considered significantly different when $P < 0.05$.

RESULTS

Characterization of specific CD8⁺ T cell response against IE1B epitopes

Certain peptides derived from the CMV IE1 protein (encoded by UL123) are known to be immunodominant and capable of efficiently inducing a robust T cell response that can efficiently control CMV reactivation in transplant recipients(11, 43). Considering that CMV and HHV6-B are classified within the same sub-family and that they share some biological attributes, we surmised that HHV-6B IE1 (IE1B), the positional homologue of CMV IE1, was likely to generate a robust T cell response in HHV-6B seropositive individuals. We isolated PBMC from healthy blood donors that we stimulated with 15 mer peptide pools spanning (9 mer overlap) the entire IE1B protein to estimate the frequency of IE1B specific CD8⁺ T cells by measuring CD3⁺ CD8⁺ IFN γ ⁺ population by flow cytometry. Representative results from 1 donor are presented in figure 1A. DMSO was used as negative control (middle left panel). Reactivity against the CEF positive control pepmix, which is composed of immunodominant peptides from EBV, CMV and Influenza virus is shown in the middle right panel. Lastly, results from cells stimulated with 2 IE1 peptide pools, one negative (pool IX) and one positive (pool XVII) are presented under figure 1A. The reactivity of CD3⁺ CD8⁺ IFN γ ⁺ (CD4⁺) against all IE1B peptide pools was marginal. The median frequency of CD3⁺ CD8⁺ IFN γ ⁺ T cells recognizing IE1B peptides 0.06% (n=20) while the frequency of CD3⁺ CD8⁺ IFN γ ⁺ in the CEF positive control pepmix, was 0.51% (n=11) (figure 1B).

Determination of IE1B processing and peptide presentation

The somewhat low frequency (0.06%) of IE1 specific anti-CD8 T cells in healthy individuals relative to CMV pp65 and IE1 antigens (range 0.1-4%)(44) could result from: a) a low frequency of HHV-6 reactivation resulting in a low antigenic burden and infrequent CD8 T cell expansion and gradual loss of reactive cells; b) IE1 is a poorly immunogenic protein and c) the processing of IE1 and presentation of antigenic peptides to T cells is impaired. To verify the latter hypothesis, we used

a protocol analogous to the one described by Bennett et al(45) by inserting the sequence coding for SIINFEKL, an immunodominant peptide from the chicken ovalbumine (OVA) protein presented in the context of murine MHC class I H2-K^b, into the IE1B coding sequence and proceeded to the antigenic presentation assay (Figure 2A). If IE1 is efficiently processed and presented, epitopes, including the SIINFEKL peptide will be presented at the cell surface and able to stimulate OT1 splenocytes that carry TCR recognizing the SIINFEKL/H2-K^b complex. First, we transfected Cos7-H2K^b cells with 4TO-IE1-SIIN, 4TO-IE1, 4TO and 3.1-OVA vectors for 48h. To characterize IE1B cleavage and peptides presentation, we co-cultured OT1 splenocytes with our transfected cells and measured mIFN γ secretion as a measure of T cell activation (Figure 2B). OT1 splenocytes secreted mIFN γ when cultured in the presence of 4TO-IE1-SIIN (2010 \pm 190 pg/ml) as well as for positive controls 3.1-OVA (970 \pm 130 pg/ml) transfected Cos7-H2K^b cells or Cos7-H2K^b pulsed with exogenous SIINFEKL peptide (1920 \pm 30 pg/ml). Con-A stimulated OT1 splenocytes (1190 \pm 80 pg/ml) were used as positive control for their ability to secrete mIFN γ . Cos7-H2K^b cells transfected with 4TO-IE1 or 4TO control vectors were used as negative controls unable to stimulate mIFN γ by OT1 splenocytes. Western blot analyses (Figure 2C) were conducted to show expression of the proteins of interest. These results suggest that IE1 is processed by the cellular degradation machinery and peptides are efficiently presented at the cell surface.

Identification of immunoresponsive 15 mer peptides from IE1B protein

To increase the frequency of anti-IE1 CD8⁺ T cells, we used an in vitro culture model that proved successful in the identification of CMV immunodominant peptides presented in the context of specific HLA alleles. These AAPCs consist of murine 3T3 cells genetically modified to express critical human molecules needed for T-cell stimulation, such as the co-stimulatory molecules B7.1, ICAM-1, and LFA-3 as well as HLA class-I molecules(34). These AAPC expressing HLA-A*02, HLA-A*03 or HLA-B*07, three of the most common HLA class-I alleles present in the Caucasian population(30), were transduced with a lentiviral vector expressing IE1B. Cells were selected with

hygromycin and IE1B expression monitored by western blot. (Supplementary Figure 1). This system allows for a physiological processing and a natural IE1B peptides presentation. T cells from HLA sharing donors were cocultured with AAPC-IE1B for 21 days with IL-2 to expand anti-IE1B specific T cell clones. We then cocultured the expanded T cells with AAPC that were pulsed with pools of IE1B peptides for 24h, after which we examined the amount of IFN γ secreted as a measure of T cell activation. The 179 IE1B-derived peptides were divided into 28 peptide pools, each consisting of 15-aa peptides. These pools were organized in a 2 dimension matrix that allowed for easy identification of individual target peptides, as described previously(35-37). These individual peptides were then used for confirmation. An example of responses obtained for an HLA-A*03 donor is presented in figure 3A. For several pools, (I, II, VI, VII, IX and XV, XVI, XVIII) we could detect a significant IFN γ release (range 16-34 pg/ml) while other pools were considered to give a negative response (≤ 8 pg/ml). Results for HLA-A*02 and HLA-B*07 donors are presented in figures 3B and 3C. By cross-referencing reactive pools, we ended up with several potential immunostimulatory peptides. For example, association of pool I and XVI identified peptide #2 as a potential candidate (figure 3A). Because of the high number of possible associations we used the IEDB algorithm to select peptides that had affinities $< 1\mu\text{M}$ for the HLA allele tested. Next, we repeated the experiment but instead of testing pools, we pulsed AAPC with individual 15 mer peptides to identify the peptide recognized by T cells. From a representative experiment with a HLA-A*03 donor, we could identify the peptide n°2 aa7-21 TTSTSMFILGKPSGN and peptide n°85 aa505-519 VPGKSKEAKTFIEYS as targets for T cell response with an IFN γ release into supernatant (76 pg/ml and 23 pg/ml respectively) while other peptides didn't react with T cells (≤ 10 pg/ml) (Figure 4A). We were also able identify peptide n°29 169-183 QFVSCYAKMLSGKNL from another HLA A0301 donor as immunoresponsive (Supplementary Figure 2). For HLA-A*02 donors, T cell clones recognized 3 peptides n°19 109-123 CIQSIGASVKAAMKQ, n°22 aa127-141 NMEDNLINSAGLLTL, n°26 aa151-165 LEQLGQLININLLSS (Figure 4B) and for HLA-B*07

the peptide n°44 aa259-273 HNKEMSNPEISNKEF was identified (Figure 4C).

Determination of immunodominant HLA class I restricted 9 mer sequence from 15 mer peptides

To refine our results and identify immunodominant sequences associated with each HLA class I molecule, we synthesized IE1B 9 mer peptides with 8 amino acids overlap spanning the entire 15 mer sequence. An example of 9 mer peptides derived from peptide n°2 aa7-21 TTSTSMFILGKPSGN associated with HLA-A*03 is presented under figures 5A and 5B. We pulsed AAPC with the individual 15 mer peptides and cocultured them with T cells from the same donor for 21 days in the presence of IL-2. We then cocultured T cells for 24h with AAPC pulsed with each of the 9 mer peptides and evaluated IFN γ secretion by ELISA. We could easily determine that the aa9-17 STSMFILGK sequence was the favored peptide recognized by T cells, as witnessed by the release of IFN γ (48 pg/ml) into the supernatant. Other 9 mer peptides gave results similar to the DMSO negative control (\leq 15 pg/ml) (Figure 5C). We were able to identify IE1B 9 mer sequence for peptide n°29 aa173-181 CYAKMLSGK (Supplementary Figure 3A) associated with HLA-A*03, peptides n°19 aa109-117 CIQSIGASV (Figure 5D), n°22 aa131-139 NLINSAGLL (Supplementary Figure 3B), n°26 aa155-163 GQLININLL (Supplementary Figure 3C) associated with HLA-A*02 and peptide n°44 aa265-273 NPEISNKEF (Figure 5E) associated with HLA-B*07. Immunodominant 9 mer sequences from Influenza (HLA-A*02 and HLA-A*03) or HCMV (HLA-B*07) were used as negative controls to confirm the specificity of expanded T cells against IE1B epitopes.

Characterization of cytolytic properties of peptide stimulated T cells against HHV-6 Z29 infected autologous PBMC

To validate the functionality of IE1B expanded T cells, we needed to confirm their capacity to eliminate or kill virus-infected cells. We pulsed AAPC with the IE1B 9 mer peptides identified

above and cultured them with T cells from HLA-matched donors for 21 days in the presence of IL-2. T cells obtained were then harvested and cocultured with HHV-6B-infected autologous PBMC for 6h. For HLA-A*03 donors, peptide aa9-17 STSMFILGK allowed the expansion of cytotoxic T cells (CTL) able to kill infected PBMC ($32\pm 16\%$) while T cells cultured with irrelevant IE1B peptide aa12-20 MFILGKPSG did not (Figure 6A). Similar experiments were conducted for other IE1B 9 mer peptide identified and associated with HLA-A*03 aa173-181 CYAKMLSGK and CTL expanded were able to kill HHV-6 Z29 PBMC ($27\pm 15\%$), and not PBMC loaded with an irrelevant peptide aa170-178 FVSCYAKML (Supplementary Figure 4A). For epitopes identified to be presented by HLA-A*02 or HLA-B*07, we followed the same experimental procedure, and confirmed that CTL clones expanded with relevant 9 mer peptides aa109-117 CIQSIGASV (Figure 6B), aa131-139 NLINSAGLL (Supplementary Figure 4B), aa155-163 GQLININLL (Supplementary Figure 4C) and aa265-273 NPEISNKEF (Figure 6C) had a cytolytic capacity against HHV-6 Z29 infected PBMC (range 15-46%) while irrelevant peptides aa114-122 GASVKAAMK (Figure 6B), aa128-137 MEDNLINSA (Supplementary Figure 4B), aa152-160 EQLGQLINI (Supplementary Figure 4C) and aa262-270 EMSNPEISN (Figure 6C) could not. T cells reactive against immunodominant peptides from Influenza (HLA-A*03 and HLA-A*02) or HCMV (HLA-B*07) were used as positive controls to validate experimental procedure by killing influenza or CMV peptide loaded autologous PBMC respectively (range 53-61%), while the same T cells were used as negative controls against HLA-matched HHV-6 Z29 infected PBMC. These results also demonstrated that T cells generated using the AAPC coculture are specific for HHV-6 IE1 epitopes.

Identification of a conserved IE1 peptide capable of generating CTL that can kill both HHV-6A and HHV-6B infected autologous targets.

Alignment of IE1 amino acid sequences was performed between HHV-6B Z29 and HHV-6A GS strains(41, 46) to identify 9 mer peptides that are perfectly conserved by both viruses. HLA-A*02

restricted aa109-117 CIQSIGASV peptide was the only one identified and following CD8⁺ T cells expansion with this peptide, CTL clones efficiently killed both HHV-6 Z29-infected (n=4) and HHV-6 GS-infected (n=2) autologous PBMC (54±2% and 41±11% respectively) (Figure 6B). CTL expanded with HHV-6B Z29 HLA-A*02 aa155-163 GQLININLL peptide, that differs by one amino acid with that of IE1 from HHV-6A GS could only kill autologous targets infected with HHV-6 Z29 (Supplementary Figure 4C).

DISCUSSION

HHV-6, like all herpesviruses, establishes a life-long infection in its host. Circulating B and T memory cells that expand in response to viral reactivation generally control the spread of virus. In immunocompromised subjects such immunity is lacking, which results in uncontrolled viral replication that can lead to serious medical complications. Since cellular immunity can efficiently control HHV-6 infections in healthy individuals, the use of adoptive T cell immunotherapy for immunocompromised individuals represents a viable therapeutic avenue. However, in order to implement this therapy, one needs to identify target antigens that will enable cytotoxic T cells to recognize and kill HHV-6 infected cells. Based on previous work indicating that the CMV IE1 protein was a good target antigen for adoptive T cell immunotherapy(11, 43), we surmised that the HHV-6B IE1 protein could be one such target. However, although the two IE1 proteins (CMV and HHV-6B) contain genes that are positional homologues, they do not share protein sequence homologies. Despite this, we chose to work with the IE1 protein based on the fact HHV-6B IE1 is expressed with similar kinetics as CMV IE1 and we reasoned that since that it is among the first protein made during the lytic cycle (within 2 hours)(41) this would give the opportunity for CD8⁺ T cells to kill virus-infected cells at an early stage of infection before the synthesis and assembly of complete virions which takes 1-2 days. Furthermore, in recent work, Gerdemann et al have also demonstrated that among 5 proteins tested (U11, U14, U54, U71, IE1), peptides derived from IE1

were the most immunogenic antigens(29). Under the conditions tested (9-day expansion in the presence of IL-4+IL-7), the bulk (60%) of the expanded T cells were CD4⁺ T cells. From the CD8⁺ expanded T cells, three HLA-B*40 restricted IE1 peptides but no HLA-A*02 restricted peptides could be identified(29).

When we analyzed the frequency of circulating HHV-6B IE1 specific T cell in healthy adult blood donors, detected by the secretion of IFN γ in response to overnight peptide stimulation, we noticed that the frequency of CD3⁺ CD8⁺ IFN γ ⁺ T cells was much lower (0.06%) that those recorded for CMV IE1(29), in accordance with the results of Gerdemann et al. The frequency of CD3⁺ CD8⁺ IFN γ ⁺ (CD4⁺) T cells was even lower (not shown). Knowing that several herpesviruses possess numerous immunomodulatory activities we speculated that HHV-6B IE1 may somehow be resistant to proteosomal degradation and inefficiently presented at the cell surface in manner analogous to EBV EBNA-1 and HHV-8 LANA-1 proteins(47, 48). This hypothesis was ruled out once we provided experimental confirmation that HHV-6B IE1 is efficiently processed by the cellular degradation machinery and that peptides are MHC-presented at the cell surface (using the OVA SIINFEKL as surrogate marker) (figure 2). Previous studies indicated that in vitro amplification was needed to detect HHV-6 specific T cells (Gerdemann and Moosmann). Knowing that Moosmann et al were unable to identify HLA-A*02-restricted HHV-6B IE1 peptides using an in silico approach(28), we opted for a well characterized and validated approach consisting in vitro coculturing of PBMC with AAPC expressing IE1B and three of the most prevalent HLA alleles within the North American Caucasian population, HLA-A*02, HLA-A*03 and HLA-B*07(30). One advantage of this system is that we can selectively expand CD8⁺ T cells recognizing naturally processed and presented IE1 peptides in the context of specific HLA alleles. One disadvantage is that we need to know the HLA genotype of the blood donors. Once expanded, the epitopes recognized by the T cells can be identified by coculturing T cell clones with AAPC pulsed with 15 mer and 9 mer peptides. Using this strategy we have identified a series of peptides that were tested functionally for their ability to generate T cells capable of killing autologous PBMC infected with

HHV-6B. In the absence of animal models, the cytotoxic assay represents one of the best way to identify biologically relevant peptides. Our results extend and complement recent findings made for HLA-B*40 alleles by identifying new epitopes derived from the IE1B protein that are presented by very common class I alleles. The next step will be the testing of peptides in clinical trials to determine their usefulness in the development of adoptive immunotherapy protocols against HHV-6B reactivation in immunocompromised patients.

There are two distinct HHV-6 species, HHV-6A and HHV-6B that differ slightly in their genomic sequences and more importantly in their biological properties, cellular tropism, epidemiology and clinical manifestations(15, 16, 49). Nearly 100% of childhood infections in North America, Europe and Japan are caused HHV-6B. Such primary infection results in the sixth childhood eruptive disease *Roseola* or *Exanthem subitum*. HHV-6A is described as more neurotropic but the clinical significance and associated symptoms remain unclear(50). These two viruses are relatively benign in immunocompetent individuals but serious illnesses such as including encephalitis, pneumonitis, delayed engraftment or graft versus host disease can be associated with HHV-6 reactivation in immunocompromised patients. Active infection with HHV-6 is detectable in 30 to 50% hematopoietic cell transplant patients with HHV-6B accounting for the majority of reactivation events (>90%)(51) . In fact, HHV-6B is the most common cause of encephalitis after HSCT(52). HHV-6B reactivation generally occurs 3 weeks following HSCT, slightly before that of CMV. Until recently, the only way to counteract HHV-6B proliferation and opportunistic pathologies was to use antiviral drugs such as Ganciclovir, Cidofovir or Foscarnet but their efficiency is variable and their deleterious side effects, such as renal failure and bone marrow suppression in these already compromised patients. In such patients the use of adoptive immunotherapy, which consists of isolating PBMC from a compatible donor and amplify *ex vivo* T cells recognizing specific antigens against selected viruses and then infusing the effector T cells into the recipients following the transplant to help contain viral reactivation, could be highly beneficial. In support, successful adoptive immunotherapy protocols are already in clinical use against two

herpesviruses CMV and Epstein-Barr virus (EBV)(11, 53, 54) and this approach could easily be expanded to HHV-6. Furthermore, to limit the costs and maximize the ex vivo T cell expansion scheme, peptides from different viruses can be combined allowing the simultaneous generation of cytotoxic CD8⁺ T cells that can be infused altogether 10-14 days following HSCT and prior to viral reactivation events(14, 29, 55, 56).

Viral peptides are selected for their ability to induce the expansion of T cells capable of killing virus-infected cells. HLA class I restricted epitopes from the EBV Nuclear Antigen 1 (EBNA-1) protein or CMV IE1 and pp65 proteins have already been identified and used for immunotherapy. In the current study we have identified 6 peptides from the HHV-6 IE1B protein capable of generating CD8⁺ T cells that are cytotoxic toward HHV-6 infected PBMC. Three are presented by HLA-A*02, two by HLA-A*03 and one by HLA-B*07. With the exception of the STSMFILGF peptide that has high affinity (56 nM) for HLA-A*03, all other identified peptides have medium to low affinities (500-900nM) for their corresponding HLA alleles. This is not uncommon as some previously characterized peptides from EBV (RTA DYCNVLNKEF/HLA-A*24)(57), CMV (pp65 EFFWDANDIY/HLA-B*44)(58) and Influenza (NPKTGGPIYKR/HLA-A*68)(59) have affinities within similar ranges (400-2000 nM). While the majority of proteins of HHV-6A and HHV-6B share more than 90% amino acid identity, the IE1 proteins are the most divergent with 63% amino acids identity(41). Of the 6 peptides identified, the HLA-A*02 restricted CIQSIGASV peptide is conserved in both viruses enabling CD8⁺ T cells expanded with this peptide to kill both HHV-6A and HHV-6B infected cells.

The identification and characterization of HLA class I restricted peptides is very important and useful for the successful implementation of adoptive immunotherapy protocols. Clinical protocols have to be safe, efficient, have a moderate cost and be as little time-consuming as possible. Techniques for T cell expansion have been improved over the years and are now reliable and validated for EBV, CMV and Adenovirus (11, 14, 53, 54). Our results add on to those of many other researcher groups in creating a bank of peptides from different viruses that can be used

simultaneously for the in vitro expansion T cells (14, 55, 56). Recent studies including ours therefore help push forward the development of effective adoptive immunotherapy protocols to help combat opportunistic viral infections during the time period where patients are most vulnerable, i.e. during the first 100 days post HSCT.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Canadian Institute of Health Research of Canada to LF. We thank Didier Trono and Eric Campeau for providing valuable plasmids to Addgene. We also thank Kenneth Rock for providing the Cos7-H2K^b cells. We thank Dr Eric Wagner for the HLA genotyping of blood donors.

LEGENDS

Figure 5.1: Detection of HHV-6B anti-IE1 specific CD8⁺ T cell response

A. Characterization of specific CD8⁺ T cells directed against the IE1B protein in healthy blood donors was evaluated by flow cytometry. Following overnight stimulation of PBMC with DMSO (negative control) (middle left), CEF peptide mix containing characterized epitopes from CMV, EBV and Influenza (positive controls) (middle right), or pools containing (13 or 14 peptides) 15 mer IE1B peptides (bottom panels) cells were labeled with mAb (anti-CD3, anti-CD8 and anti-IFN- γ) and analyzed by flow cytometry. By gating on CD3⁺ cells, the percentages of CD8⁺ IFN- γ ⁺ cells were determined. B. Median frequency (%) of CD3⁺ CD8⁺ IFN γ ⁺ T cells from 11 donors stimulated with CEF peptide mix and 20 donors stimulated with IE1B peptide pools.

Figure 5.2: IE1B-SIIN protein is processed and peptides are efficiently presented and recognized by CTL

A. Schematic representation of pcDNA4TO Myc/HA-IE1B plasmid in which the coding sequence of Ovalbumin SIINFEKL peptide was subcloned in-frame with the IE1B coding sequence. B. Activation of OT1 splenocytes by Cos7-H2K^b expressing IE1B-SIIN. OT1 splenocytes were cocultured with Cos7-H2K^b cell line transfected with 4TO, 4TO-IE1, 3.1-OVA, 4TO-IE1-SIIN or pulsed with exogenous SIINFEKL peptide (10 μ g/mL) for 4h. The 4TO, 4TO-IE1 were used as negative controls while conditions with 3.1-OVA, exogenous SIINFEKL peptide and OT1 stimulated with Con-A were used as positive controls. Release of mIFN γ was measured after overnight coculture and expressed as mean \pm SD in pg/ml from data obtained in triplicates and representative of two independent experiments. C. Western blot analysis confirmed the expression of proteins of interest for each condition tested. IE1 protein was expressed in 4TO-IE1 and 4TO-IE1-SIIN conditions (upper panel) and OVA protein was expressed in 3.1-OVA condition (middle panel). Beta-actin was included as loading control.

Figure 5.3: Identification of reactive 15 mer peptide pools on HLA-A*03, -A*02 and -B*07 donors

AAPC-IE1 expressing HLA-A*03 (A), HLA-A*02 (B) or HLA-B*07 (C) were cocultured for 21 days with isolated T cells from HLA compatible donors to induce expansion of T cells specific for IE1B. Expanded T cells were then cocultured with AAPC pulsed with pools of IE1 peptides for 24h followed by IFN γ measurements in the supernatants by ELISA. DMSO was used as negative control. Positive pools were further characterized using the 2-dimension matrix to select and test individual 15 mer peptides. Using the HLA-A*03 donor as an example, by cross-referencing pools I and XVI we could identify peptide n°2 aa7-21 TTSTSMFILGKPSGN as a potential immunogenic peptide.

Figure 5.4: Identification of immunoresponsive individuals 15 mer peptides for HLA-A*03, -A*02 and -B*07 molecules

All 15 mer peptides identified following the 2-dimensions matrix were analyzed for their theoretical binding affinity to associated HLA class I molecule. Peptides having affinities < 1 μ M were selected for individual testing. HLA-A*03 (A) HLA-A*02 (B) and HLA-B*07 (C) PBMC were cocultured with HLA-matched AAPC-IE1 for 21 days. Expanded T cells were then cocultured with HLA-matched AAPC pulsed with individual 15 mer peptides for 24h followed by IFN γ determination. DMSO, or appropriate Influenza or CMV peptides presented by the specific HLA allele were used as negative controls.

Figure 5.5: Identification of reactive 9 mer sequence presented by HLA-A*03, -A*02 and -B*07 molecules

A. Schematic representation of 9 mer peptides with 8 mer overlaps designed spanning the entire immunoresponsive 15 mer peptide. B. Detailed amino acid sequence of peptide n°2 with corresponding 9 mer overlapping peptides. AAPC-A*03 (C), -A*02 (D) or -B*07 (E) were pulsed with 15 mer peptides and cocultured with T cells isolated from HLA matched blood donors for 21 days to expand epitope specific T cells. T cells were then cocultured with AAPC pulsed with the 9 mer peptides for 24h followed by measurement of IFN γ . The 9 mer peptides that caused the

strongest IFN γ release was considered the best immunostimulatory peptides. DMSO and the appropriate Influenza or CMV peptides presented by the specific HLA allele were used as negative controls.

Figure 5.6: IE1B specific expanded CTL efficiently kill HHV-6B-infected autologous target cells

AAPC-HLA-A*03 (A), -A*02 (B) or -B*07 (C) were pulsed with IE1 relevant or irrelevant 9 mer peptides identified in figure 5 and cocultured with HLA-matched isolated T cells for 21 days to induce clonal expansion of CTL. CTL were then cocultured with HHV-6B- or HHV-6A-(A*02 donor) infected autologous PBMC for 6h and cytotoxicity was evaluated into supernatants by the presence of LDH activity and expressed as % of killed cells. As negative controls, anti-Influenza and anti-CMV HLA-matched restricted CTL were incubated with HHV-6B-infected autologous PBMC. As positive control, anti-Influenza or anti-CMV CTL were generated and incubated with autologous PBMC pulsed with Influenza or CMV peptides. The 100% cytotoxicity was determined by adding 1% Triton X-100 to the culture. HHV-6-infected PBMC in the absence of effector cells was used as negative control.

Supplementary Figure 5.1: Design of AAPC stably expressing IE1B protein

Western blot analysis on IE1B protein stable expression on NIH3T3 cell lines. NIH3T3 HLA-A*02, -A*03 and -B*07 cell lines were transduced with pLenti-CMV-IE1 expression vector and selected with Hygromycin (500 μ g/ml). Expression of IE1B was confirmed in each cell line using a rabbit polyclonal anti-IE1 antibody. Non-transduced NIH3T3 HLA-A*02 cells were used as negative control.

Supplementary Figure 5.2: Identification of reactive 15 mer peptide on HLA-A*03 donor

15 mer peptides identified following the 2-dimensions matrix were analyzed for their theoretical binding affinity to HLA-A*03. Peptides having affinities < 1 μ M were selected for individual testing. HLA-A*03 PBMC were cocultured with AAPC-IE1 for 21 days. Expanded T cells were

then cocultured with AAPC pulsed with individual 15 mer peptides for 24h followed by IFN γ determination DMSO, or properly matched HLA-restricted Influenza peptide were used as negative control.

Supplementary Figure 5.3: Identification of reactive 9 mer sequence presented by HLA-A0301, -A0201 alleles

From immunoresponsive 15 mer peptide we designed 7 overlapping 9 mer peptides spanning the entire 15 mer peptide to refine our results. AAPC-A*03 (A), -A*02 (B) and (C) were pulsed with 15 mer peptides and cocultured with isolated T cells from HLA matched blood donor for 21 days to expand T cells. T cells were then cocultured with AAPC pulsed with the 9 mer peptides for 24h followed by measurement of IFN γ . The 9 mer peptides that caused the strongest IFN γ release was considered the best immunostimulatory peptides. DMSO and properly-matched Influenza peptides were used as negative controls.

Supplementary Figure 5.4: IE1B specific expanded CTL efficiently kill HHV-6B-infected autologous target cells

A. AAPC-HLA-A*03 (A), -A*02 (B) and (C) were pulsed with IE1 relevant or irrelevant 9 mer peptides identified in figure 5 and cocultured with HLA-matched isolated T cells for 21 days induce clonal expansion of CTL. CTL clones were then cocultured with HHV-6B-infected autologous PBMC for 6h and cytotoxicity was evaluated into supernatants by the presence of LDH activity and expressed as % of killed cells. As negative controls, anti-Influenza and anti-CMV HLA-matched restricted CTL were incubated with HHV-6B-infected autologous PBMC. As positive control, anti-Influenza and CTL were generated and incubated with autologous PBMC pulsed with Influenza peptides. The 100% cytotoxicity was determined by adding 1% Triton X-100 to the culture. HHV-6-infected PBMC in the absence of effector cells was used as negative control.

REFERENCE LIST

1. Zerr, D. M., L. Corey, H. W. Kim, M. L. Huang, L. Nguy, and M. Boeckh. 2005. Clinical outcomes of human herpesvirus 6 reactivation after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 40:932-940.
2. Betts, B. C., J. A. Young, C. Ustun, Q. Cao, and D. J. Weisdorf. Human herpesvirus 6 infection after hematopoietic cell transplantation: is routine surveillance necessary? *Biol Blood Marrow Transplant* 17:1562-1568.
3. Dulery, R., J. Salleron, A. Dewilde, J. Rossignol, E. M. Boyle, J. Gay, E. de Berranger, V. Coiteux, J. P. Jouet, A. Duhamel, and I. Yakoub-Agha. Early human herpesvirus type 6 reactivation after allogeneic stem cell transplantation: a large-scale clinical study. *Biol Blood Marrow Transplant* 18:1080-1089.
4. de Pagter, P. J., R. Schuurman, E. Meijer, D. van Baarle, E. A. Sanders, and J. J. Boelens. 2008. Human herpesvirus type 6 reactivation after haematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Virol* 43:361-366.
5. de Pagter, P. J., R. Schuurman, H. Visscher, M. de Vos, M. Bierings, A. M. van Loon, C. S. Uiterwaal, D. van Baarle, E. A. Sanders, and J. Boelens. 2008. Human herpes virus 6 plasma DNA positivity after hematopoietic stem cell transplantation in children: an important risk factor for clinical outcome. *Biol Blood Marrow Transplant* 14:831-839.
6. Rapaport, D., D. Engelhard, G. Tagger, R. Or, and N. Frenkel. 2002. Antiviral prophylaxis may prevent human herpesvirus-6 reactivation in bone marrow transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 4:10-16.
7. Razonable, R. R. Antiviral drugs for viruses other than human immunodeficiency virus. *Mayo Clin Proc* 86:1009-1026.

8. Zerr, D. M., D. Gupta, M. L. Huang, R. Carter, and L. Corey. 2002. Effect of antivirals on human herpesvirus 6 replication in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 34:309-317.
9. Agut, H., J. T. Aubin, and J. M. Huraux. 1991. Homogeneous susceptibility of distinct human herpesvirus 6 strains to antivirals in vitro. *J Infect Dis* 163:1382-1383.
10. O'Reilly, R. J., T. N. Small, E. Papadopoulos, K. Lucas, J. Lacerda, and L. Koulova. 1998. Adoptive immunotherapy for Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders complicating marrow allografts. *Springer Semin Immunopathol* 20:455-491.
11. Nickel, P., G. Bold, F. Presber, D. Biti, N. Babel, S. Kreutzer, J. Pratschke, C. Schonemann, F. Kern, H. D. Volk, and P. Reinke. 2009. High levels of CMV-IE-1-specific memory T cells are associated with less alloimmunity and improved renal allograft function. *Transpl Immunol* 20:238-242.
12. Lucas, K. G., D. Salzman, A. Garcia, and Q. Sun. 2004. Adoptive immunotherapy with allogeneic Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T-lymphocytes for recurrent, EBV-positive Hodgkin disease. *Cancer* 100:1892-1901.
13. Chatziandreou, I., K. C. Gilmour, A. M. McNicol, M. Costabile, J. Sinclair, D. Cubitt, J. D. Campbell, C. Kinnon, W. Qasim, and H. B. Gaspar. 2007. Capture and generation of adenovirus specific T cells for adoptive immunotherapy. *Br J Haematol* 136:117-126.
14. Karlsson, H., J. Brewin, C. Kinnon, P. Veys, and P. J. Amrolia. 2007. Generation of trispecific cytotoxic T cells recognizing cytomegalovirus, adenovirus, and Epstein-Barr virus: an approach for adoptive immunotherapy of multiple pathogens. *J Immunother* 30:544-556.
15. Dominguez, G., T. R. Dambaugh, F. R. Stamey, S. Dewhurst, N. Inoue, and P. E. Pellett. 1999. Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A. *J Virol* 73:8040-8052.

16. Isegawa, Y., T. Mukai, K. Nakano, M. Kagawa, J. Chen, Y. Mori, T. Sunagawa, K. Kawanishi, J. Sashihara, A. Hata, P. Zou, H. Kosuge, and K. Yamanishi. 1999. Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B. *J Virol* 73:8053-8063.
17. Yamanishi, K., T. Okuno, K. Shiraki, M. Takahashi, T. Kondo, Y. Asano, and T. Kurata. 1988. Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet* 1:1065-1067.
18. Secchiero, P., D. R. Carrigan, Y. Asano, L. Benedetti, R. W. Crowley, A. L. Komaroff, R. C. Gallo, and P. Lusso. 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.
19. Zerr, D. M. Human herpesvirus 6 (HHV-6) disease in the setting of transplantation. *Curr Opin Infect Dis* 25:438-444.
20. Wang, L. R., L. J. Dong, and D. P. Lu. 2006. [Correlation between human herpesvirus 6 activation and acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 27:507-510.
21. Tsujimura, H., T. Iseki, Y. Date, J. Watanabe, K. Kumagai, K. Kikuno, H. Yonemitsu, and H. Saisho. 1998. Human herpesvirus-6 encephalitis after bone marrow transplantation: magnetic resonance imaging could identify the involved sites of encephalitis. *Eur J Haematol* 61:284-285.
22. Razonable, R. R. Infections due to human herpesvirus 6 in solid organ transplant recipients. *Curr Opin Organ Transplant*.
23. Pichereau, C., K. Desseaux, A. Janin, C. Scieux, R. Peffault de Latour, A. Xhaard, M. Robin, P. Ribaud, F. Agbalika, S. Chevret, and G. Socie. The complex relationship between human herpesvirus 6 and acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 18:141-144.

24. Nakayama, T., F. Okada, Y. Ando, K. Honda, M. Ogata, K. Goto, J. Kadota, and H. Mori. A case of pneumonitis and encephalitis associated with human herpesvirus 6 (HHV-6) infection after bone marrow transplantation. *Br J Radiol* 83:e255-258.
25. Kitamura, K., H. Asada, H. Iida, T. Fukumoto, N. Kobayashi, H. Niizeki, T. Morii, H. Kimura, and S. Miyagawa. 2008. Relationship among human herpesvirus 6 reactivation, serum interleukin 10 levels, and rash/graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *J Am Acad Dermatol* 58:802-809.
26. Bosi, A., M. Zazzi, A. Amantini, M. Cellerini, A. M. Vannucchi, A. De Milito, S. Guidi, R. Saccardi, L. Lombardini, D. Laszlo, and P. Rossi Ferrini. 1998. Fatal herpesvirus 6 encephalitis after unrelated bone marrow transplant. *Bone Marrow Transplant* 22:285-288.
27. Nastke, M. D., A. Becerra, L. Yin, O. Dominguez-Amorocho, L. Gibson, L. J. Stern, and J. M. Calvo-Calle. Human CD4+ T cell response to human herpesvirus 6. *J Virol* 86:4776-4792.
28. Martin, L. K., A. Schub, S. Dillinger, and A. Moosmann. Specific CD8(+) T cells recognize human herpesvirus 6B. *Eur J Immunol* 42:2901-2912.
29. Gerdemann, U., L. Keukens, J. M. Keirnan, U. L. Katari, C. T. Nguyen, A. P. de Pagter, C. A. Ramos, A. Kennedy-Nasser, S. M. Gottschalk, H. E. Heslop, M. K. Brenner, C. M. Rooney, and A. M. Leen. Immunotherapeutic strategies to prevent and treat human herpesvirus 6 reactivation after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 121:207-218.
30. Alper, C. A., C. E. Larsen, D. P. Dubey, Z. L. Awdeh, D. A. Fici, and E. J. Yunis. 2006. The haplotype structure of the human major histocompatibility complex. *Hum Immunol* 67:73-84.
31. Gosselin, J., A. Tomoiu, R. C. Gallo, and L. Flamand. 1999. Interleukin-15 as an activator of natural killer cell-mediated antiviral response. *Blood* 94:4210-4219.
32. Hearn, A., I. A. York, and K. L. Rock. 2009. The specificity of trimming of MHC class I-presented peptides in the endoplasmic reticulum. *J Immunol* 183:5526-5536.

33. York, I. A., E. P. Grant, A. M. Dahl, and K. L. Rock. 2005. A mutant cell with a novel defect in MHC class I quality control. *J Immunol* 174:6839-6846.
34. Hasan, A. N., A. Selvakumar, E. Doubrovina, I. Riviere, M. W. Sadelain, and R. J. O'Reilly. 2009. Artificial antigen presenting cells that express prevalent HLA alleles: A step towards the broad application of antigen-specific adoptive cell therapies. *Discov Med* 8:210-218.
35. Kern, F., I. P. Surel, C. Brock, B. Freistedt, H. Radtke, A. Scheffold, R. Blasczyk, P. Reinke, J. Schneider-Mergener, A. Radbruch, P. Walden, and H. D. Volk. 1998. T-cell epitope mapping by flow cytometry. *Nat Med* 4:975-978.
36. Kern, F., N. Faulhaber, C. Frommel, E. Khatamzas, S. Prosch, C. Schonemann, I. Kretzschmar, R. Volkmer-Engert, H. D. Volk, and P. Reinke. 2000. Analysis of CD8 T cell reactivity to cytomegalovirus using protein-spanning pools of overlapping pentadecapeptides. *Eur J Immunol* 30:1676-1682.
37. Hoffmeister, B., F. Kiecker, L. Tesfa, H. D. Volk, L. J. Picker, and F. Kern. 2003. Mapping T cell epitopes by flow cytometry. *Methods* 29:270-281.
38. Jaworska, J., A. Gravel, K. Fink, N. Grandvaux, and L. Flamand. 2007. Inhibition of transcription of the beta interferon gene by the human herpesvirus 6 immediate-early 1 protein. *J Virol* 81:5737-5748.
39. Campeau, E., V. E. Ruhl, F. Rodier, C. L. Smith, B. L. Rahmberg, J. O. Fuss, J. Campisi, P. Yaswen, P. K. Cooper, and P. D. Kaufman. 2009. A versatile viral system for expression and depletion of proteins in mammalian cells. *PLoS One* 4:e6529.
40. Dull, T., R. Zufferey, M. Kelly, R. J. Mandel, M. Nguyen, D. Trono, and L. Naldini. 1998. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72:8463-8471.

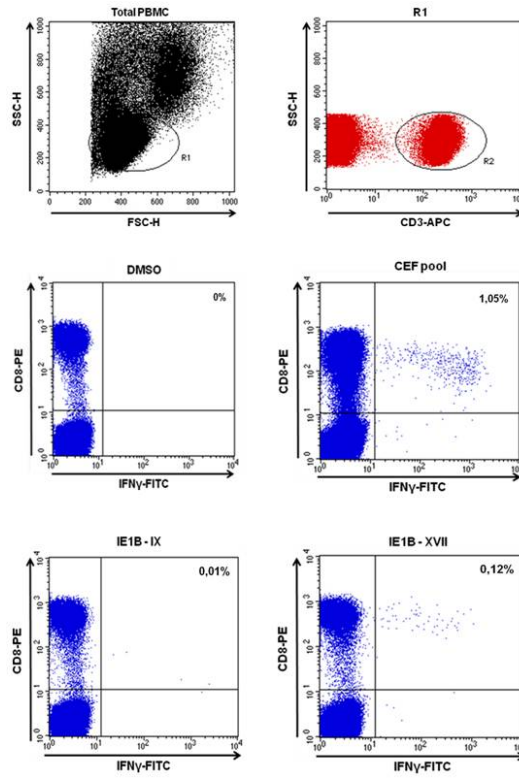
41. Gravel, A., J. Gosselin, and L. Flamand. 2002. Human Herpesvirus 6 immediate-early 1 protein is a sumoylated nuclear phosphoprotein colocalizing with promyelocytic leukemia protein-associated nuclear bodies. *J Biol Chem* 277:19679-19687.
42. Jaworska, J., A. Gravel, and L. Flamand. Divergent susceptibilities of human herpesvirus 6 variants to type I interferons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:8369-8374.
43. Zandvliet, M. L., E. van Liempt, I. Jedema, L. A. Veltrop-Duits, R. Willemze, H. J. Guchelaar, J. H. Falkenburg, and P. Meij. Co-ordinated isolation of CD8(+) and CD4(+) T cells recognizing a broad repertoire of cytomegalovirus pp65 and IE1 epitopes for highly specific adoptive immunotherapy. *Cytotherapy* 12:933-944.
44. Hebart, H., G. Rauser, S. Stevanovic, C. Haenle, A. K. Nussbaum, C. Meisner, A. L. Bissinger, S. Tenzer, G. Jahn, J. Loeffler, H. G. Rammensee, H. Schild, and H. Einsele. 2003. A CTL epitope from human cytomegalovirus IE1 defined by combining prediction of HLA binding and proteasomal processing is the target of dominant immune responses in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Exp Hematol* 31:966-973.
45. Bennett, N. J., J. S. May, and P. G. Stevenson. 2005. Gamma-herpesvirus latency requires T cell evasion during episome maintenance. *PLoS Biol* 3:e120.
46. Gravel, A., D. Ablashi, and L. Flamand. Complete Genome Sequence of Early Passaged Human Herpesvirus 6A (GS Strain) Isolated from North America. *Genome Announc* 1.
47. Levitskaya, J., M. Coram, V. Levitsky, S. Imreh, P. M. Steigerwald-Mullen, G. Klein, M. G. Kurilla, and M. G. Masucci. 1995. Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature* 375:685-688.
48. Kwun, H. J., S. R. da Silva, I. M. Shah, N. Blake, P. S. Moore, and Y. Chang. 2007. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen 1 mimics Epstein-Barr virus EBNA1 immune evasion through central repeat domain effects on protein processing. *J Virol* 81:8225-8235.

49. Aubin, J. T., H. Agut, H. Collandre, K. Yamanishi, B. Chandran, L. Montagnier, and J. M. Huraux. 1993. Antigenic and genetic differentiation of the two putative types of human herpes virus 6. *J Virol Methods* 41:223-234.
50. De Bolle, L., L. Naesens, and E. De Clercq. 2005. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clin Microbiol Rev* 18:217-245.
51. Wang, L. R., L. J. Dong, M. J. Zhang, and D. P. Lu. 2006. The impact of human herpesvirus 6B reactivation on early complications following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 12:1031-1037.
52. Ishiyama, K., T. Katagiri, T. Hoshino, T. Yoshida, M. Yamaguchi, and S. Nakao. Preemptive therapy of human herpesvirus-6 encephalitis with foscarnet sodium for high-risk patients after hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 46:863-869.
53. Leen, A. M., A. Christin, G. D. Myers, H. Liu, C. R. Cruz, P. J. Hanley, A. A. Kennedy-Nasser, K. S. Leung, A. P. Gee, R. A. Krance, M. K. Brenner, H. E. Heslop, C. M. Rooney, and C. M. Bollard. 2009. Cytotoxic T lymphocyte therapy with donor T cells prevents and treats adenovirus and Epstein-Barr virus infections after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood* 114:4283-4292.
54. Barker, J. N., E. Doubrovina, C. Sauter, J. J. Jaroscak, M. A. Perales, M. Doubrovin, S. E. Prockop, G. Koehne, and R. J. O'Reilly. Successful treatment of EBV-associated posttransplantation lymphoma after cord blood transplantation using third-party EBV-specific cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 116:5045-5049.
55. Gerdemann, U., J. M. Keirnan, U. L. Katari, R. Yanagisawa, A. S. Christin, L. E. Huye, S. K. Perna, S. Ennamuri, S. Gottschalk, M. K. Brenner, H. E. Heslop, C. M. Rooney, and A. M. Leen. Rapidly generated multivirus-specific cytotoxic T lymphocytes for the prophylaxis and treatment of viral infections. *Mol Ther* 20:1622-1632.

56. Gerdemann, U., J. F. Vera, C. M. Rooney, and A. M. Leen. Generation of multivirus-specific T cells to prevent/treat viral infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *J Vis Exp*.
57. Rickinson, A. B., and D. J. Moss. 1997. Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection. *Annu Rev Immunol* 15:405-431.
58. Wills, M. R., A. J. Carmichael, K. Mynard, X. Jin, M. P. Weekes, B. Plachter, and J. G. Sissons. 1996. The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J Virol* 70:7569-7579.
59. Cerundolo, V., A. G. Tse, R. D. Salter, P. Parham, and A. Townsend. 1991. CD8 independence and specificity of cytotoxic T lymphocytes restricted by HLA-Aw68.1. *Proc Biol Sci* 244:169-177.

Figure 1

A)



B)

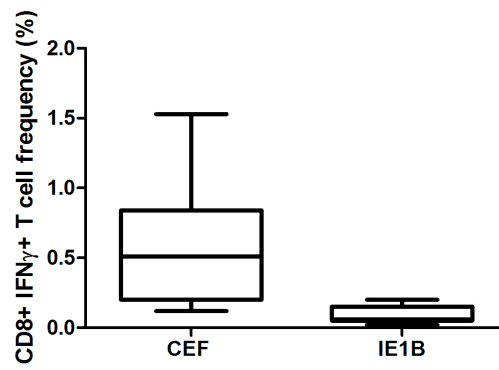
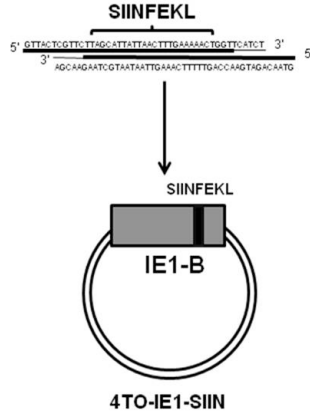
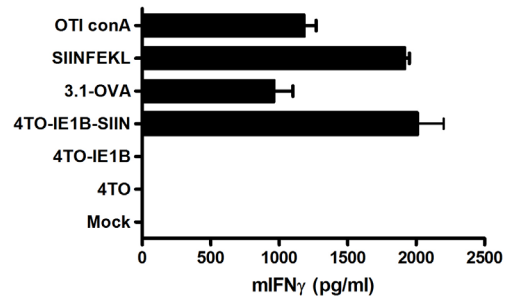


Figure 2

A)



B)



C)

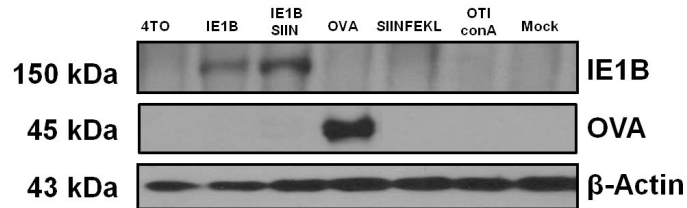
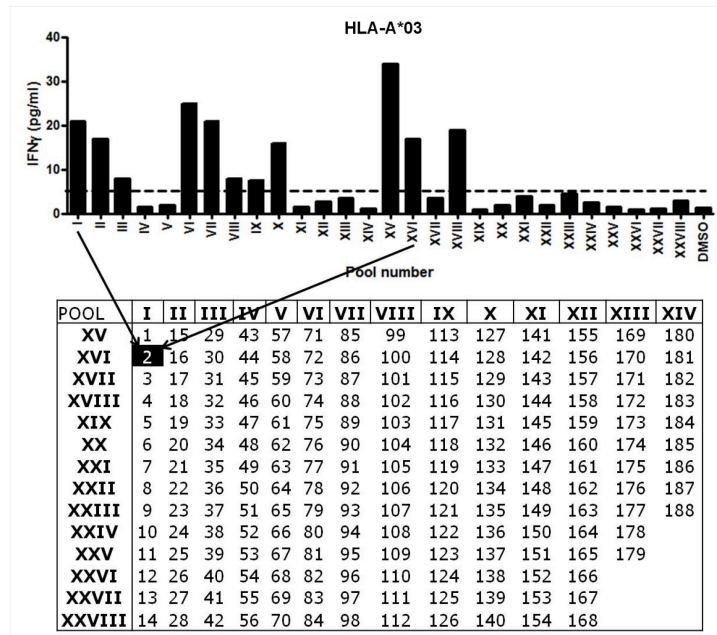
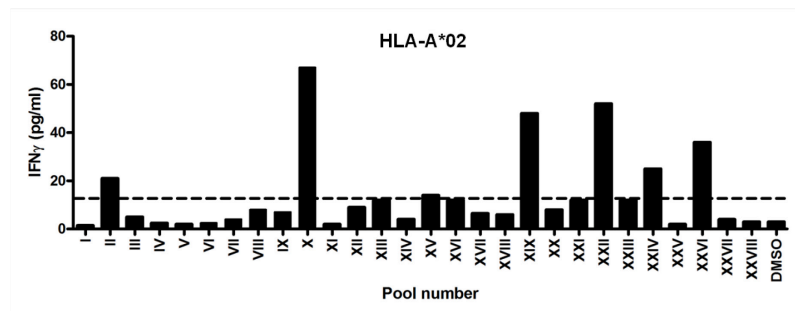


Figure 3

A)



B)



C)

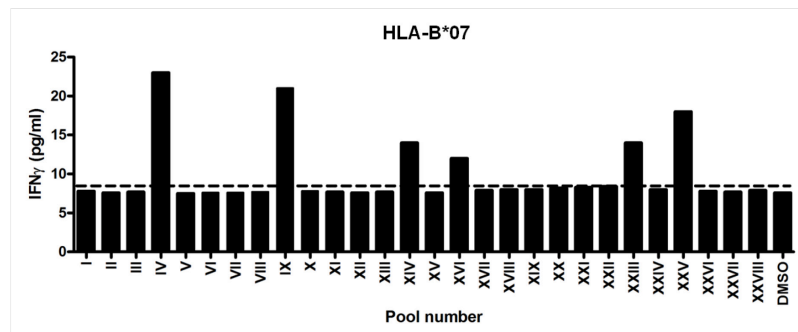
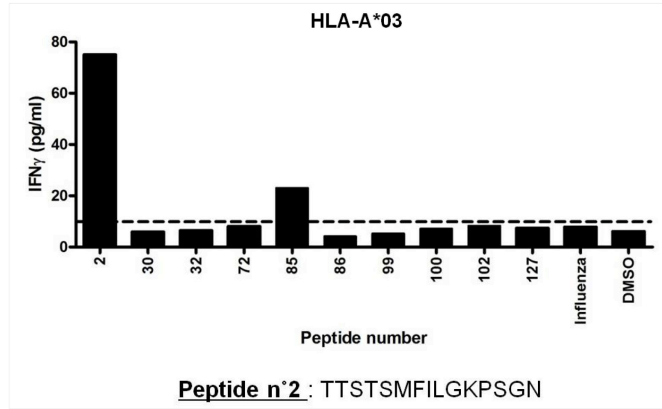
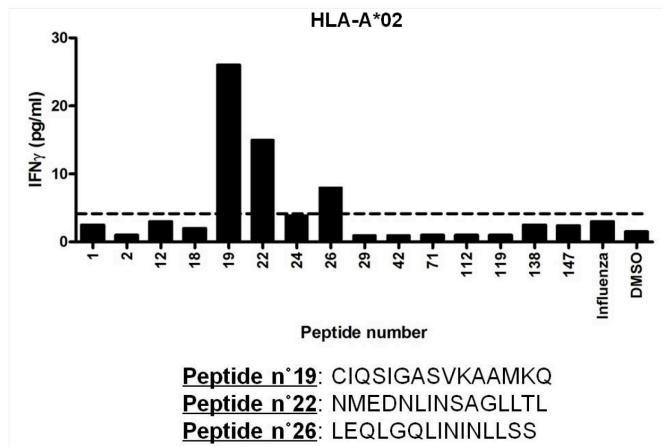


Figure 4

A)



B)



C)

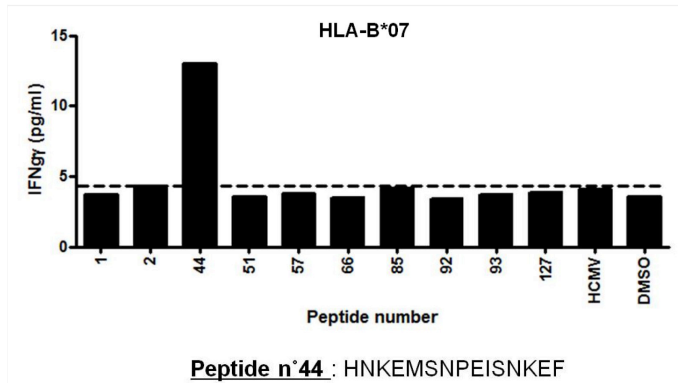
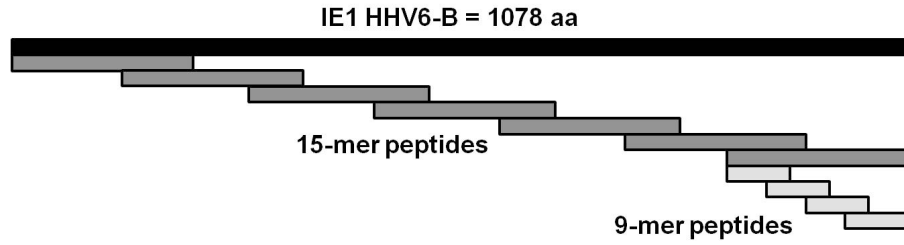


Figure 5

A)



B)

Peptide n°2 : TTSTSMFILGKPSGN

TTSTSMFIL
 TSTSMFILG
 STSMFILGK
 TSMFILGKP
 SMFILGKPS
 MFILGKPSG
 FILGKPSGN

C)

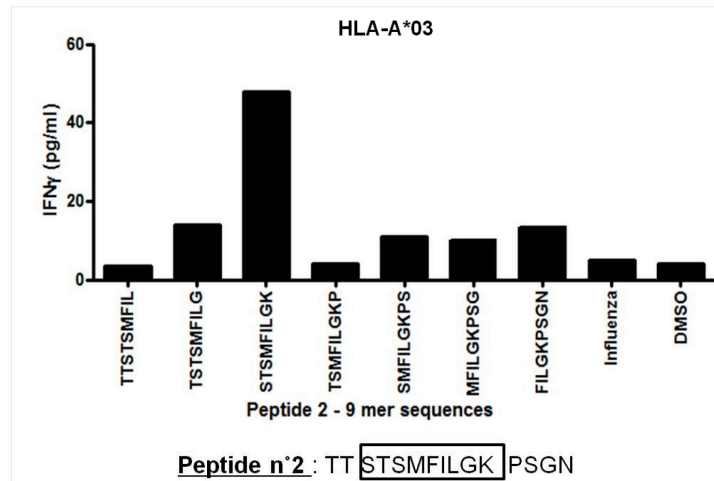
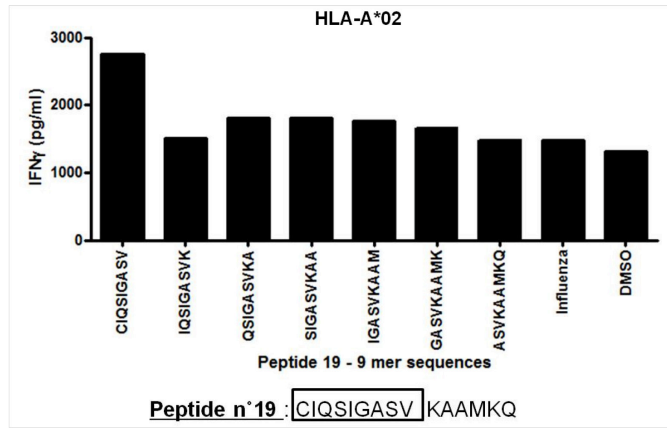


Figure 5

D)



E)

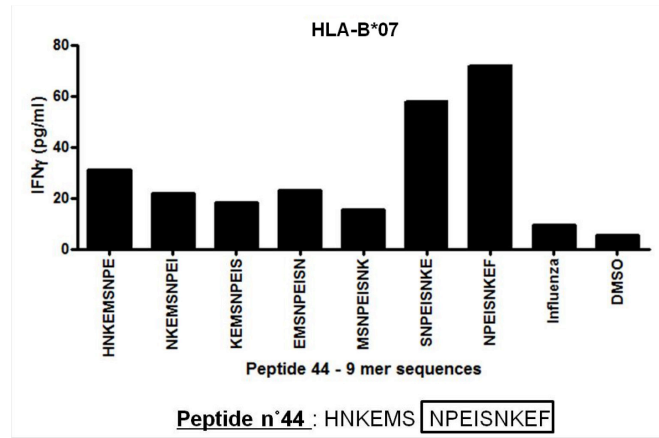
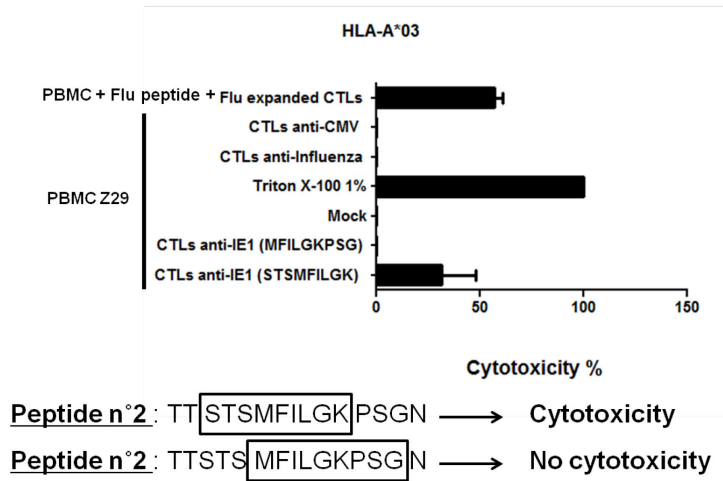


Figure 6

A)



B)

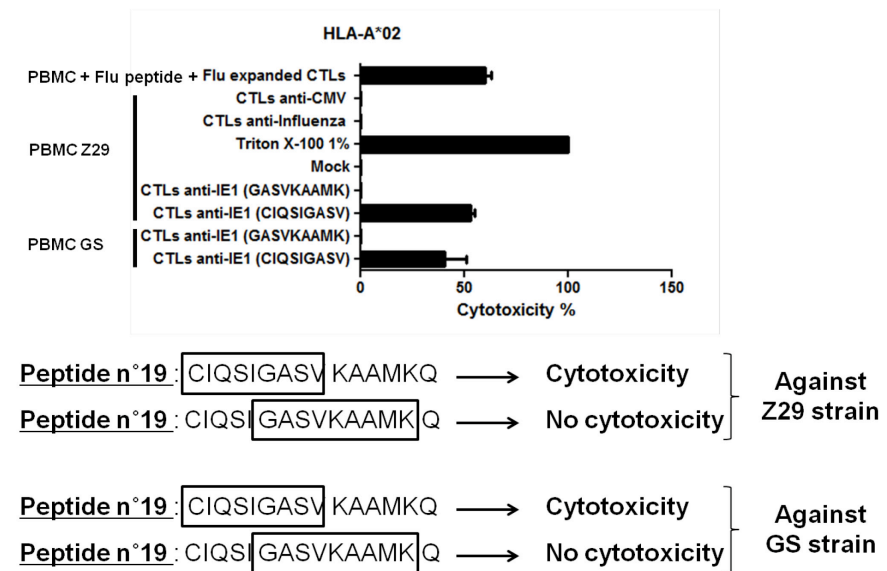
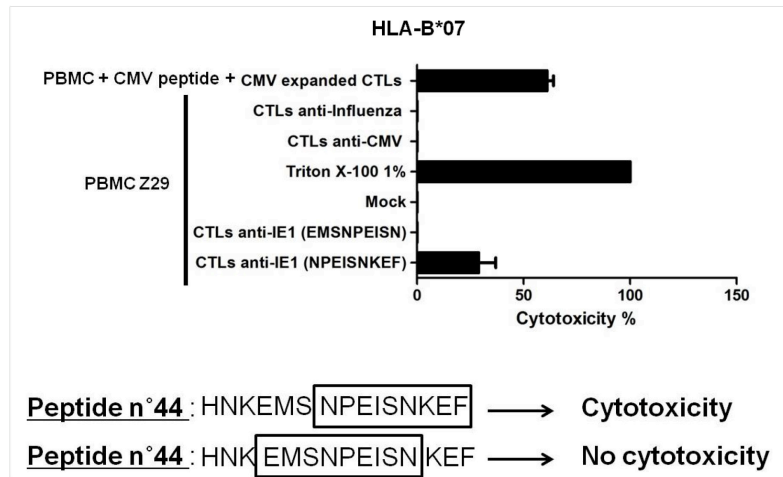


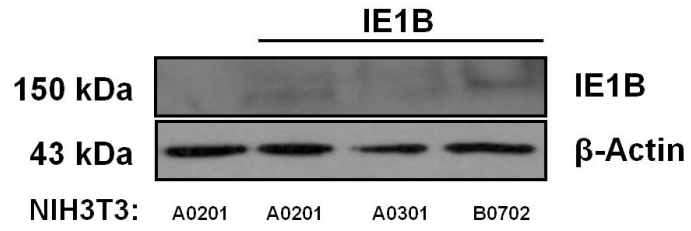
Figure 6

C)



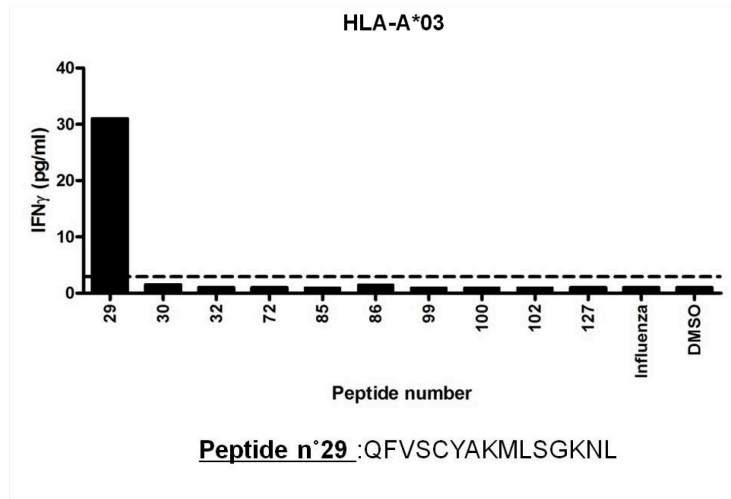
Supplementary figure 1

A)



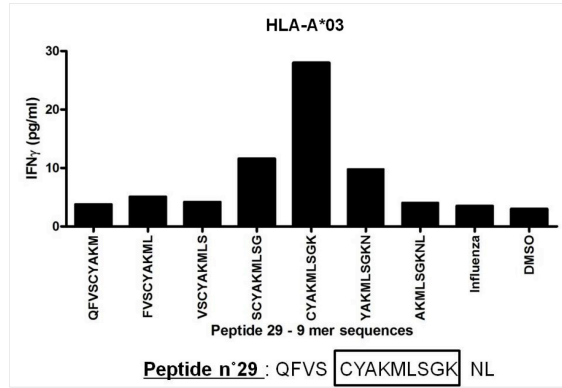
Supplementary figure 2

A)

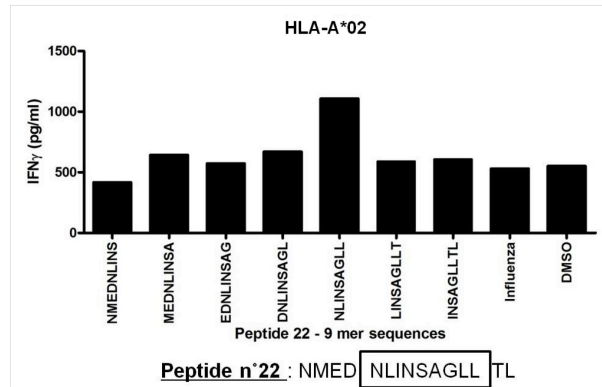


Supplementary figure 3

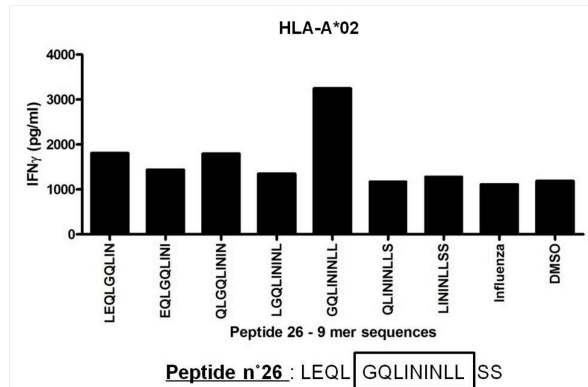
A)



B)

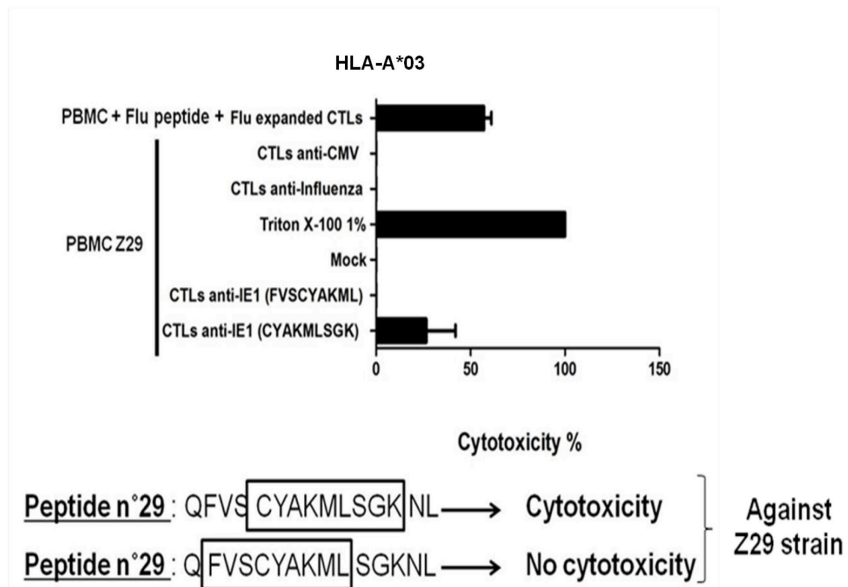


C)

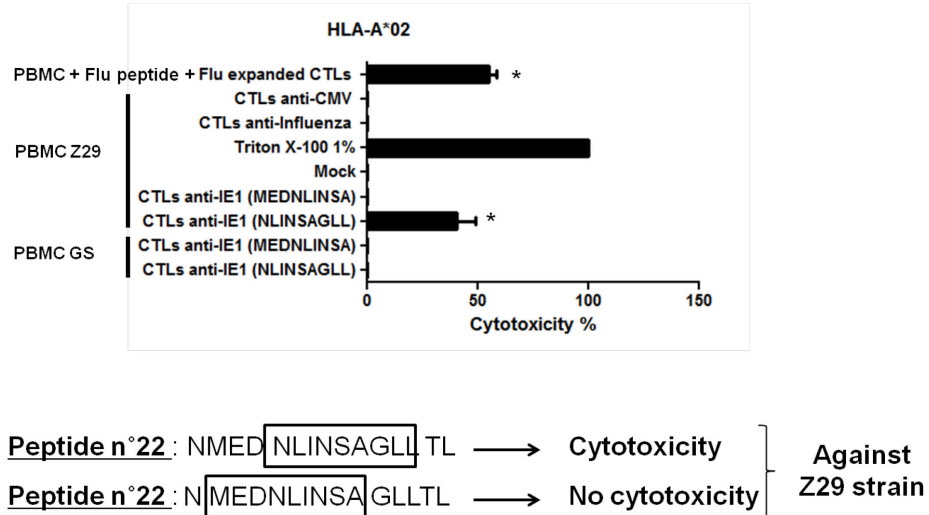


Supplementary figure 4

A)

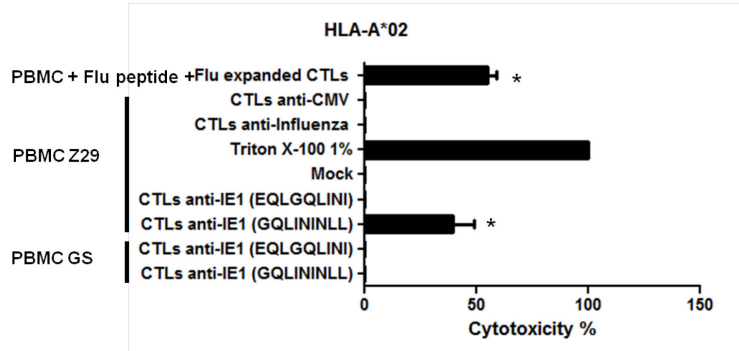


B)



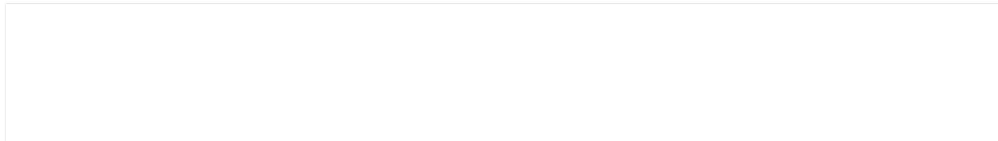
Supplementary figure 4

C)



Peptide n°26: LEQL GQLININLL SS → Cytotoxicity
Peptide n°26: L EQLGQLINI NLLSS → No cytotoxicity

} Against Z29 strain



6. Discussion générale

Nos recherches se sont concentrées sur deux axes impliquant le virus HHV-6B. Ces dernières années, notre laboratoire a effectué plusieurs travaux permettant la caractérisation de mécanismes d'évasion immunitaire par les virus HHV-6A et HHV-6B, notamment Jaworska et al. qui ont été les premiers à démontrer le rôle de la protéine IE1 dans l'immunité innée et l'inhibition de l'expression du gène de l'*IFN-β*. Nous nous sommes concentrés sur un nouveau mécanisme d'évasion agissant sur l'immunité adaptative. Dans un premier temps, nous avons identifié la protéine virale de tégument U54 comme un élément impliqué dans l'inhibition de la synthèse d'IL-2 par HHV-6, mécanisme décrit en 1995 par Flamand et al. à l'aide de virus infectieux sur des lymphocytes T CD4+ primaires. Nous avons également décrit le mécanisme par lequel la protéine U54 interagit avec la voie CaN/NFAT et empêche l'activité transactivatrice du facteur de transcription NFAT. Nous avons caractérisé l'inhibition de la déphosphorylation de NFAT par la CaN phosphatase, inhibant ainsi sa translocation nucléaire et sa fixation à l'ADN. Nous avons ensuite évalué l'impact que peut avoir la protéine U54 sur des mécanismes dépendants de la signalisation CaN/NFAT, notamment dans le cancer du sein, dont la progression semble en être dépendante, par exemple, cette signalisation favorise la migration et l'invasion des tumeurs. Des travaux menés par Jiang et al. ont également démontré que la CsA, une drogue sélective inhibant l'activité de la CaN, abroge la progression tumorale en inhibant l'action de la pyruvate kinase M2 (PKM2) dans le cancer du sein. De notre côté, nous avons pu démontrer que la protéine U54 peut ralentir la prolifération d'une lignée cellulaire de cancer du sein MCF-7 d'environ 25%. Enfin, HHV-6B est responsable d'une grande morbidité voire mortalité suite à une réactivation chez des personnes immunodéprimées. Cela fait environ vingt ans que des protocoles d'immunothérapie par transfert adoptif de CTL spécifiques d'antigènes viraux ont été mis au point et sont utilisés dans des protocoles cliniques contre des virus herpétiques, dont le premier fut l'EBV au début des années 90. S'en sont suivis des travaux effectués sur le HCMV, appartenant à la même sous-famille que HHV-6B, qui ont permis d'élargir le champ d'application des immunothérapies adoptives. C'est en se basant sur les études faites sur le HCMV et la caractérisation de peptides immunodominants contre la protéine IE1-HCMV que nous avons décidé de rechercher des cibles immunodominantes pour IE1-HHV6B et que nous avons été capables d'en identifier 6 restreintes aux allèles HLA-A*02, HLA-A*03 ou HLA-B*07.

Les virus sont des organismes biologiques qui ont été capables de développer divers mécanismes afin de pouvoir coexister avec leurs hôtes. Ils ont dû s'adapter au système immunitaire de l'hôte qui lui est capable d'élargir son champ d'action au fur et à mesure qu'il rencontre de

pathogènes. En général, plus le génome est gros, plus le virus va être capable d'exprimer de protéines, et sera donc en mesure de développer des stratégies d'évasion du système immunitaire de l'hôte. Les virus herpétiques sont parmi les virus ayant le plus gros génome parmi les pathogènes humains. Cette caractéristique leur permet d'agir et d'empêcher la personne infectée de se défendre en inhibant la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire adaptative mais va également pouvoir moduler la réponse inflammatoire en favorisant une réponse anti-inflammatoire. Enfin, les virus herpétiques sont parmi les virus les mieux « équipés » afin de persévérer au sein de leur hôte. Pour cela, ils ont su développer un mécanisme de latence, qui va se caractériser par une expression minimale de protéines vraiment nécessaires à leur maintien, et peuvent rester cachés dans les cellules sous forme d'un épisome avant d'éventuellement se réactiver et induire un nouveau cycle lytique. Ces réactivations ont généralement lieu chez des personnes immunodéprimées et c'est pour ces raisons qu'il est important de pouvoir les prévenir ou le cas échéant de les traiter par immunothérapie adoptive.

6.1 La protéine U54 de HHV-6B inhibe la l'expression du gène de l'IL-2 et la prolifération des cellules de cancer du sein MCF-7 en perturbant la voie de signalisation CaN/NFAT

Les études qui ont été effectuées dans cette section ont permis la caractérisation du mécanisme par lequel la protéine de tégument U54 du HHV-6B est capable d'abroger l'expression du gène de l'IL-2 et la croissance de cellules de cancer du sein en inhibant la signalisation dépendante de NFAT. D'autres pathogènes ont déjà été identifiés comme exprimant des protéines capables d'abroger la signalisation CaN/NFAT, telles que Vac A exprimée par *Helicobacter pylori* ou A238L exprimée par le virus de la fièvre porcine africaine. Pour la première fois depuis l'observation de l'effet de l'infection de lymphocytes T CD4+ par HHV-6, nous avons identifié la protéine U54 comme étant l'élément viral perpétrant la diminution de la synthèse de l'IL-2. En effet, suite aux travaux de Flaman et al. qui ont démontrés qu'un virus HHV-6 inactivé par irradiation UV était toujours capable d'inhiber la synthèse d'IL-2 et la prolifération cellulaire des LT CD4+ infectés, nous avons décidé de rechercher le ou les éléments responsables parmi les protéines de la structure virale. Au sein du laboratoire, nous possédions des vecteurs d'expression codant pour quatre protéines du tégument : 1) U11 caractérisée comme la protéine la plus immunogène pour la réponse anticorps, 2) U30 et U31 qui sont exprimées à partir de la construction transactivatrice pzVH14 et 3) U54 qui est l'analogue de la protéine pp65 du HCMV et décrite

comme transactivatrice également. Nous avons donc testé l'effet de ces éléments sur des facteurs nécessaires à l'expression de l'IL-2. Nos premières observations ont permis d'établir que dans des cellules stimulées avec des phorbols esters (TPA) et un ionophore calcique (ionomycine) exprimant la protéine U54, les facteurs NFAT endogènes ou exogènes ont une activité transcriptionnelle diminuée d'environ 95% tant sur un promoteur minimal de l'IL-2 composé de de trois régions promotrices NFAT (NFAT-luc) qu'un promoteur complexe complet de l'IL-2 (IL-2-luc). Ces tests nous ont permis de vérifier que l'effet inhibiteur perpétré par U54 était spécifique au facteur NFAT et n'affectait pas d'autres éléments de promoteurs tels que AP-1 ou encore NF- κ B. Quand on étudie la signalisation qui contrôle l'expression de l'IL-2, nous mettons en avant l'enzyme phosphatase CaN et le facteur de transcription NFAT dont l'activation dépend de la CaN.

Nous avons donc décidé d'étudier l'impact d'U54 sur l'interaction CaN-NFAT dont dépend l'activation de tous les mécanismes sous-jacents de cette signalisation. L'activité physiologique normale démarre par l'activation du TCR qui va stimuler la libération et l'entrée de Ca^{2+} dans le cytoplasme qui à son tour va activer la calmoduline. La calmoduline va ensuite former un complexe avec la CaN qui va alors devenir active et se lier à NFAT afin de le déphosphoryler sur ses motifs sérines grâce à son activité phosphatase. Une fois déphosphorylé, le facteur NFAT est sous sa forme active et va alors transloquer dans le noyau grâce à une importine afin de se fixer à l'ADN et ainsi transcrire les gènes cibles en association avec d'autres facteurs de transcription. Un inhibiteur classique permettant d'abroger cette voie est la CsA dont on s'est servi comme témoin positif d'une inhibition de la signalisation dans nos travaux. Cependant, il a été démontré que des peptides synthétiques possédant une séquence particulière de liaison à la CaN VIVIT sont capables d'inhiber la déphosphorylation du facteur cellulaire cible NFAT. C'est le cas de la protéine A238L du virus de la fièvre porcine africaine qui possède une séquence PKIITG capable de se lier à la CaN avec une haute affinité et plus rapidement que la protéine NFAT2 porcine.

A partir de ce postulat, une étude plus approfondie de la séquence protéique a permis l'identification d'un motif U54₂₉₃₋₂₉₇ GISIT similaire au motif de liaison à la CaN présents sur les protéines NFAT PxIxIT. A partir de cette observation, nous avons été en mesure de vérifier l'implication d'U54 sur cette interaction CaN-NFAT. Dans un premier temps, nous avons démontré que la protéine U54 interagit avec la CaN par des études d'immunoprécipitation. Nous avons ensuite vérifié que l'activité phosphatase est abrogée par U54 dûe à une interaction U54-CaN qui inhibe l'activité phosphatase de la CaN. De fait, le facteur NFAT1 reste donc dans sa forme hyperphosphorylé inactif. Enfin, nous avons démontré qu'en présence d'U54, les facteurs NFAT phosphorylés inactifs sont incapables d'être transloqués dans le noyau et restent dans le cytoplasme

des cellules. Suite à l'identification des mécanismes détournés par U54, nous avons vérifié l'hypothèse que les acides aminés U54₂₉₆₋₂₉₇ IT sont en partie responsables de cet effet. Dans le passé, il a été démontré que lorsque les aa IT d'autres domaines de liaison à la CaN étaient mutés par des aa A, on observe une perte de capacité de liaison à l'enzyme phosphatase. Afin de confirmer que le motif U54₂₉₃₋₂₉₇ GISIT est responsable de cette inhibition, nous avons créé un mutant de substitution U54_{Δ293-297} GISAA (U54mut) qui lorsqu'il est exprimé dans des cellules stimulées avec du TPA et de la ionomycine, n'est pas capable de moduler et d'inhiber la voie CaN/NFAT autant que la protéine U54 sauvage. Pour finir, toutes ces études ont été confirmées dans une lignée cellulaire de lymphocytes T capables de synthétiser de l'IL-2 physiologiquement. Lorsque les cellules T J-Jhan expriment la protéine U54, elles perdent 90% de leur capacité à synthétiser de l'ARNm d'IL-2 dépendant de l'activité de NFAT alors qu'en présence de U54mut, cette inhibition est moindre. Toute cette étude a permis la caractérisation d'une stratégie déployée par HHV-6 afin de moduler le système immunitaire de l'hôte à son avantage et d'y persister. Ces travaux permettent également d'identifier une deuxième protéine virale, la première chez un virus humain, capable de moduler la voie de signalisation CaN/NFAT après la protéine A238L du virus de la fièvre porcine africaine.

Au vue des résultats que nous avons obtenus au cours des premiers travaux et du fait que la voie CaN/NFAT semble jouer un rôle majeur dans la pathogénèse induite par différents cancers, nous avons décidé d'étudier l'activité d'U54 dans la progression du cancer du sein. En effet, la surexpression et l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de NFAT a été détecté dans de nombreux types de cancers telles que les maladies hématologiques ou encore les cancers du sein ou colorectaux. Cela se caractérise par une prolifération, une survie, une migration et une invasion accrues des cellules cancéreuses. Par exemple, les facteurs NFAT peuvent promouvoir, entre autres, l'angiogénèse tumorale suite à son activation par le VEGF qui à son tour favorise l'induction du gène de la *COX-2*. L'activation de NFAT peut également aboutir à l'induction de facteurs solubles provenant de la tumeur qu'il reste à identifier, et qui peuvent jouer un rôle paracrine ou autocrine favorisant la progression tumorale. De fait, l'utilisation de molécules inhibitrices de l'activité NFAT telles que la CsA diminuent la progression tumorale. Ces différents inhibiteurs sont d'ailleurs prédits comme pouvant supprimer la tumorigénèse et peuvent devenir des traitements anti-cancéreux futurs. Effectivement, dans des lignées cellulaires de cancer du sein MCF-7 qui expriment la protéine U54 de manière transitoire, nous avons pu observer de nouveau une inhibition de l'activité transcriptionnelle du facteur NFAT1 exogène, accompagnée d'une diminution de la prolifération cellulaire d'environ 25% par son action sur la protéine NFAT2 endogène. Ces

premières observations confirment les théories éditées sur les molécules capables d'inhiber l'activité de NFAT et il serait très intéressant de persister dans ce domaine de recherche afin de clairement caractériser tous les mécanismes associés à cette voie de signalisation et les possibles avenues thérapeutiques à utiliser ou à créer en fonction des types de cancers que l'on souhaite traiter. De plus, l'utilisation d'une protéine virale immunodominante comme la protéine U54 du HHV-6B pourrait également servir à la mise en place de protocoles combinés de virothérapie et d'immunothérapie adoptive du fait du double avantage que son utilisation pourrait donner. En effet, dans des travaux de Nastke et al. , U54 a été caractérisée comme étant une protéine capable d'induire une forte réponse immunitaire, faisant d'elle une cible privilégiée de l'hôte. La première étape consisterait à transporter la séquence codante pour U54 dans les cellules cancéreuses grâce à un protocole de virothérapie, qui favorisera l'expression du gène viral par les cellules cancéreuses en division, alors que les cellules saines seront épargnées. Ceci permettrait dans un premier temps de ralentir la progression tumorale, et dans un second temps servirait à marquer les cellules cancéreuses grâce à la présentation antigénique de peptides de U54 à la surface cellulaire, faisant d'elles des cibles préférentielles pouvant être reconnues et détruites spécifiquement par des clones CTL anti-U54. La mise en œuvre d'un tel protocole pourrait permettre d'aboutir à l'éradication des tumeurs via un protocole d'immunothérapie adoptive.

6.2 Identification de peptides immunodominants de la protéine IE1 du HHV-6B pour un protocole d'immunothérapie adoptive

Chaque individu ayant été infecté par HHV-6B possède des cellules circulantes B et T mémoires qui sont là pour faire face à une éventuelle réactivation. Ces cellules vont être capables de s'expandre et de contrôler une réactivation chez un individu sain. Au niveau des personnes immunodéprimées, ce type de cellules est déficient ou insuffisant et cela peut aboutir à des réactivations virales de HHV6-B incontrôlées pouvant mener à des pathologies très graves. Au cours des vingt dernières années, des protocoles d'immunothérapie adoptive ont été mis au point contre différents virus herpétiques, notamment contre l'EBV et le HCMV dont les transferts adoptifs de cellules T donnent de très bons résultats chez les patients transplantés. A partir de lymphocytes T isolés chez le donneur sain, l'expansion clonale est induite grâce à un cocktail de cytokines pro-inflammatoires combinant l'IL-2 et l'IL-7 qui vont favoriser une croissance cellulaire

rapide et la réponse immunitaire de type Th1. S'en suivra après une dizaine de jours d'expansion, la réinjection de ces clones cellulaires en grande quantité chez le receveur immunosupprimée ce qui permettra de contrôler les réactivations virales en plus d'améliorer les prises de greffe et le recouvrement d'une immunité efficace. Il est donc primordial d'étendre ce genre de protocoles contre HHV-6B responsable de pathologies lourdes et communes au HCMV lorsqu'il se réactive chez des patients immunodéprimés. Il serait intéressant d'évaluer l'impact de la réactivation d'HHV-6 sur celle du HCMV car il a été démontré que les réactivations d'HHV-6 précèdent toujours celles du HCMV. Ceci corrèle une étude qui avait démontré l'impact des protéines transactivatrices d'HHV-6 capable d'agir en activant les promoteurs du HCMV. La question qui peut alors se poser est de savoir quel serait l'impact d'une immunothérapie anti-HHV-6 sur d'éventuelles réactivations du HCMV ? Cette possibilité ne pourra voir le jour qu'à la suite de l'identification de cibles immunodominantes qui permettront aux CTL réinjectés de reconnaître les antigènes viraux et de lyser les cellules infectées par HHV-6. Basée sur des études antérieures effectuées sur la protéine IE1 du HCMV qui ont démontrées qu'elle est une bonne cible des cellules T, et du fait qu'IE1 d'HHV-6 est un homologue positionnel et a une expression cinétique similaire à celle du HCMV, nous avons assumé le fait que la protéine IE1 du HHV-6B devrait également en être une bonne. Malgré que ces deux protéines soient des homologues positionnels, elles ne partagent pas la même séquence et il ne peut y avoir d'immunité croisée entre les protéines IE1 de ces deux virus. Egalement, le choix de la protéine IE1 est légitimé par un travail réalisé sur des échantillons cliniques de patients infectés par HHV-6B. Il a été démontré qu'IE1 est une protéine très stable d'un point de vue évolutif avec 99.4% d'homologie dans les séquences nucléotidiques des différents isolats. Ainsi, nous pouvons supposer que suivant l'apprêtement antigénique, les mêmes peptides seront présentés à la surface des cellules chez les différents patients exprimant les mêmes allèles HLA. Enfin, le choix de la protéine IE1 a été basé sur le fait qu'elle est la première protéine synthétisée au cours du cycle viral, environ 2h après le début de l'infection, ce qui pourrait donner l'opportunité au CTL CD8+ d'agir plus rapidement contre le virus et peut-être de l'empêcher de s'assembler dans son intégralité et de composer un nouveau virion.

Dans un premier temps, nous avons évalué la réponse immunitaire spécifique à IE1 d'HHV-6B chez des donneurs de sang sains en créant un pool de peptides chevauchants recouvrant la protéine au complet d'une taille de 15 mer, taille intermédiaire permettant aux peptides de se fixer aux systèmes HLA de types I et II, et favorisant ainsi la reconnaissance par les cellules T CD4+ et T CD8+. Par une étude de cytométrie en flux, nous avons été capables de déterminer la fréquence de cette réponse CD8+ IFN- γ + spécifique à IE1 à partir de PBMC isolées et stimulées avec les

différents pools. Chez 20 donneurs sains, une moyenne d'environ 0.06% des cellules T CD8+ ont répondu spécifiquement aux pools, un chiffre relativement bas qui s'explique par le fait que le virus est dans un état latent chez ces donneurs et que la dernière réponse anti-HHV-6 peut dater. Cependant, de manière surprenante, nous n'avons pas été capables d'identifier de réponse T CD4+. Ceci pourrait être dû au fait que la stimulation de 16h que nous avons faite ne soit pas assez longue pour permettre l'activation de la réponse TCD4+. Egalement, la réponse mémoire TCD8+ peut-être plus forte du fait qu'un nombre plus important de cellules soient présentes dans la circulation sanguine et que la fréquence de TCD4+ IE1 spécifique soit inférieure à notre seuil de détection. Pour finir, les mécanismes impliqués pour l'apprêtement antigénique HLA-I et HLA-II sont différents, et du fait que la protéine IE1 est une protéine qui s'exprime au tout début du cycle viral, il se peut qu'elle soit lysée et subisse un apprêtement via un mécanisme HLA-I qui est strictement intracellulaire contrairement au HLA-II qui permet la présentation antigénique de cibles extracellulaires.

A la vue de ces premiers résultats, nous avons ensuite déterminé que la protéine IE1 était bel et bien clivée et présentée au système immunitaire pour s'assurer que la faible fréquence de T spécifiques n'est pas due à un déficit de présentation antigénique. Pour cela, nous avons créé une protéine hybride IE1 dans laquelle a été sous-clonée la séquence codante d'un peptide immunodominant de l'ovalbumine (OVA) SIINFEKL. Cet outil a permis de mettre en évidence le clivage et la présentation du peptide OVA à la surface cellulaire par un allèle HLA H₂K^b pouvant être reconnu par des splénocytes OT1 spécifiques du peptide. Ce protocole a permis de nous indiquer que la protéine IE1 du HHV-6B subissait bien un clivage et permettait la présentation antigénique faisant d'elle une cible de choix. Ces résultats ont été appuyés par une étude de Gerdemann et al qui ont démontré une dominance de la réponse des cellules T CD8+ contre IE1 parmi plusieurs protéines immunodominantes telles qu'U11, U54, U14 ou U71 du HHV-6B.

Nous avons donc ensuite tenté d'identifier des peptides immunodominants dont on pourrait se servir en vue d'une immunothérapie adoptive. Gerdemann et al ont réussi à identifier des épitopes d'IE1 restreints à l'allèle HLA de classe I B*40, cependant il est primordial de poursuivre cet effort en identifiant des épitopes restreints pour des allèles HLA communs dans la population. C'est pour cette raison que nous avons fait cette caractérisation à l'aide d'APC artificielles (AAPC) exprimant à leur surface des molécules HLA-A*02, HLA-A*03 et HLA-B*07 qui sont parmi les trois allèles les plus répandus au sein de la population caucasienne. Nous avons développé à partir de ces AAPC des lignées cellulaires stables exprimant la protéine IE1 et permettant un clivage, un apprêtement et une présentation antigénique physiologique. A partir des AAPC de chacune des

lignées HLA exprimant la protéine IE1, nous avons fait des cocultures avec des lymphocytes T de donneurs HLA-compatibles en présence du cocktail de cytokines IL-2/IL-7 afin d'expander les clones T ayant reconnus les épitopes présentés naturellement. Là, les cellules T ont été de nouveau mises en cocultures avec les AAPC HLA-compatibles mais qui présentaient des peptides synthétiques d'IE1 permettant une identification d'épitopes de plus en plus précise. C'est à dire que les cocultures ont été répétées en débutant par l'identification d'un pool de peptides complet, qui ont ensuite permis d'identifier un peptide unique 15 mer à l'intérieur du pool, et enfin permis de caractériser la séquence 9 mer immunogène à l'intérieur de la séquence du peptide 15 mer. Ces différentes étapes de cocultures ont permis l'identification de 6 peptides 9 mer, trois restreints pour le HLA-A*02, deux pour le HLA-A*03 et un pour le HLA-B*07.

Afin de confirmer que ces peptides peuvent servir de cibles pour l'établissement d'un protocole d'immunothérapie adoptive, nous avons confirmé que les CTL obtenus suite à l'expansion clonale possèdent un potentiel cytotoxique capable de lyser des PBMC primaires infectées par HHV-6B. De plus, nous avons confirmé les résultats d'une étude précédente effectuée par Nastke et al. qui ont démontré qu'il existe une réaction immunitaire croisée entre les espèces HHV-6A et HHV-6B. En effet, la très grande homologie de séquence entre les deux espèces virales le permet et le peptide HLA-A*02 aa109-117 CIQSIGASV est partagé par les protéines IE1 des deux espèces. Ainsi, nous avons pu, pour la première fois, identifier un peptide immunodominant qui peut servir de cible commune pour l'expansion clonale de CTL contre les deux virus HHV-6B et HHV-6A.

6.3 Perspectives

Ces différents travaux ont permis d'étendre les caractéristiques pro-virales et immunologiques du virus HHV-6B. Nous avons démontré comment le virus peut abroger la synthèse de l'IL-2, cytokine clé dans dans l'immunité cellulaire, en découvrant la protéine impliquée et le mécanisme cellulaire qu'elle dérègle. La caractérisation de la protéine du téguement U54 comme modulatrice du système immunitaire met en avant une nouvelle stratégie par laquelle le virus prend le dessus sur la réponse de l'hôte afin de pouvoir le coloniser le plus efficacement possible. Peu de choses ont à ce jour été décrites sur cette protéine U54, l'on sait que c'est une protéine structurale du téguement qui est synthétisée au cours de la phase tardive du cycle lytique, et elle est répertoriée comme un élément transactivateur pouvant exercer une activité transcriptionnelle en promouvant l'expression génique. Suite à nos travaux et la description du

mécanisme par lequel U54 agit sur la signalisation de la voie CaN/NFAT, il est difficile de penser que l'on pourrait utiliser ou synthétiser une drogue ou un élément agissant spécifiquement contre cette protéine. Il serait intéressant de confirmer l'impact d'U54 sur cette voie de signalisation en étudiant l'expression d'autres cytokines telle que l'IL-4, gènes ou encore en évaluant certains mécanismes physiologiques telle que la différenciation des lymphocytes T qui dépendent de l'activité de NFAT. Ce virus HHV-6B est relativement bénin chez les personnes immunocompétentes, le système immunitaire prend rapidement le dessus lors des épisodes de réactivation, ce qui n'empêche cependant pas le pathogène de persister et de se cacher dans l'hôte. C'est malheureusement grâce à cette faculté que le virus peut devenir très pathologique chez des patients dont le système immunitaire a été supprimé médicalement (radiothérapie, immunosuppresseurs) ou pathologiquement (VIH). Cependant, afin de contrôler les éventuelles réactivations virales, déployer une immunothérapie par transfert adoptif de CTL contre la protéine U54, en association avec d'autres protéines d'HHV-6 identifiées comme immunogéniques, permettrait d'empêcher le virus d'avoir le temps de coloniser et de développer ses effets délétères. Depuis quelques années, une réponse spécifique anti-U54 a été observée dans plusieurs travaux, impliquant ainsi la protéine comme possible cible de choix dans d'éventuelles thérapies anti HHV-6. En effet, la protéine U54 du HHV-6B est l'homologue de la protéine pp65 du HCMV qui est connue comme étant fortement immunogène, et déjà utilisée dans des protocoles d'immunothérapie adoptive anti-HCMV. Nous avons observé dans le laboratoire que cette protéine est ubiquitinée (résultat non publié) grâce à des études de co-IP, suggérant la possibilité que la protéine subit un clivage et l'apprêtement antigénique par la voie des HLA de classe I jusqu'à la présentation antigénique à la surface cellulaire. Il serait donc très intéressant d'identifier des épitopes immunodominants dirigés contre la protéine U54 par des études de screening comme celle effectuée pour la protéine IE1 décrites dans ce manuscrit.

L'avantage que procure la protéine U54 au virus lors d'une infection pourrait donner un avantage thérapeutique dans d'autres pathologies telles que les cancers dont beaucoup de mécanismes dépendent. En effet, la voie CaN/NFAT inhibée par la protéine virale dans les lymphocytes T CD4+ est impliquée dans la progression de différents cancers dont le cancer du sein. En effet, elle favorise la progression tumorale du cancer du sein, dont la prolifération cellulaire via PKM2, ou bien la migration et l'invasion cellulaire via la PGE2/COX-2. Il serait donc très pertinent d'évaluer l'impact d'U54 sur les différents mécanismes du cancer du sein dépendants de CaN/NFAT. Après des travaux primaires sur l'effet d'U54 sur l'activité des facteurs NFAT endogènes et la prolifération cellulaire de lignée de cancer du sein MCF-7, il est apparu que la

protéine virale abroge les facteurs favorisant l'avancement de la pathologie. Il serait important d'effectuer le même type d'études sur des lignées cellulaires de cancer de la prostate ou colorectaux dont on sait que la prolifération cellulaire dépend de l'activité des facteurs NFAT de la même manière que le cancer du sein. De plus, d'autres caractéristiques propres à la protéine U54 pourraient donner d'autres avantages contre les cancers. En effet, le fait de forcer des cellules de cancer du sein à exprimer la protéine U54 dont on connaît l'immunogénicité, pourrait permettre de marquer sélectivement les tumeurs grâce à la présentation antigénique à leur surface. Enfin, la présentation antigénique au système immunitaire pourrait aboutir à l'élimination spécifique des tumeurs suite à l'expansion clonale suivie de la réinjection de CTL capables de reconnaître l'épitope viral. Toute cette théorie pourrait être appliquée en combinant deux protocoles thérapeutiques utilisés dans les traitements anti-cancéreux: la virothérapie et l'immunothérapie adoptive.

La virothérapie est une forme expérimentale de traitement des cancers qui utilise la biotechnologie afin de reprogrammer des virus qui vont attaquer les cellules cancéreuses tout en grandant les tissus sains intacts. Comme il a déjà été démontré, les vecteurs viraux sont capables d'infecter les cellules tumorales tout comme les cellules saines. L'avantage provient du fait que seules les cellules cancéreuses en division vont permettre l'expression du gène oncolytique et ainsi favoriser la lyse des tumeurs. Habituellement, les virus utilisés sont l'herpès simplex et les adénovirus qui sont génétiquement modifiés afin de délivrer une protéine ou une particule oncolytique. L'utilisation d'un de ces virus modifiés infectant les cellules de cancer du sein et qui permettraient l'expression de la protéine U54 du HHV-6B pourrait être une issue très intéressante. Les conséquences d'un tel protocole seraient que, dans un premier temps, U54 ralentirait la progression tumorale en inhibant la prolifération. En parallèle, par un traitement d'immunothérapie adoptive, des lymphocytes T du patient pourraient être isolées et soumis à un protocole d'expansion clonale de CTL qui reconnaîtraient les antigènes spécifiques à U54 en combinaison avec un cocktail de cytokines IL-2/IL-7 favorisant l'expansion et la réponse pro-inflammatoire. Enfin, une réinjection par transfert adoptif autologue de ces lymphocytes T cytotoxiques en grande quantité pourrait permettre la lyse spécifique des tumeurs. Evidemment, afin de pouvoir subir un transfert autologue de CTL, le patient doit être traité pour un cancer qui ne soit pas une atteinte hématologique. Différents protocoles indépendants impliquant l'immunothérapie adoptive, la virothérapie ou encore l'angiothérapie comme traitements anti-cancéreux ont obtenu de très bons résultats en clinique, mais il est de plus en plus suggéré que l'association de ces différents traitements pourrait être une avenue thérapeutique encore plus fiable et plus efficace. Ceci pourrait

permettre de développer un éventail de thérapies pouvant être appliquées en fonction du cancer que l'on veut traiter, ou bien du mécanisme que l'on veut abroger. Pour finir, il serait donc d'intérêt de tester l'implication d'U54 dans différents types de cancers afin d'évaluer son impact sur les grands mécanismes pro-tumoraux : la transformation cellulaire, la prolifération cellulaire, la migration invasive, l'angiogénèse et le profil de chimiokines perpétré.

En ce qui concerne les patients immunodéprimés dont les HSCT, l'approche la plus efficace et la plus sûre pour combattre les réactivations virales est l'immunothérapie adoptive. Elle permet entre autre d'essayer de maintenir une immunité antivirale assez élevée afin de limiter l'utilisation de drogues antivirales qui ont des effets secondaires délétères lorsqu'utilisées à forte dose chez les patients. Depuis les récentes caractérisations de peptides immunodominants de protéines du HHV-6B, des études cliniques impliquant ces peptides pourraient être menées afin de vérifier la viabilité du protocole concernant ce virus. Cependant, malgré de bons résultats obtenus, à ce jour, les protocoles ne sont dirigés que contre un virus en particulier et en général ne sont accessibles qu'à des patients possédant le ou les bons allèles HLA. C'est en ce sens que les recherches dans ce domaine se tournent vers la mise au point de protocoles dont le but est de contrôler plusieurs virus résurgents d'un seul coup et sans distinction des HLA. La difficulté dans ce genre de procédures est de trouver une manière simple, rapide, efficace et si possible peu coûteuse d'expandre les cellules T. Gerdemann et al. ont récemment publié une procédure allant dans ce sens. Leur approche permet de générer des CTL dirigés contre plusieurs virus à partir d'une seule co-culture. Cela consiste à récupérer des cellules dendritiques (DC) chez un donneur et de les nucléofecter avec différentes constructions codants pour des protéines immunogènes de différents virus: IE1 et pp65 pour le HCMV, EBNA-1, LMP2 et BZLF1 pour l'EBV, Hexon et Penton pour l'Adénovirus. Ces DC vont être utilisées comme APC contre des PBMC récupérées à partir du même donneur et vont permettre l'expansion clonale sans distinction des systèmes HLA-I ou HLA-II, le tout stimulé par un cocktail de cytokines favorisant l'expansion et la différenciation cellulaire combinant l'IL-2, l'IL-4 et l'IL-7. Compte tenu des conséquences de ces réactivations et du fait que des antigènes et des peptides protecteurs ont été caractérisés ces dernières années, le virus HHV-6B devrait être considéré et tester dans des tests cliniques avec ce type de procédure afin de continuer à améliorer le recouvrement d'une immunité solide chez les HSCT post-greffe. A partir de nos travaux, il serait très intéressant d'assembler, un pool de peptides reconnus par les cellules T CD8+ et ce indépendamment des allèles qui les présentes. Ce pool permettrait d'évaluer la réponse immunitaire de donneurs de sang sains et évaluer la fréquence de donneurs répondants. Pour finir, le but ultime serait d'utiliser un pool de peptides multivirus (HHV-6, EBV, HCMV, HSV) qui

permettrait d'induire une réponse qui permettrait de combattre ou de contrôler les éventuelles réactivations virales impliquées dans les greffes ou les transplantations pour la plus grande tranche possible de la population.

6.4 Conclusion

Les résultats présentés dans ce document fournissent de nouvelles informations quant aux propriétés biologiques permettant à HHV-6 de détourner le système immunitaire de l'hôte à son avantage ainsi que les prémices d'un traitement immunothérapeutique anti-HHV-6. C'est un des virus les mieux adaptés aux conditions hostiles du système immunitaire de l'homme, cependant, peu de mécanismes ont été caractérisés à ce jour. Leur étude pourrait permettre de mettre en lumière de possibles stratégies thérapeutiques menant à son élimination de l'organisme. Nous avons cependant réussi à identifier une nouvelle stratégie par laquelle HHV-6 peut inhiber la réponse immunitaire adaptative dans les lymphocytes T CD4⁺ infectés via l'inhibition de la synthèse d'IL-2. Nous avons découvert que l'inhibition de la voie de signalisation CaN/NFAT est dérégulée par la liaison de la protéine U54 à la CaN aboutissant à la perte d'activation de NFAT. Cette voie a d'ailleurs été caractérisée comme promouvant différents cancers tels que le cancer coloréctal ou le cancer du sein dont nous avons pu démontrer un effet inhibiteur sur la prolifération cellulaire par U54. Un deuxième avantage a été suggéré quant à la transfection d'U54 dans des cellules tumorales de seins pouvant servir de cible préférentielle pour des CTL dirigés spécifiquement contre des épitopes de la protéine. Cette hypothèse permettrait l'élimination des tumeurs, de manière très spécifique. Enfin, nos travaux ont permis d'identifier des épitopes immunodominants de la protéine IE1 du HHV-6B qui pourront servir à stimuler l'expansion clonale de CTL en vue d'un traitement d'immunothérapie adoptive chez des patients immunodéprimés transplantés. Cette procédure permettrait de contenir une éventuelle réactivation virale du HHV-6B dont l'association à de graves pathologies post-greffes ne cesse de croître. De plus cette caractérisation a permis d'élargir la proportion de personnes susceptibles de pouvoir recevoir ce type de traitement en ciblant trois des molécules HLA les plus exprimées dans la population caucasienne HLA-A*02, HLA-A*03 et HLA-B*07. De nos jours, il est nécessaire de considérer HHV-6 comme une menace importante et de la traiter comme tel du fait de l'ubiquité de son infection dans l'organisme et que plus de 95% de la population mondiale est à risque. Malgré le grand nombre de découvertes faites sur HHV-6 depuis plus de 25 ans, il ne fait aucun doute que beaucoup de mécanismes développés par le virus nous sont encore inconnus et qu'il est primordial d'en découvrir le plus possible afin d'augmenter le nombre de

cibles potentielles permettant de le combattre ou éventuellement de se servir de possibles composés viraux à des fins thérapeutiques.

7. Bibliographie

1. Salahuddin SZ, Ablashi DV, Markham PD, Josephs SF, Sturzenegger S, et al. (1986) Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science* 234: 596-601.
2. Josephs SF, Salahuddin SZ, Ablashi DV, Schachter F, Wong-Staal F, et al. (1986) Genomic analysis of the human B-lymphotropic virus (HBLV). *Science* 234: 601-603.
3. Lusso P, Markham PD, Tschachler E, di Marzo Veronese F, Salahuddin SZ, et al. (1988) In vitro cellular tropism of human B-lymphotropic virus (human herpesvirus-6). *J Exp Med* 167: 1659-1670.
4. Takahashi K, Sonoda S, Higashi K, Kondo T, Takahashi H, et al. (1989) Predominant CD4 T-lymphocyte tropism of human herpesvirus 6-related virus. *J Virol* 63: 3161-3163.
5. Ablashi DV, Balachandran N, Josephs SF, Hung CL, Krueger GR, et al. (1991) Genomic polymorphism, growth properties, and immunologic variations in human herpesvirus-6 isolates. *Virology* 184: 545-552.
6. Isegawa Y, Mukai T, Nakano K, Kagawa M, Chen J, et al. (1999) Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B. *J Virol* 73: 8053-8063.
7. Wyatt LS, Balachandran N, Frenkel N (1990) Variations in the replication and antigenic properties of human herpesvirus 6 strains. *J Infect Dis* 162: 852-857.
8. Braun DK, Dominguez G, Pellett PE (1997) Human herpesvirus 6. *Clin Microbiol Rev* 10: 521-567.
9. Ablashi D, Agut H, Alvarez-Lafuente R, Clark DA, Dewhurst S, et al. Classification of HHV-6A and HHV-6B as distinct viruses. *Arch Virol*.
10. Johnson JE, Chiu W (2000) Structures of virus and virus-like particles. *Curr Opin Struct Biol* 10: 229-235.
11. Gompels UA, Macaulay HA (1995) Characterization of human telomeric repeat sequences from human herpesvirus 6 and relationship to replication. *J Gen Virol* 76 (Pt 2): 451-458.
12. Gompels UA, Nicholas J, Lawrence G, Jones M, Thomson BJ, et al. (1995) The DNA sequence of human herpesvirus-6: structure, coding content, and genome evolution. *Virology* 209: 29-51.
13. Thomson BJ, Weindler FW, Gray D, Schwaab V, Heilbronn R (1994) Human herpesvirus 6 (HHV-6) is a helper virus for adeno-associated virus type 2 (AAV-2) and the AAV-2 rep gene homologue in HHV-6 can mediate AAV-2 DNA replication and regulate gene expression. *Virology* 204: 304-311.
14. Lindquister GJ, Pellett PE (1991) Properties of the human herpesvirus 6 strain Z29 genome: G + C content, length, and presence of variable-length directly repeated terminal sequence elements. *Virology* 182: 102-110.
15. Dominguez G, Dambaugh TR, Stamey FR, Dewhurst S, Inoue N, et al. (1999) Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A. *J Virol* 73: 8040-8052.
16. Dewin DR, Catusse J, Gompels UA (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.
17. 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.
18. Kondo K, Shimada K, Sashihara J, Tanaka-Taya K, Yamanishi K (2002) Identification of human herpesvirus 6 latency-associated transcripts. *J Virol* 76: 4145-4151.
19. Dhepakson P, Mori Y, Jiang YB, Huang HL, Akkapaiboon P, et al. (2002) Human herpesvirus-6 rep/U94 gene product has single-stranded DNA-binding activity. *J Gen Virol* 83: 847-854.

20. De Bolle L, Van Loon J, De Clercq E, Naesens L (2005) Quantitative analysis of human herpesvirus 6 cell tropism. *J Med Virol* 75: 76-85.
21. De Bolle L, Naesens L, De Clercq E (2005) Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clin Microbiol Rev* 18: 217-245.
22. Fox JD, Briggs M, Ward PA, Tedder RS (1990) Human herpesvirus 6 in salivary glands. *Lancet* 336: 590-593.
23. Di Luca D, Mirandola P, Ravaioli T, Dolcetti R, Frigatti A, et al. (1995) Human herpesviruses 6 and 7 in salivary glands and shedding in saliva of healthy and human immunodeficiency virus positive individuals. *J Med Virol* 45: 462-468.
24. Mori Y (2009) Recent topics related to human herpesvirus 6 cell tropism. *Cell Microbiol* 11: 1001-1006.
25. 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.
26. Dewhurst S (2004) Human herpesvirus type 6 and human herpesvirus type 7 infections of the central nervous system. *Herpes* 11 Suppl 2: 105A-111A.
27. Buchbinder S, Elmaagacli AH, Schaefer UW, Roggendorf M (2000) Human herpesvirus 6 is an important pathogen in infectious lung disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 26: 639-644.
28. Hammerling JA, Lambrecht RS, Kehl KS, Carrigan DR (1996) Prevalence of human herpesvirus 6 in lung tissue from children with pneumonitis. *J Clin Pathol* 49: 802-804.
29. Bossolasco S, Marenzi R, Dahl H, Vago L, Terreni MR, et al. (1999) Human herpesvirus 6 in cerebrospinal fluid of patients infected with HIV: frequency and clinical significance. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 67: 789-792.
30. Hall CB, Caserta MT, Schnabel KC, Long C, Epstein LG, et al. (1998) Persistence of human herpesvirus 6 according to site and variant: possible greater neurotropism of variant A. *Clin Infect Dis* 26: 132-137.
31. 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.
32. Tang H, Serada S, Kawabata A, Ota M, Hayashi E, et al. CD134 is a cellular receptor specific for human herpesvirus-6B entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 9096-9099.
33. Seya T, Hara T, Matsumoto M, Sugita Y, Akedo H (1990) Complement-mediated tumor cell damage induced by antibodies against membrane cofactor protein (MCP, CD46). *J Exp Med* 172: 1673-1680.
34. Seya T, Nagasawa S, Atkinson JP (1990) C4b-binding protein and a 60,000-Dalton plasma protein share antigenic determinants with membrane cofactor protein of complement. *J Immunol* 144: 2312-2320.
35. 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.
36. Mori Y, Akkapaiboon P, Yang X, Yamanishi K (2003) 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.
37. Mori Y, Yang X, Akkapaiboon P, Okuno T, Yamanishi K (2003) Human herpesvirus 6 variant A glycoprotein H-glycoprotein L-glycoprotein Q complex associates with human CD46. *J Virol* 77: 4992-4999.
38. Akkapaiboon P, Mori Y, Sadaoka T, Yonemoto S, Yamanishi K (2004) Intracellular processing of human herpesvirus 6 glycoproteins Q1 and Q2 into tetrameric complexes expressed on the viral envelope. *J Virol* 78: 7969-7983.
39. Isegawa Y, Miyamoto Y, Yasuda Y, Semi K, Tsujimura K, et al. (2008) Characterization of the human herpesvirus 6 U69 gene product and identification of its nuclear localization signal. *J Virol* 82: 710-718.

40. Mettenleiter TC (2006) Intriguing interplay between viral proteins during herpesvirus assembly or: the herpesvirus assembly puzzle. *Vet Microbiol* 113: 163-169.
41. Janelle ME, Gravel A, Gosselin J, Tremblay MJ, Flamand L (2002) Activation of monocyte cyclooxygenase-2 gene expression by human herpesvirus 6. Role for cyclic AMP-responsive element-binding protein and activator protein-1. *J Biol Chem* 277: 30665-30674.
42. Tomoiu A, Gravel A, Flamand L (2006) Mapping of human herpesvirus 6 immediate-early 2 protein transactivation domains. *Virology* 354: 91-102.
43. Flamand L, Romero F, Reitz MS, Gallo RC (1998) CD4 promoter transactivation by human herpesvirus 6. *J Virol* 72: 8797-8805.
44. Gravel A, Gosselin J, Flamand L (2002) Human Herpesvirus 6 immediate-early 1 protein is a sumoylated nuclear phosphoprotein colocalizing with promyelocytic leukemia protein-associated nuclear bodies. *J Biol Chem* 277: 19679-19687.
45. 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.
46. Jaworska J, Gravel A, Flamand L Divergent susceptibilities of human herpesvirus 6 variants to type I interferons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 8369-8374.
47. Nicholas J (1994) Nucleotide sequence analysis of a 21-kbp region of the genome of human herpesvirus-6 containing homologues of human cytomegalovirus major immediate-early and replication genes. *Virology* 204: 738-750.
48. Martin ME, Thomson BJ, Honess RW, Craxton MA, Gompels UA, et al. (1991) The genome of human herpesvirus 6: maps of unit-length and concatemeric genomes for nine restriction endonucleases. *J Gen Virol* 72 (Pt 1): 157-168.
49. Teo IA, Griffin BE, Jones MD (1991) Characterization of the DNA polymerase gene of human herpesvirus 6. *J Virol* 65: 4670-4680.
50. Dewhurst S, Dollard SC, Pellett PE, Dambaugh TR (1993) Identification of a lytic-phase origin of DNA replication in human herpesvirus 6B strain Z29. *J Virol* 67: 7680-7683.
51. Inoue N, Pellett PE (1995) Human herpesvirus 6B origin-binding protein: DNA-binding domain and consensus binding sequence. *J Virol* 69: 4619-4627.
52. Oster B, Hollenberg P (2002) Viral gene expression patterns in human herpesvirus 6B-infected T cells. *J Virol* 76: 7578-7586.
53. Mori Y, Koike M, Moriishi E, Kawabata A, Tang H, et al. (2008) Human herpesvirus-6 induces MVB formation, and virus egress occurs by an exosomal release pathway. *Traffic* 9: 1728-1742.
54. Croen KD (1991) Latency of the human herpesviruses. *Annu Rev Med* 42: 61-67.
55. Kondo K, Kondo T, Okuno T, Takahashi M, Yamanishi K (1991) Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. *J Gen Virol* 72 (Pt 6): 1401-1408.
56. Yasukawa M, Ohminami H, Sada E, Yakushijin Y, Kaneko M, et al. (1999) Latent infection and reactivation of human herpesvirus 6 in two novel myeloid cell lines. *Blood* 93: 991-999.
57. 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 U S A* 95: 13911-13916.
58. Delecluse HJ, Hammerschmidt W (1993) Status of Marek's disease virus in established lymphoma cell lines: herpesvirus integration is common. *J Virol* 67: 82-92.
59. Luppi M, Marasca R, Barozzi P, Ferrari S, Ceccherini-Nelli L, et al. (1993) Three cases of human herpesvirus-6 latent infection: integration of viral genome in peripheral blood mononuclear cell DNA. *J Med Virol* 40: 44-52.
60. Hall CB, Caserta MT, Schnabel KC, Shelley LM, Carnahan JA, et al. Transplacental congenital human herpesvirus 6 infection caused by maternal chromosomally integrated virus. *J Infect Dis* 201: 505-507.

61. Ward KN, Leong HN, Nacheva EP, Howard J, Atkinson CE, et al. (2006) Human herpesvirus 6 chromosomal integration in immunocompetent patients results in high levels of viral DNA in blood, sera, and hair follicles. *J Clin Microbiol* 44: 1571-1574.
62. Morissette G, Flamand L Herpesviruses and chromosomal integration. *J Virol* 84: 12100-12109.
63. Thomson BJ, Efstathiou S, Honess RW (1991) Acquisition of the human adeno-associated virus type-2 rep gene by human herpesvirus type-6. *Nature* 351: 78-80.
64. 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.
65. Caserta MT, Mock DJ, Dewhurst S (2001) Human herpesvirus 6. *Clin Infect Dis* 33: 829-833.
66. Levy JA, Ferro F, Greenspan D, Lennette ET (1990) Frequent isolation of HHV-6 from saliva and high seroprevalence of the virus in the population. *Lancet* 335: 1047-1050.
67. Caserta MT, Hall CB, Schnabel K, Long CE, D'Heron N (1998) Primary human herpesvirus 7 infection: a comparison of human herpesvirus 7 and human herpesvirus 6 infections in children. *J Pediatr* 133: 386-389.
68. Hall CB, Caserta MT, Schnabel KC, Boettrich C, McDermott MP, et al. (2004) Congenital infections with human herpesvirus 6 (HHV6) and human herpesvirus 7 (HHV7). *J Pediatr* 145: 472-477.
69. Kondo K, Nagafuji H, Hata A, Tomomori C, Yamanishi K (1993) Association of human herpesvirus 6 infection of the central nervous system with recurrence of febrile convulsions. *J Infect Dis* 167: 1197-1200.
70. Huang LM, Lee CY, Lee PI, Chen JM, Wang PJ (1991) Meningitis caused by human herpesvirus-6. *Arch Dis Child* 66: 1443-1444.
71. Bates M, Monze M, Bima H, Kapambwe M, Clark D, et al. (2009) Predominant human herpesvirus 6 variant A infant infections in an HIV-1 endemic region of Sub-Saharan Africa. *J Med Virol* 81: 779-789.
72. Razonable RR, Fanning C, Brown RA, Espy MJ, Rivero A, et al. (2002) Selective reactivation of human herpesvirus 6 variant a occurs in critically ill immunocompetent hosts. *J Infect Dis* 185: 110-113.
73. Soldan SS, Leist TP, Juhng KN, McFarland HF, Jacobson S (2000) Increased lymphoproliferative response to human herpesvirus type 6A variant in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 47: 306-313.
74. Garcia-Montojo M, Martinez A, De Las Heras V, Dominguez-Mozo MI, Cenit Mdel C, et al. Herpesvirus active replication in multiple sclerosis: a genetic control? *J Neurol Sci* 311: 98-102.
75. Dominguez-Mozo MI, Garcia-Montojo M, De Las Heras V, Garcia-Martinez A, Arias-Leal AM, et al. MHC2TA mRNA levels and human herpesvirus 6 in multiple sclerosis patients treated with interferon beta along two-year follow-up. *BMC Neurol* 12: 107.
76. Leibovitch E, Wohler JE, Cummings Macri SM, Motanic K, Harberts E, et al. Novel marmoset (*Callithrix jacchus*) model of human Herpesvirus 6A and 6B infections: immunologic, virologic and radiologic characterization. *PLoS Pathog* 9: e1003138.
77. Potenza L, Luppi M, Barozzi P, Rossi G, Cocchi S, et al. (2008) HHV-6A in syncytial giant-cell hepatitis. *N Engl J Med* 359: 593-602.
78. Ongradi J, Rajda C, Marodi CL, Csiszar A, Vecsei L (1999) A pilot study on the antibodies to HHV-6 variants and HHV-7 in CSF of MS patients. *J Neurovirol* 5: 529-532.
79. Fotheringham J, Donati D, Akhyani N, Fogdell-Hahn A, Vortmeyer A, et al. (2007) Association of human herpesvirus-6B with mesial temporal lobe epilepsy. *PLoS Med* 4: e180.
80. Maric I, Bryant R, Abu-Asab M, Cohen JI, Vivero A, et al. (2004) Human herpesvirus-6-associated acute lymphadenitis in immunocompetent adults. *Mod Pathol* 17: 1427-1433.
81. Torelli G, Marasca R, Luppi M, Selleri L, Ferrari S, et al. (1991) Human herpesvirus-6 in human lymphomas: identification of specific sequences in Hodgkin's lymphomas by polymerase chain reaction. *Blood* 77: 2251-2258.

82. Luppi M, Marasca R, Barozzi P, Artusi T, Torelli G (1993) Frequent detection of human herpesvirus-6 sequences by polymerase chain reaction in paraffin-embedded lymph nodes from patients with angioimmunoblastic lymphadenopathy and angioimmunoblastic lymphadenopathy-like lymphoma. *Leuk Res* 17: 1003-1011.
83. Lecoite D, Fabre M, Habes D, Mielot F, Bernard O, et al. (2000) [Macrophage activation syndrome in primary human herpes virus-6 infection: a rare condition after liver transplantation in infants]. *Gastroenterol Clin Biol* 24: 1227-1228.
84. Fillet AM, Raguin G, Agut H, Boisnic S, Agbo-Godeau S, et al. (1992) Evidence of human herpesvirus 6 in Sjogren syndrome and sarcoidosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 11: 564-566.
85. Flamand L, Stefanescu I, Ablashi DV, Menezes J (1993) Activation of the Epstein-Barr virus replicative cycle by human herpesvirus 6. *J Virol* 67: 6768-6777.
86. Lusso P, De Maria A, Malnati M, Lori F, DeRocco SE, et al. (1991) Induction of CD4 and susceptibility to HIV-1 infection in human CD8+ T lymphocytes by human herpesvirus 6. *Nature* 349: 533-535.
87. Lautenschlager I, Linnavuori K, Lappalainen M, Suni J, Hockerstedt K (2000) HHV-6 reactivation is often associated with CMV infection in liver transplant patients. *Transpl Int* 13 Suppl 1: S351-353.
88. Potenza L, Barozzi P, Masetti M, Pecorari M, Bresciani P, et al. (2009) Prevalence of human herpesvirus-6 chromosomal integration (CIHHV-6) in Italian solid organ and allogeneic stem cell transplant patients. *Am J Transplant* 9: 1690-1697.
89. Zerr DM, Corey L, Kim HW, Huang ML, Nguy L, et al. (2005) Clinical outcomes of human herpesvirus 6 reactivation after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 40: 932-940.
90. de Pagter PJ, Schuurman R, Meijer E, van Baarle D, Sanders EA, et al. (2008) Human herpesvirus type 6 reactivation after haematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Virol* 43: 361-366.
91. Ogata M, Satou T, Kadota J, Saito N, Yoshida T, et al. Human herpesvirus 6 (HHV-6) reactivation and HHV-6 encephalitis after allogeneic hematopoietic cell transplantation: a multicenter, prospective study. *Clin Infect Dis* 57: 671-681.
92. Caserta MT, Dewhurst S Dazed and confused by HHV-6. *Blood* 117: 5016-5018.
93. Scheurer ME, Pritchett JC, Amirian ES, Zemke NR, Lusso P, et al. HHV-6 encephalitis in umbilical cord blood transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Bone Marrow Transplant* 48: 574-580.
94. Drobyski WR, Dunne WM, Burd EM, Knox KK, Ash RC, et al. (1993) Human herpesvirus-6 (HHV-6) infection in allogeneic bone marrow transplant recipients: evidence of a marrow-suppressive role for HHV-6 in vivo. *J Infect Dis* 167: 735-739.
95. Carrigan DR, Knox KK (1994) Human herpesvirus 6 (HHV-6) isolation from bone marrow: HHV-6-associated bone marrow suppression in bone marrow transplant patients. *Blood* 84: 3307-3310.
96. Luppi M, Barozzi P, Morris C, Maiorana A, Garber R, et al. (1999) Human herpesvirus 6 latently infects early bone marrow progenitors in vivo. *J Virol* 73: 754-759.
97. Pichereau C, Desseaux K, Janin A, Scieux C, Peffault de Latour R, et al. The complex relationship between human herpesvirus 6 and acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 18: 141-144.
98. de Pagter PJ, Schuurman R, Visscher H, de Vos M, Bierings M, et al. (2008) Human herpes virus 6 plasma DNA positivity after hematopoietic stem cell transplantation in children: an important risk factor for clinical outcome. *Biol Blood Marrow Transplant* 14: 831-839.
99. DesJardin JA, Gibbons L, Cho E, Supran SE, Falagas ME, et al. (1998) Human herpesvirus 6 reactivation is associated with cytomegalovirus infection and syndromes in kidney

- transplant recipients at risk for primary cytomegalovirus infection. *J Infect Dis* 178: 1783-1786.
100. Carrigan DR, Drobyski WR, Russler SK, Tapper MA, Knox KK, et al. (1991) Interstitial pneumonitis associated with human herpesvirus-6 infection after marrow transplantation. *Lancet* 338: 147-149.
 101. Mousset S, Martin H, Berger A, Hess S, Bug G, et al. Human herpesvirus 6 in biopsies from patients with gastrointestinal symptoms after allogeneic stem cell transplantation. *Ann Hematol* 91: 737-742.
 102. Lempinen M, Halme L, Arola J, Honkanen E, Salmela K, et al. HHV-6B is frequently found in the gastrointestinal tract in kidney transplantation patients. *Transpl Int* 25: 776-782.
 103. De Clercq E, Naesens L, De Bolle L, Schols D, Zhang Y, et al. (2001) Antiviral agents active against human herpesviruses HHV-6, HHV-7 and HHV-8. *Rev Med Virol* 11: 381-395.
 104. Hirabayashi K, Nakazawa Y, Katsuyama Y, Yanagisawa T, Saito S, et al. Successful ganciclovir therapy in a patient with human herpesvirus-6 encephalitis after unrelated cord blood transplantation: usefulness of longitudinal measurements of viral load in cerebrospinal fluid. *Infection* 41: 219-223.
 105. Pohlmann C, Schetelig J, Reuner U, Bornhauser M, Illmer T, et al. (2007) Cidofovir and foscarnet for treatment of human herpesvirus 6 encephalitis in a neutropenic stem cell transplant recipient. *Clin Infect Dis* 44: e118-120.
 106. Milbradt J, Auerochs S, Korn K, Marschall M (2009) Sensitivity of human herpesvirus 6 and other human herpesviruses to the broad-spectrum anti-infective drug artesunate. *J Clin Virol* 46: 24-28.
 107. Hakacova N, Klingel K, Kandolf R, Engdahl E, Fogdell-Hahn A, et al. First therapeutic use of Artesunate in treatment of human herpesvirus 6B myocarditis in a child. *J Clin Virol* 57: 157-160.
 108. Mossman KL, Ashkar AA (2005) Herpesviruses and the innate immune response. *Viral Immunol* 18: 267-281.
 109. 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.
 110. Murakami Y, Tanimoto K, Fujiwara H, An J, Suemori K, et al. Human herpesvirus 6 infection impairs Toll-like receptor signaling. *Virol J* 7: 91.
 111. Orange JS Unraveling human natural killer cell deficiency. *J Clin Invest* 122: 798-801.
 112. Takahashi K, Segal E, Kondo T, Mukai T, Moriyama M, et al. (1992) Interferon and natural killer cell activity in patients with exanthem subitum. *Pediatr Infect Dis J* 11: 369-373.
 113. Kumagai T, Yoshikawa T, Yoshida M, Okui T, Ihira M, 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.
 114. Flamand L, Stefanescu I, Menezes J (1996) Human herpesvirus-6 enhances natural killer cell cytotoxicity via IL-15. *J Clin Invest* 97: 1373-1381.
 115. Gosselin J, Tomoiu A, Gallo RC, Flamand L (1999) Interleukin-15 as an activator of natural killer cell-mediated antiviral response. *Blood* 94: 4210-4219.
 116. Malnati MS, Lusso P, Ciccone E, Moretta A, Moretta L, et al. (1993) Recognition of virus-infected cells by natural killer cell clones is controlled by polymorphic target cell elements. *J Exp Med* 178: 961-969.
 117. Leen AM, Sili U, Bollard CM, Rooney CM (2007) Adoptive immunotherapy for herpesviruses.
 118. Leen AM, Christin A, Myers GD, Liu H, Cruz CR, et al. (2009) Cytotoxic T lymphocyte therapy with donor T cells prevents and treats adenovirus and Epstein-Barr virus infections after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood* 114: 4283-4292.

119. 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.
120. Gupta S, Agrawal S, Gollapudi S (2009) Differential effect of human herpesvirus 6A on cell division and apoptosis among naive and central and effector memory CD4+ and CD8+ T-cell subsets. *J Virol* 83: 5442-5450.
121. Li L, Gu B, Zhou F, Chi J, Wang F, et al. 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.
122. Balachandran N, Amelse RE, Zhou WW, Chang CK (1989) Identification of proteins specific for human herpesvirus 6-infected human T cells. *J Virol* 63: 2835-2840.
123. Black JB, Schwarz TF, Patton JL, Kite-Powell K, Pellett PE, et al. (1996) Evaluation of immunoassays for detection of antibodies to human herpesvirus 7. *Clin Diagn Lab Immunol* 3: 79-83.
124. Thader-Voigt A, Jacobs E, Lehmann W, Bandt D 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.
125. Higashimoto Y, Ohta A, Nishiyama Y, Ihira M, Sugata K, et al. Development of a human herpesvirus 6 species-specific immunoblotting assay. *J Clin Microbiol* 50: 1245-1251.
126. Lusso P, Markham PD, DeRocco SE, Gallo RC (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.
127. Mock DJ, Strathmann F, Blumberg BM, 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.
128. Koide W, Ito M, Torigoe S, Ihara T, Kamiya H, et al. (1998) Activation of lymphocytes by HHV-6 antigen in normal children and adults. *Viral Immunol* 11: 19-25.
129. Haveman LM, Scherrenburg J, Maarschalk-Ellebroek LJ, Hoek PD, Schuurman R, et al. T-cell response to viral antigens in adults and children with common variable immunodeficiency and specific antibody deficiency. *Clin Exp Immunol* 161: 108-117.
130. Wang F, Yao K, Yin QZ, Zhou F, Ding CL, 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.
131. Tejada-Simon MV, Zang YC, Hong J, Rivera VM, Killian JM, et al. (2002) Detection of viral DNA and immune responses to the human herpesvirus 6 101-kilodalton virion protein in patients with multiple sclerosis and in controls. *Journal of virology* 76: 6147-6154.
132. Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, Taormina C, Pelte C, et al. (2005) Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med* 202: 673-685.
133. Nastke MD, Becerra A, Yin L, Dominguez-Amorocho O, Gibson L, et al. Human CD4+ T cell response to human herpesvirus 6. *J Virol* 86: 4776-4792.
134. Gerdemann U, Keukens L, Keirnan JM, Katari UL, Nguyen CT, et al. Immunotherapeutic strategies to prevent and treat human herpesvirus 6 reactivation after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 121: 207-218.
135. Fotheringham J, Jacobson S (2005) Human herpesvirus 6 and multiple sclerosis: potential mechanisms for virus-induced disease. *Herpes* 12: 4-9.
136. Wang FZ, Dahl H, Ljungman P, Linde A (1999) Lymphoproliferative responses to human herpesvirus-6 variant A and variant B in healthy adults. *J Med Virol* 57: 134-139.

137. Navikas V, Link H (1996) Review: cytokines and the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 45: 322-333.
138. Ozenci V, Kouwenhoven M, Huang YM, Xiao B, Kivisakk P, et al. (1999) Multiple sclerosis: levels of interleukin-10-secreting blood mononuclear cells are low in untreated patients but augmented during interferon-beta-1b treatment. *Scand J Immunol* 49: 554-561.
139. Tejada-Simon MV, Zang YC, Hong J, Rivera VM, Zhang JZ (2003) Cross-reactivity with myelin basic protein and human herpesvirus-6 in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 53: 189-197.
140. de Pagter AP, Boelens JJ, Scherrenburg J, Vroom-de Blank T, Tesselaar K, et al. (2012) First analysis of human herpesvirus 6T-cell responses: specific boosting after HHV6 reactivation in stem cell transplantation recipients. *Clinical immunology* 144: 179-189.
141. de Pagter AP, Boelens JJ, Scherrenburg J, Vroom-de Blank T, Tesselaar K, et al. First analysis of human herpesvirus 6T-cell responses: specific boosting after HHV6 reactivation in stem cell transplantation recipients. *Clin Immunol* 144: 179-189.
142. Singh N, Carrigan DR (1996) Human herpesvirus-6 in transplantation: an emerging pathogen. *Ann Intern Med* 124: 1065-1071.
143. Singh N, Husain S, Carrigan DR, Knox KK, Weck KE, et al. (2002) Impact of human herpesvirus-6 on the frequency and severity of recurrent hepatitis C virus hepatitis in liver transplant recipients. *Clin Transplant* 16: 92-96.
144. Martin LK, Schub A, Dillinger S, Moosmann A Specific CD8(+) T cells recognize human herpesvirus 6B. *Eur J Immunol* 42: 2901-2912.
145. Tejada-Simon MV, Zang YC, Hong J, Rivera VM, Killian JM, et al. (2002) Detection of viral DNA and immune responses to the human herpesvirus 6 101-kilodalton virion protein in patients with multiple sclerosis and in controls. *J Virol* 76: 6147-6154.
146. Yasukawa M, Yakushijin Y, Furukawa M, Fujita S (1993) Specificity analysis of human CD4+ T-cell clones directed against human herpesvirus 6 (HHV-6), HHV-7, and human cytomegalovirus. *J Virol* 67: 6259-6264.
147. Vollers SS, Stern LJ (2008) Class II major histocompatibility complex tetramer staining: progress, problems, and prospects. *Immunology* 123: 305-313.
148. Lusso P, Malnati M, De Maria A, Balotta C, DeRocco SE, et al. (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.
149. Lusso P, Garzino-Demo A, Crowley RW, Malnati MS (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.
150. Burd EM, Carrigan DR (1993) Human herpesvirus 6 (HHV-6)-associated dysfunction of blood monocytes. *Virus Res* 29: 79-90.
151. Burd EM, Knox KK, Carrigan DR (1993) Human herpesvirus-6-associated suppression of growth factor-induced macrophage maturation in human bone marrow cultures. *Blood* 81: 1645-1650.
152. Smith A, Santoro F, Di Lullo G, Dagna L, Verani A, et al. (2003) Selective suppression of IL-12 production by human herpesvirus 6. *Blood* 102: 2877-2884.
153. Kakimoto M, Hasegawa A, Fujita S, Yasukawa M (2002) Phenotypic and functional alterations of dendritic cells induced by human herpesvirus 6 infection. *J Virol* 76: 10338-10345.
154. Smith AP, Paolucci C, Di Lullo G, Burastero SE, Santoro F, et al. (2005) Viral replication-independent blockade of dendritic cell maturation and interleukin-12 production by human herpesvirus 6. *J Virol* 79: 2807-2813.
155. Ablashi DV, Josephs SF, Buchbinder A, Hellman K, Nakamura S, et al. (1988) Human B-lymphotropic virus (human herpesvirus-6). *J Virol Methods* 21: 29-48.

156. Bandobashi K, Daibata M, Kamioka M, Tanaka Y, Kubonishi I, et al. (1997) Human herpesvirus 6 (HHV-6)-positive Burkitt's lymphoma: establishment of a novel cell line infected with HHV-6. *Blood* 90: 1200-1207.
157. Andre-Garnier E, Milpied N, Boutolleau D, Saiagh S, Billaudel S, et al. (2004) Reactivation of human herpesvirus 6 during ex vivo expansion of circulating CD34+ haematopoietic stem cells. *J Gen Virol* 85: 3333-3336.
158. Knox KK, Carrigan DR (1992) In vitro suppression of bone marrow progenitor cell differentiation by human herpesvirus 6 infection. *J Infect Dis* 165: 925-929.
159. 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.
160. Santoro F, Greenstone HL, Insinga A, Liszewski MK, Atkinson JP, et al. (2003) Interaction of glycoprotein H of human herpesvirus 6 with the cellular receptor CD46. *J Biol Chem* 278: 25964-25969.
161. 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.
162. Liszewski MK, Post TW, Atkinson JP (1991) Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu Rev Immunol* 9: 431-455.
163. Nanche 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.
164. Kemper C, Chan AC, Green JM, Brett KA, Murphy KM, et al. (2003) Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature* 421: 388-392.
165. Lusso P, Malnati MS, Garzino-Demo A, Crowley RW, Long EO, et al. (1993) Infection of natural killer cells by human herpesvirus 6. *Nature* 362: 458-462.
166. Niiya H, Azuma T, Jin L, Uchida N, Inoue A, et al. (2004) Transcriptional downregulation of DC-SIGN in human herpesvirus 6-infected dendritic cells. *J Gen Virol* 85: 2639-2642.
167. Janelle ME, Flamand L (2006) Phenotypic alterations and survival of monocytes following infection by human herpesvirus-6. *Arch Virol* 151: 1603-1614.
168. French C, Menegazzi P, Nicholson L, Macaulay H, DiLuca D, et al. (1999) Novel, nonconsensus cellular splicing regulates expression of a gene encoding a chemokine-like protein that shows high variation and is specific for human herpesvirus 6. *Virology* 262: 139-151.
169. Zou P, Isegawa Y, Nakano K, Haque M, Horiguchi Y, et al. (1999) Human herpesvirus 6 open reading frame U83 encodes a functional chemokine. *J Virol* 73: 5926-5933.
170. Isegawa Y, Ping Z, Nakano K, Sugimoto N, Yamanishi K (1998) Human herpesvirus 6 open reading frame U12 encodes a functional beta-chemokine receptor. *J Virol* 72: 6104-6112.
171. 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.
172. Luttichau HR, Clark-Lewis I, Jensen PO, Moser C, Gerstoft J, et al. (2003) A highly selective CCR2 chemokine agonist encoded by human herpesvirus 6. *J Biol Chem* 278: 10928-10933.
173. Zhen Z, Bradel-Tretheway B, Sumagin S, Bidlack JM, Dewhurst S (2005) The human herpesvirus 6 G protein-coupled receptor homolog U51 positively regulates virus replication and enhances cell-cell fusion in vitro. *J Virol* 79: 11914-11924.
174. Caruso A, Favilli F, Rotola A, Comar M, Horejsh D, et al. (2003) Human herpesvirus-6 modulates RANTES production in primary human endothelial cell cultures. *J Med Virol* 70: 451-458.

175. Grivel JC, Santoro F, Chen S, Faga G, Malnati MS, et al. (2003) Pathogenic effects of human herpesvirus 6 in human lymphoid tissue ex vivo. *J Virol* 77: 8280-8289.
176. Arena A, Liberto MC, Iannello D, Capozza AB, Foca A (1999) Altered cytokine production after human herpes virus type 6 infection. *New Microbiol* 22: 293-300.
177. 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.
178. Flamand L, Gosselin J, D'Addario M, Hiscott J, Ablashi DV, et al. (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.
179. 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.
180. 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.
181. Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo R (1976) Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 193: 1007-1008.
182. Devos R, Plaetinck G, Cheroutre H, Simons G, Degraeve W, et al. (1983) Molecular cloning of human interleukin 2 cDNA and its expression in *E. coli*. *Nucleic Acids Res* 11: 4307-4323.
183. Fujita T, Takaoka C, Matsui H, Taniguchi T (1983) Structure of the human interleukin 2 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 7437-7441.
184. Taniguchi T, Matsui H, Fujita T, Takaoka C, Kashima N, et al. (1983) Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature* 302: 305-310.
185. Mott HR, Driscoll PC, Boyd J, Cooke RM, Weir MP, et al. (1992) Secondary structure of human interleukin 2 from 3D heteronuclear NMR experiments. *Biochemistry* 31: 7741-7744.
186. Lenardo M, Chan KM, Hornung F, McFarland H, Siegel R, et al. (1999) Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu Rev Immunol* 17: 221-253.
187. Ruscetti FW, Morgan DA, Gallo RC (1977) Functional and morphologic characterization of human T cells continuously grown in vitro. *J Immunol* 119: 131-138.
188. Miyazaki T, Liu ZJ, Kawahara A, Minami Y, Yamada K, et al. (1995) Three distinct IL-2 signaling pathways mediated by bcl-2, c-myc, and lck cooperate in hematopoietic cell proliferation. *Cell* 81: 223-231.
189. Rathmell JC, Vander Heiden MG, Harris MH, Frauwirth KA, Thompson CB (2000) In the absence of extrinsic signals, nutrient utilization by lymphocytes is insufficient to maintain either cell size or viability. *Mol Cell* 6: 683-692.
190. Frauwirth KA, Thompson CB (2004) Regulation of T lymphocyte metabolism. *J Immunol* 172: 4661-4665.
191. Cote-Sierra J, Foucras G, Guo L, Chiodetti L, Young HA, et al. (2004) Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 3880-3885.
192. McGhee JR (2005) The world of TH1/TH2 subsets: first proof. *J Immunol* 175: 3-4.
193. Schorle H, Holschke T, Hunig T, Schimpl A, Horak I (1991) Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature* 352: 621-624.
194. Suzuki H, Kundig TM, Furlonger C, Wakeham A, Timms E, et al. (1995) Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science* 268: 1472-1476.
195. DiSanto JP, Muller W, Guy-Grand D, Fischer A, Rajewsky K (1995) Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 377-381.
196. Kundig TM, Schorle H, Bachmann MF, Hengartner H, Zinkernagel RM, et al. (1993) Immune responses in interleukin-2-deficient mice. *Science* 262: 1059-1061.

197. Refaeli Y, Van Parijs L, London CA, Tschopp J, Abbas AK (1998) Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity* 8: 615-623.
198. Van Parijs L, Abbas AK (1998) Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* 280: 243-248.
199. Hsu HC, Matsuki Y, Zhang HG, Zhou T, Mountz JD (2001) The Fas signaling connection between autoimmunity and embryonic lethality. *J Clin Immunol* 21: 1-14.
200. Malek TR, Porter BO, Codias EK, Scibelli P, Yu A (2000) Normal lymphoid homeostasis and lack of lethal autoimmunity in mice containing mature T cells with severely impaired IL-2 receptors. *J Immunol* 164: 2905-2914.
201. Malek TR (2003) The main function of IL-2 is to promote the development of T regulatory cells. *J Leukoc Biol* 74: 961-965.
202. Malek TR, Yu A, Vincek V, Scibelli P, Kong L (2002) CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity* 17: 167-178.
203. Carson WE, Fehniger TA, Haldar S, Eckhert K, Lindemann MJ, et al. (1997) A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival. *J Clin Invest* 99: 937-943.
204. Giri JG, Kumaki S, Ahdieh M, Friend DJ, Loomis A, et al. (1995) Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor. *EMBO J* 14: 3654-3663.
205. Khatri VP, Fehniger TA, Baiocchi RA, Yu F, Shah MH, et al. (1998) Ultra low dose interleukin-2 therapy promotes a type 1 cytokine profile in vivo in patients with AIDS and AIDS-associated malignancies. *J Clin Invest* 101: 1373-1378.
206. Blackman MA, Tigges MA, Minie ME, Koshland ME (1986) A model system for peptide hormone action in differentiation: interleukin 2 induces a B lymphoma to transcribe the J chain gene. *Cell* 47: 609-617.
207. Koshland ME (1985) The coming of age of the immunoglobulin J chain. *Annu Rev Immunol* 3: 425-453.
208. Gaffen SL, Wang S, Koshland ME (1996) Expression of the immunoglobulin J chain in a murine B lymphoma is driven by autocrine production of interleukin 2. *Cytokine* 8: 513-524.
209. O'Shea JJ, Ma A, Lipsky P (2002) Cytokines and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2: 37-45.
210. Voss SD, Sondel PM, Robb RJ (1992) Characterization of the interleukin 2 receptors (IL-2R) expressed on human natural killer cells activated in vivo by IL-2: association of the p64 IL-2R gamma chain with the IL-2R beta chain in functional intermediate-affinity IL-2R. *J Exp Med* 176: 531-541.
211. Nelson BH, Willerford DM (1998) Biology of the interleukin-2 receptor. *Adv Immunol* 70: 1-81.
212. Nakamura Y, Russell SM, Mess SA, Friedmann M, Erdos M, et al. (1994) Heterodimerization of the IL-2 receptor beta- and gamma-chain cytoplasmic domains is required for signalling. *Nature* 369: 330-333.
213. Gaffen SL (2001) Signaling domains of the interleukin 2 receptor. *Cytokine* 14: 63-77.
214. Buckley RH (2000) Primary immunodeficiency diseases due to defects in lymphocytes. *N Engl J Med* 343: 1313-1324.
215. Candotti F, Notarangelo L, Visconti R, O'Shea J (2002) Molecular aspects of primary immunodeficiencies: lessons from cytokine and other signaling pathways. *J Clin Invest* 109: 1261-1269.
216. Ma A, Boone DL, Lodolce JP (2000) The pleiotropic functions of interleukin 15: not so interleukin 2-like after all. *J Exp Med* 191: 753-756.

217. Carson WE, Giri JG, Lindemann MJ, Linett ML, Ahdieh M, et al. (1994) Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J Exp Med* 180: 1395-1403.
218. Santana MA, Rosenstein Y (2003) What it takes to become an effector T cell: the process, the cells involved, and the mechanisms. *J Cell Physiol* 195: 392-401.
219. Powell JD, Ragheb JA, Kitagawa-Sakakida S, Schwartz RH (1998) Molecular regulation of interleukin-2 expression by CD28 co-stimulation and anergy. *Immunol Rev* 165: 287-300.
220. Murtaza A, Kuchroo VK, Freeman GJ (1999) Changes in the strength of co-stimulation through the B7/CD28 pathway alter functional T cell responses to altered peptide ligands. *Int Immunol* 11: 407-416.
221. Isakov N, Fox RI, Dixon FJ, Theofilopoulos AN, Altman A (1985) Staining and fluorescence-activated cell sorter analysis of human lymphocytes using antibodies to a short, chemically synthesized human IL-2 peptide. *Cell Immunol* 94: 491-499.
222. Lugo JP, Krishnan SN, Sailor RD, Rothenberg EV (1986) Early precursor thymocytes can produce interleukin 2 upon stimulation with calcium ionophore and phorbol ester. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 1862-1866.
223. Bjorndahl JM, Sung SS, Hansen JA, Fu SM (1989) Human T cell activation: differential response to anti-CD28 as compared to anti-CD3 monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* 19: 881-887.
224. Verweij CL, Geerts M, Aarden LA (1991) Activation of interleukin-2 gene transcription via the T-cell surface molecule CD28 is mediated through an NF-kB-like response element. *J Biol Chem* 266: 14179-14182.
225. Diehn M, Alizadeh AA, Rando OJ, Liu CL, Stankunas K, et al. (2002) Genomic expression programs and the integration of the CD28 costimulatory signal in T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 11796-11801.
226. Fraser JD, Newton ME, Weiss A (1992) CD28 and T cell antigen receptor signal transduction coordinately regulate interleukin 2 gene expression in response to superantigen stimulation. *J Exp Med* 175: 1131-1134.
227. Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC (2001) The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat Immunol* 2: 203-209.
228. Marinari B, Costanzo A, Marzano V, Piccolella E, Tuosto L (2004) CD28 delivers a unique signal leading to the selective recruitment of RelA and p52 NF-kappaB subunits on IL-8 and Bcl-xL gene promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6098-6103.
229. D'Ambrosio D, Trotta R, Vacca A, Frati L, Santoni A, et al. (1993) Transcriptional regulation of interleukin-2 gene expression by CD69-generated signals. *Eur J Immunol* 23: 2993-2997.
230. Dubey C, Croft M, Swain SL (1995) Costimulatory requirements of naive CD4+ T cells. ICAM-1 or B7-1 can costimulate naive CD4 T cell activation but both are required for optimum response. *J Immunol* 155: 45-57.
231. Costello R, Lipcey C, Algarte M, Cerdan C, Baeuerle PA, et al. (1993) Activation of primary human T-lymphocytes through CD2 plus CD28 adhesion molecules induces long-term nuclear expression of NF-kappa B. *Cell Growth Differ* 4: 329-339.
232. Iwashima M (2003) Kinetic perspectives of T cell antigen receptor signaling. A two-tier model for T cell full activation. *Immunol Rev* 191: 196-210.
233. Koretzky GA, Myung PS (2001) Positive and negative regulation of T-cell activation by adaptor proteins. *Nat Rev Immunol* 1: 95-107.
234. Sedwick CE, Altman A (2004) Perspectives on PKCtheta in T cell activation. *Mol Immunol* 41: 675-686.
235. Gaffen SL, Liu KD (2004) Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine* 28: 109-123.

236. Garrity PA, Chen D, Rothenberg EV, Wold BJ (1994) Interleukin-2 transcription is regulated in vivo at the level of coordinated binding of both constitutive and regulated factors. *Mol Cell Biol* 14: 2159-2169.
237. Bodor J, Bodorova J, Gress RE (2000) Suppression of T cell function: a potential role for transcriptional repressor ICER. *J Leukoc Biol* 67: 774-779.
238. Yasui DH, Genetta T, Kadesch T, Williams TM, Swain SL, et al. (1998) Transcriptional repression of the IL-2 gene in Th cells by ZEB. *J Immunol* 160: 4433-4440.
239. Barton K, Muthusamy N, Chanyangam M, Fischer C, Clendenin C, et al. (1996) Defective thymocyte proliferation and IL-2 production in transgenic mice expressing a dominant-negative form of CREB. *Nature* 379: 81-85.
240. Juang YT, Wang Y, Solomou EE, Li Y, Mawrin C, et al. (2005) Systemic lupus erythematosus serum IgG increases CREM binding to the IL-2 promoter and suppresses IL-2 production through CaMKIV. *J Clin Invest* 115: 996-1005.
241. Hwang ES, Hong JH, Glimcher LH (2005) IL-2 production in developing Th1 cells is regulated by heterodimerization of RelA and T-bet and requires T-bet serine residue 508. *J Exp Med* 202: 1289-1300.
242. Martins GA, Cimmino L, Shapiro-Shelef M, Szabolcs M, Herron A, et al. (2006) Transcriptional repressor Blimp-1 regulates T cell homeostasis and function. *Nat Immunol* 7: 457-465.
243. Kallies A, Hawkins ED, Belz GT, Metcalf D, Hommel M, et al. (2006) Transcriptional repressor Blimp-1 is essential for T cell homeostasis and self-tolerance. *Nat Immunol* 7: 466-474.
244. Sieber M, Baumgrass R (2009) Novel inhibitors of the calcineurin/NFATc hub - alternatives to CsA and FK506? *Cell Commun Signal* 7: 25.
245. Feske S, Draeger R, Peter HH, Rao A (2000) Impaired NFAT regulation and its role in a severe combined immunodeficiency. *Immunobiology* 202: 134-150.
246. Feske S, Draeger R, Peter HH, Eichmann K, Rao A (2000) The duration of nuclear residence of NFAT determines the pattern of cytokine expression in human SCID T cells. *J Immunol* 165: 297-305.
247. Feske S, Giltneane J, Dolmetsch R, Staudt LM, Rao A (2001) Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nat Immunol* 2: 316-324.
248. Graef IA, Chen F, Crabtree GR (2001) NFAT signaling in vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev* 11: 505-512.
249. Okamura H, Aramburu J, Garcia-Rodriguez C, Viola JP, Raghavan A, et al. (2000) Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol Cell* 6: 539-550.
250. Beals CR, Clipstone NA, Ho SN, Crabtree GR (1997) Nuclear localization of NF-ATc by a calcineurin-dependent, cyclosporin-sensitive intramolecular interaction. *Genes Dev* 11: 824-834.
251. Shaw KT, Ho AM, Raghavan A, Kim J, Jain J, et al. (1995) Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 11205-11209.
252. Zhu J, Shibasaki F, Price R, Guillemot JC, Yano T, et al. (1998) Intramolecular masking of nuclear import signal on NF-AT4 by casein kinase I and MEKK1. *Cell* 93: 851-861.
253. Aramburu J, Yaffe MB, Lopez-Rodriguez C, Cantley LC, Hogan PG, et al. (1999) Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A. *Science* 285: 2129-2133.
254. Aramburu J, Garcia-Cozar F, Raghavan A, Okamura H, Rao A, et al. (1998) Selective inhibition of NFAT activation by a peptide spanning the calcineurin targeting site of NFAT. *Mol Cell* 1: 627-637.

255. Chow CW, Rincon M, Davis RJ (1999) Requirement for transcription factor NFAT in interleukin-2 expression. *Mol Cell Biol* 19: 2300-2307.
256. Martinez-Martinez S, Rodriguez A, Lopez-Maderuelo MD, Ortega-Perez I, Vazquez J, et al. (2006) Blockade of NFAT activation by the second calcineurin binding site. *J Biol Chem* 281: 6227-6235.
257. Konig A, Fernandez-Zapico ME, Ellenrieder V Primers on molecular pathways--the NFAT transcription pathway in pancreatic cancer. *Pancreatol* 10: 416-422.
258. Shibasaki F, Price ER, Milan D, McKeon F (1996) Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4. *Nature* 382: 370-373.
259. Loh C, Shaw KT, Carew J, Viola JP, Luo C, et al. (1996) Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. *J Biol Chem* 271: 10884-10891.
260. Chen CH, Seguin-Devaux C, Burke NA, Oriss TB, Watkins SC, et al. (2003) Transforming growth factor beta blocks Tec kinase phosphorylation, Ca²⁺ influx, and NFATc translocation causing inhibition of T cell differentiation. *J Exp Med* 197: 1689-1699.
261. Yang J, Rothermel B, Vega RB, Frey N, McKinsey TA, et al. (2000) Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles. *Circ Res* 87: E61-68.
262. Mancini M, Toker A (2009) NFAT proteins: emerging roles in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 9: 810-820.
263. Imamura R, Masuda ES, Naito Y, Imai S, Fujino T, et al. (1998) Carboxyl-terminal 15-amino acid sequence of NFATx1 is possibly created by tissue-specific splicing and is essential for transactivation activity in T cells. *J Immunol* 161: 3455-3463.
264. Chuvpilo S, Avots A, Berberich-Siebelt F, Glockner J, Fischer C, et al. (1999) Multiple NF-ATc isoforms with individual transcriptional properties are synthesized in T lymphocytes. *J Immunol* 162: 7294-7301.
265. Chuvpilo S, Zimmer M, Kerstan A, Glockner J, Avots A, et al. (1999) Alternative polyadenylation events contribute to the induction of NF-ATc in effector T cells. *Immunity* 10: 261-269.
266. Chen L, Glover JN, Hogan PG, Rao A, Harrison SC (1998) Structure of the DNA-binding domains from NFAT, Fos and Jun bound specifically to DNA. *Nature* 392: 42-48.
267. Lopez-Rodriguez C, Aramburu J, Rakeman AS, Rao A (1999) NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7214-7219.
268. Giffin MJ, Stroud JC, Bates DL, von Koenig KD, Hardin J, et al. (2003) Structure of NFAT1 bound as a dimer to the HIV-1 LTR kappa B element. *Nat Struct Biol* 10: 800-806.
269. Jain J, McCaffrey PG, Valge-Archer VE, Rao A (1992) Nuclear factor of activated T cells contains Fos and Jun. *Nature* 356: 801-804.
270. Penna A, Demuro A, Yeromin AV, Zhang SL, Safrina O, et al. (2008) The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers. *Nature* 456: 116-120.
271. Oh-Hora M, Yamashita M, Hogan PG, Sharma S, Lamperti E, et al. (2008) Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance. *Nat Immunol* 9: 432-443.
272. Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH, et al. (2006) A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 441: 179-185.
273. Yeromin AV, Zhang SL, Jiang W, Yu Y, Safrina O, et al. (2006) Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature* 443: 226-229.
274. Gwack Y, Feske S, Srikanth S, Hogan PG, Rao A (2007) Signalling to transcription: store-operated Ca²⁺ entry and NFAT activation in lymphocytes. *Cell Calcium* 42: 145-156.
275. Zhu J, McKeon F (1999) NF-AT activation requires suppression of Crm1-dependent export by calcineurin. *Nature* 398: 256-260.

276. Beals CR, Sheridan CM, Turck CW, Gardner P, Crabtree GR (1997) Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science* 275: 1930-1934.
277. Neal JW, Clipstone NA (2001) Glycogen synthase kinase-3 inhibits the DNA binding activity of NFATc. *J Biol Chem* 276: 3666-3673.
278. Engelman JA (2009) Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* 9: 550-562.
279. Okamura H, Garcia-Rodriguez C, Martinson H, Qin J, Virshup DM, et al. (2004) A conserved docking motif for CK1 binding controls the nuclear localization of NFAT1. *Mol Cell Biol* 24: 4184-4195.
280. Chow CW, Dong C, Flavell RA, Davis RJ (2000) c-Jun NH(2)-terminal kinase inhibits targeting of the protein phosphatase calcineurin to NFATc1. *Mol Cell Biol* 20: 5227-5234.
281. Yang TT, Xiong Q, Enslin H, Davis RJ, Chow CW (2002) Phosphorylation of NFATc4 by p38 mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol* 22: 3892-3904.
282. Gwack Y, Sharma S, Nardone J, Tanasa B, Iuga A, et al. (2006) A genome-wide *Drosophila* RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature* 441: 646-650.
283. Arron JR, Winslow MM, Polleri A, Chang CP, Wu H, et al. (2006) NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. *Nature* 441: 595-600.
284. Nayak A, Glockner-Pagel J, Vaeth M, Schumann JE, Buttman M, et al. (2009) Sumoylation of the transcription factor NFATc1 leads to its subnuclear relocalization and interleukin-2 repression by histone deacetylase. *J Biol Chem* 284: 10935-10946.
285. Terui Y, Saad N, Jia S, McKeon F, Yuan J (2004) Dual role of sumoylation in the nuclear localization and transcriptional activation of NFAT1. *J Biol Chem* 279: 28257-28265.
286. Rao A, Luo C, Hogan PG (1997) Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 15: 707-747.
287. Serfling E, Berberich-Siebelt F, Chuvpilo S, Jankevics E, Klein-Hessling S, et al. (2000) The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1498: 1-18.
288. Peng SL, Gerth AJ, Ranger AM, Glimcher LH (2001) NFATc1 and NFATc2 together control both T and B cell activation and differentiation. *Immunity* 14: 13-20.
289. Baksh S, Widlund HR, Frazer-Abel AA, Du J, Fosmire S, et al. (2002) NFATc2-mediated repression of cyclin-dependent kinase 4 expression. *Mol Cell* 10: 1071-1081.
290. Macian F, Garcia-Cozar F, Im SH, Horton HF, Byrne MC, et al. (2002) Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. *Cell* 109: 719-731.
291. Macian F (2005) NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* 5: 472-484.
292. Brundage RA, Fogarty KE, Tuft RA, Fay FS (1991) Calcium gradients underlying polarization and chemotaxis of eosinophils. *Science* 254: 703-706.
293. Yang S, Zhang JJ, Huang XY (2009) Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis. *Cancer Cell* 15: 124-134.
294. Szado T, Vanderheyden V, Parys JB, De Smedt H, Rietdorf K, et al. (2008) Phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by protein kinase B/Akt inhibits Ca²⁺ release and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 2427-2432.
295. Neal JW, Clipstone NA (2003) A constitutively active NFATc1 mutant induces a transformed phenotype in 3T3-L1 fibroblasts. *J Biol Chem* 278: 17246-17254.
296. Buchholz M, Schatz A, Wagner M, Michl P, Linhart T, et al. (2006) Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca²⁺/calcineurin signaling pathway. *EMBO J* 25: 3714-3724.
297. Robbs BK, Cruz AL, Werneck MB, Mognol GP, Viola JP (2008) Dual roles for NFAT transcription factor genes as oncogenes and tumor suppressors. *Mol Cell Biol* 28: 7168-7181.

298. Pham LV, Tamayo AT, Yoshimura LC, Lin-Lee YC, Ford RJ (2005) Constitutive NF-kappaB and NFAT activation in aggressive B-cell lymphomas synergistically activates the CD154 gene and maintains lymphoma cell survival. *Blood* 106: 3940-3947.
299. Marafioti T, Pozzobon M, Hansmann ML, Ventura R, Pileri SA, et al. (2005) The NFATc1 transcription factor is widely expressed in white cells and translocates from the cytoplasm to the nucleus in a subset of human lymphomas. *Br J Haematol* 128: 333-342.
300. Medyouf H, Alcalde H, Berthier C, Guillemin MC, dos Santos NR, et al. (2007) Targeting calcineurin activation as a therapeutic strategy for T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* 13: 736-741.
301. Jauliac S, Lopez-Rodriguez C, Shaw LM, Brown LF, Rao A, et al. (2002) The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion. *Nat Cell Biol* 4: 540-544.
302. Yoeli-Lerner M, Yiu GK, Rabinovitz I, Erhardt P, Jauliac S, et al. (2005) Akt blocks breast cancer cell motility and invasion through the transcription factor NFAT. *Mol Cell* 20: 539-550.
303. Yiu GK, Toker A (2006) NFAT induces breast cancer cell invasion by promoting the induction of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 281: 12210-12217.
304. Stracke ML, Krutzsch HC, Unsworth EJ, Arestad A, Cioce V, et al. (1992) Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *J Biol Chem* 267: 2524-2529.
305. Chen M, O'Connor KL (2005) Integrin alpha6beta4 promotes expression of autotaxin/ENPP2 autocrine motility factor in breast carcinoma cells. *Oncogene* 24: 5125-5130.
306. Graef IA, Chen F, Chen L, Kuo A, Crabtree GR (2001) Signals transduced by Ca(2+)/calcineurin and NFATc3/c4 pattern the developing vasculature. *Cell* 105: 863-875.
307. Dvorak HF (2006) Discovery of vascular permeability factor (VPF). *Exp Cell Res* 312: 522-526.
308. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9: 669-676.
309. Hernandez GL, Volpert OV, Iniguez MA, Lorenzo E, Martinez-Martinez S, et al. (2001) Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin A: roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2. *J Exp Med* 193: 607-620.
310. Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K (2002) Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer* 2: 573-583.
311. Norrmen C, Ivanov KI, Cheng J, Zangger N, Delorenzi M, et al. (2009) FOXC2 controls formation and maturation of lymphatic collecting vessels through cooperation with NFATc1. *J Cell Biol* 185: 439-457.
312. Kulkarni RM, Greenberg JM, Akeson AL (2009) NFATc1 regulates lymphatic endothelial development. *Mech Dev* 126: 350-365.
313. Butcher EC, Williams M, Youngman K, Rott L, Briskin M (1999) Lymphocyte trafficking and regional immunity. *Adv Immunol* 72: 209-253.
314. Campbell JJ, Butcher EC (2000) Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol* 12: 336-341.
315. Karnoub AE, Weinberg RA (2006) Chemokine networks and breast cancer metastasis. *Breast Dis* 26: 75-85.
316. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, et al. (2001) Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410: 50-56.
317. Wyckoff J, Wang W, Lin EY, Wang Y, Pixley F, et al. (2004) A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res* 64: 7022-7029.

318. Taylor AL, Watson CJ, Bradley JA (2005) Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Crit Rev Oncol Hematol* 56: 23-46.
319. El-Batawy MM, Bosseila MA, Mashaly HM, Hafez VS (2009) Topical calcineurin inhibitors in atopic dermatitis: a systematic review and meta-analysis. *J Dermatol Sci* 54: 76-87.
320. Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stahelin H (1976) Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* 6: 468-475.
321. Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, et al. (1987) FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *J Antibiot (Tokyo)* 40: 1256-1265.
322. Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, et al. (1991) Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66: 807-815.
323. Kang CB, Hong Y, Dhe-Paganon S, Yoon HS (2008) FKBP family proteins: immunophilins with versatile biological functions. *Neurosignals* 16: 318-325.
324. Barik S (2006) Immunophilins: for the love of proteins. *Cell Mol Life Sci* 63: 2889-2900.
325. Rodriguez A, Roy J, Martinez-Martinez S, Lopez-Maderuelo MD, Nino-Moreno P, et al. (2009) A conserved docking surface on calcineurin mediates interaction with substrates and immunosuppressants. *Mol Cell* 33: 616-626.
326. Kissinger CR, Parge HE, Knighton DR, Lewis CT, Pelletier LA, et al. (1995) Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex. *Nature* 378: 641-644.
327. Griffith JP, Kim JL, Kim EE, Sintchak MD, Thomson JA, et al. (1995) X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex. *Cell* 82: 507-522.
328. Jin L, Harrison SC (2002) Crystal structure of human calcineurin complexed with cyclosporin A and human cyclophilin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 13522-13526.
329. Handschumacher RE, Harding MW, Rice J, Drugge RJ, Speicher DW (1984) Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 226: 544-547.
330. Siekierka JJ, Hung SH, Poe M, Lin CS, Sigal NH (1989) A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature* 341: 755-757.
331. Harding MW, Galat A, Uehling DE, Schreiber SL (1989) A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. *Nature* 341: 758-760.
332. Kalli K, Huntoon C, Bell M, McKean DJ (1998) Mechanism responsible for T-cell antigen receptor- and CD28- or interleukin 1 (IL-1) receptor-initiated regulation of IL-2 gene expression by NF-kappaB. *Mol Cell Biol* 18: 3140-3148.
333. Aoki Y, Kao PN (1999) Erythromycin inhibits transcriptional activation of NF-kappaB, but not NFAT, through calcineurin-independent signaling in T cells. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 2678-2684.
334. Steffan NM, Bren GD, Frantz B, Tocci MJ, O'Neill EA, et al. (1995) Regulation of I κ B alpha phosphorylation by PKC- and Ca(2+)-dependent signal transduction pathways. *J Immunol* 155: 4685-4691.
335. Oetjen E, Thoms KM, Laufer Y, Pape D, Blume R, et al. (2005) The immunosuppressive drugs cyclosporin A and tacrolimus inhibit membrane depolarization-induced CREB transcriptional activity at the coactivator level. *Br J Pharmacol* 144: 982-993.
336. Marienfeld R, Neumann M, Chuvpilo S, Escher C, Kneitz B, et al. (1997) Cyclosporin A interferes with the inducible degradation of NF-kappa B inhibitors, but not with the processing of p105/NF-kappa B1 in T cells. *Eur J Immunol* 27: 1601-1609.
337. Meyer S, Kohler NG, Joly A (1997) Cyclosporine A is an uncompetitive inhibitor of proteasome activity and prevents NF-kappaB activation. *FEBS Lett* 413: 354-358.

338. Pearl JP, Parris J, Hale DA, Hoffmann SC, Bernstein WB, et al. (2005) Immunocompetent T-cells with a memory-like phenotype are the dominant cell type following antibody-mediated T-cell depletion. *Am J Transplant* 5: 465-474.
339. Nickel P, Presber F, Bold G, Biti D, Schonemann C, et al. (2004) Enzyme-linked immunosorbent spot assay for donor-reactive interferon-gamma-producing cells identifies T-cell presensitization and correlates with graft function at 6 and 12 months in renal-transplant recipients. *Transplantation* 78: 1640-1646.
340. Naesens M, Kuypers DR, Sarwal M (2009) Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol* 4: 481-508.
341. Ho S, Clipstone N, Timmermann L, Northrop J, Graef I, et al. (1996) The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clin Immunol Immunopathol* 80: S40-45.
342. Zhang Y, Baumgrass R, Schutkowski M, Fischer G (2004) Branches on the alpha-C atom of cyclosporin A residue 3 result in direct calcineurin inhibition and rapid cyclophilin 18 binding. *Chembiochem* 5: 1006-1009.
343. Durette PL, Boger J, Dumont F, Firestone R, Frankshun RA, et al. (1988) A study of the correlation between cyclophilin binding and in vitro immunosuppressive activity of cyclosporine A and analogues. *Transplant Proc* 20: 51-57.
344. Nelson PA, Kawamura A, Akselband Y, Peattie DA, Aldape RA, et al. (1991) Effect of immunosuppressive drugs on cytokine gene transcription studied by message amplification phenotyping (MAPPING) polymerase chain reaction. *Transplant Proc* 23: 2867-2869.
345. Baumgrass R, Zhang Y, Erdmann F, Thiel A, Weiwad M, et al. (2004) Substitution in position 3 of cyclosporin A abolishes the cyclophilin-mediated gain-of-function mechanism but not immunosuppression. *J Biol Chem* 279: 2470-2479.
346. Aspeslet L, Freitag D, Trepanier D, Abel M, Naicker S, et al. (2001) ISA(TX)247: a novel calcineurin inhibitor. *Transplant Proc* 33: 1048-1051.
347. Birsan T, Dambrin C, Freitag DG, Yatscoff RW, Morris RE (2005) The novel calcineurin inhibitor ISA247: a more potent immunosuppressant than cyclosporine in vitro. *Transpl Int* 17: 767-771.
348. Grassberger M, Baumruker T, Enz A, Hiestand P, Hultsch T, et al. (1999) A novel anti-inflammatory drug, SDZ ASM 981, for the treatment of skin diseases: in vitro pharmacology. *Br J Dermatol* 141: 264-273.
349. Fruman DA, Klee CB, Bierer BE, Burakoff SJ (1992) Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 3686-3690.
350. Schreiber SL (1991) Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* 251: 283-287.
351. Campistol JM (2009) Minimizing the risk of posttransplant malignancy. *Transplantation* 87: S19-22.
352. Mulero MC, Aubareda A, Orzaez M, Messeguer J, Serrano-Candelas E, et al. (2009) Inhibiting the calcineurin-NFAT (nuclear factor of activated T cells) signaling pathway with a regulator of calcineurin-derived peptide without affecting general calcineurin phosphatase activity. *J Biol Chem* 284: 9394-9401.
353. Brill GM, Premachandran U, Karwowski JP, Henry R, Cwik DK, et al. (1996) Dibefurin, a novel fungal metabolite inhibiting calcineurin phosphatase activity. *J Antibiot (Tokyo)* 49: 124-128.
354. Humar M, Pischke SE, Loop T, Hoetzel A, Schmidt R, et al. (2004) Barbiturates directly inhibit the calmodulin/calcineurin complex: a novel mechanism of inhibition of nuclear factor of activated T cells. *Mol Pharmacol* 65: 350-361.
355. Sagoo JK, Fruman DA, Wesselborg S, Walsh CT, Bierer BE (1996) Competitive inhibition of calcineurin phosphatase activity by its autoinhibitory domain. *Biochem J* 320 (Pt 3): 879-884.

356. Hashimoto Y, Perrino BA, Soderling TR (1990) Identification of an autoinhibitory domain in calcineurin. *J Biol Chem* 265: 1924-1927.
357. Perrino BA (1999) Regulation of calcineurin phosphatase activity by its autoinhibitory domain. *Arch Biochem Biophys* 372: 159-165.
358. Terada H, Matsushita M, Lu YF, Shirai T, Li ST, et al. (2003) Inhibition of excitatory neuronal cell death by cell-permeable calcineurin autoinhibitory peptide. *J Neurochem* 87: 1145-1151.
359. Husain SZ, Grant WM, Gorelick FS, Nathanson MH, Shah AU (2007) Caerulein-induced intracellular pancreatic zymogen activation is dependent on calcineurin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292: G1594-1599.
360. Feske S, Okamura H, Hogan PG, Rao A (2003) Ca²⁺/calcineurin signalling in cells of the immune system. *Biochem Biophys Res Commun* 311: 1117-1132.
361. Noguchi H, Matsushita M, Okitsu T, Moriwaki A, Tomizawa K, et al. (2004) A new cell-permeable peptide allows successful allogeneic islet transplantation in mice. *Nat Med* 10: 305-309.
362. Dell'Acqua ML, Dodge KL, Tavalin SJ, Scott JD (2002) Mapping the protein phosphatase-2B anchoring site on AKAP79. Binding and inhibition of phosphatase activity are mediated by residues 315-360. *J Biol Chem* 277: 48796-48802.
363. Lai MM, Burnett PE, Wolosker H, Blackshaw S, Snyder SH (1998) Cain, a novel physiologic protein inhibitor of calcineurin. *J Biol Chem* 273: 18325-18331.
364. Chan B, Greenan G, McKeon F, Ellenberger T (2005) Identification of a peptide fragment of DSCR1 that competitively inhibits calcineurin activity in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 13075-13080.
365. Aubareda A, Mulero MC, Perez-Riba M (2006) Functional characterization of the calcipressin 1 motif that suppresses calcineurin-mediated NFAT-dependent cytokine gene expression in human T cells. *Cell Signal* 18: 1430-1438.
366. Martinez-Martinez S, Genesca L, Rodriguez A, Raya A, Salichs E, et al. (2009) The RCAN carboxyl end mediates calcineurin docking-dependent inhibition via a site that dictates binding to substrates and regulators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 6117-6122.
367. Park S, Uesugi M, Verdine GL (2000) A second calcineurin binding site on the NFAT regulatory domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 7130-7135.
368. Boncristiano M, Paccani SR, Barone S, Ulivieri C, Patrussi L, et al. (2003) The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. *J Exp Med* 198: 1887-1897.
369. Sundrud MS, Torres VJ, Unutmaz D, Cover TL (2004) Inhibition of primary human T cell proliferation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) is independent of VacA effects on IL-2 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 7727-7732.
370. Gebert B, Fischer W, Weiss E, Hoffmann R, Haas R (2003) *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science* 301: 1099-1102.
371. Sewald X, Gebert-Vogl B, Prassl S, Barwig I, Weiss E, et al. (2008) Integrin subunit CD18 Is the T-lymphocyte receptor for the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cell Host Microbe* 3: 20-29.
372. Miskin JE, Abrams CC, Goatley LC, Dixon LK (1998) A viral mechanism for inhibition of the cellular phosphatase calcineurin. *Science* 281: 562-565.
373. Granja AG, Perkins ND, Revilla Y (2008) A238L inhibits NF-ATc2, NF-kappa B, and c-Jun activation through a novel mechanism involving protein kinase C-theta-mediated up-regulation of the amino-terminal transactivation domain of p300. *J Immunol* 180: 2429-2442.
374. Matsuda S, Shibasaki F, Takehana K, Mori H, Nishida E, et al. (2000) Two distinct action mechanisms of immunophilin-ligand complexes for the blockade of T-cell activation. *EMBO Rep* 1: 428-434.

375. Granja AG, Nogal ML, Hurtado C, Vila V, Carrascosa AL, et al. (2004) The viral protein A238L inhibits cyclooxygenase-2 expression through a nuclear factor of activated T cell-dependent transactivation pathway. *J Biol Chem* 279: 53736-53746.
376. Miskin JE, Abrams CC, Dixon LK (2000) African swine fever virus protein A238L interacts with the cellular phosphatase calcineurin via a binding domain similar to that of NFAT. *J Virol* 74: 9412-9420.
377. Klimm B, Schnell R, Diehl V, Engert A (2005) Current treatment and immunotherapy of Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 90: 1680-1692.
378. Semino C, Martini L, Queirolo P, Cangemi G, Costa R, et al. (1999) Adoptive immunotherapy of advanced solid tumors: an eight year clinical experience. *Anticancer Res* 19: 5645-5649.
379. Ljungman P, Hakki M, Boeckh M Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Hematol Oncol Clin North Am* 25: 151-169.
380. Carpenter B, Haque T, Dimopoulou M, Atkinson C, Roughton M, et al. Incidence and dynamics of Epstein-Barr virus reactivation after alemtuzumab-based conditioning for allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. *Transplantation* 90: 564-570.
381. Dykewicz CA (2001) Summary of the Guidelines for Preventing Opportunistic Infections among Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Clin Infect Dis* 33: 139-144.
382. Papadopoulos EB, Ladanyi M, Emanuel D, Mackinnon S, Boulad F, et al. (1994) Infusions of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 330: 1185-1191.
383. Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, Blazar BR, McGlave PB, et al. (2005) Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood* 105: 1343-1347.
384. Nickel P, Bold G, Presber F, Biti D, Babel N, et al. (2009) High levels of CMV-IE-1-specific memory T cells are associated with less alloimmunity and improved renal allograft function. *Transpl Immunol* 20: 238-242.
385. Lucas KG, Salzman D, Garcia A, Sun Q (2004) Adoptive immunotherapy with allogeneic Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T-lymphocytes for recurrent, EBV-positive Hodgkin disease. *Cancer* 100: 1892-1901.
386. Gerdemann U, Keirnan JM, Katari UL, Yanagisawa R, Christin AS, et al. Rapidly generated multivirus-specific cytotoxic T lymphocytes for the prophylaxis and treatment of viral infections. *Mol Ther* 20: 1622-1632.
387. Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME (2008) Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 8: 299-308.
388. Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol* 12: 269-281.
389. Icheva V, Kayser S, Wolff D, Tuve S, Kyzirakos C, et al. Adoptive transfer of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 1-specific T cells as treatment for EBV reactivation and lymphoproliferative disorders after allogeneic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 31: 39-48.
390. Hertle ML, Popp C, Petermann S, Maier S, Kremmer E, et al. (2009) Differential gene expression patterns of EBV infected EBNA-3A positive and negative human B lymphocytes. *PLoS Pathog* 5: e1000506.
391. Bollard CM, Straathof KC, Huls MH, Leen A, Lacuesta K, et al. (2004) The generation and characterization of LMP2-specific CTLs for use as adoptive transfer from patients with relapsed EBV-positive Hodgkin disease. *J Immunother* 27: 317-327.
392. Ambinder RF, Robertson KD, Moore SM, Yang J (1996) Epstein-Barr virus as a therapeutic target in Hodgkin's disease and nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol* 7: 217-226.
393. Bao L, Dunham K, Stamer M, Mulieri KM, Lucas KG (2008) Expansion of cytomegalovirus pp65 and IE-1 specific cytotoxic T lymphocytes for cytomegalovirus-specific

- immunotherapy following allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 14: 1156-1162.
394. Bunde T, Kirchner A, Hoffmeister B, Habedank D, Hetzer R, et al. (2005) Protection from cytomegalovirus after transplantation is correlated with immediate early 1-specific CD8 T cells. *J Exp Med* 201: 1031-1036.
395. Bao L, Sun Q, Lucas KG (2007) Rapid generation of CMV pp65-specific T cells for immunotherapy. *J Immunother* 30: 557-561.
396. Kern F, Surel IP, Brock C, Freistedt B, Radtke H, et al. (1998) T-cell epitope mapping by flow cytometry. *Nat Med* 4: 975-978.
397. Gerdemann U, Vera JF, Rooney CM, Leen AM Generation of multivirus-specific T cells to prevent/treat viral infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *J Vis Exp*.

